

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 569 232**

51 Int. Cl.:

A61K 31/198 (2006.01)

A61K 45/06 (2006.01)

A61P 9/02 (2006.01)

A61K 31/405 (2006.01)

A61K 31/4172 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.06.2009 E 09757985 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.03.2016 EP 2296642**

54 Título: **Composiciones que comprenden aminoácidos con actividad proangiogénica**

30 Prioridad:

06.06.2008 IT TO20080443

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

09.05.2016

73 Titular/es:

**DETERMINANTS OF METABOLISM RESEARCH
LABORATORY S.R.L. (100.0%)**

Via Marconi 1

29015 Castel San Giovanni (PC), IT

72 Inventor/es:

**CONTI, FRANCO y
DIOGUARDI, FRANCESCO SAVERIO**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 569 232 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

Composiciones que comprenden aminoácidos con actividad proangiogénica

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a composiciones con actividad proangiogénica adecuadas para tratar la hipoxia tisular en mamíferos. Más específicamente, la presente invención se refiere al uso de composiciones con actividad proangiogénica que comprenden aminoácidos naturales y no naturales para prevenir, mejorar y tratar la hipoxia tisular en un sujeto de edad avanzada.

Técnica anterior

10 La hipoxia es una afección patológica caracterizada por una baja oxigenación de una región de tejido, órgano u organismo y, por lo tanto, la demanda de oxígeno en la zona en cuestión no se puede cumplir plenamente. Un aumento de la demanda metabólica en la zona en cuestión, una reducción parcial o total de la irrigación sanguínea debido a la pérdida o a la obstrucción parcial o total de los vasos sanguíneos, una reducción de la cantidad de oxígeno transportado por la hemoglobina o la cantidad de oxígeno en la propia hemoglobina se encuentran entre las causas más frecuentes de la hipoxia. En particular, el término hipoxia tisular se utiliza para indicar un fenómeno hipóxico limitado a un tejido determinado.

15 Los sujetos más expuestos a este estado patológico son los ancianos, debido al hecho de que la vejez provoca la reducción natural de los vasos sanguíneos y/o de la velocidad del flujo sanguíneo, especialmente en relación con el músculo cardíaco y el cerebro. De hecho, se ha demostrado que en una persona de edad avanzada se reduce el número, la flexibilidad y la arborización de los vasos, mientras que el espesor de la pared del vaso aumenta, de modo que se reduce el volumen del conducto. Esto conduce a una mala perfusión sanguínea y a menor aporte de oxígeno, que son principalmente las causas fundamentales de los problemas vasculares y cerebrovasculares observados en estos sujetos. La hipoxia tisular también se puede observar, en algunas formas, en sujetos no ancianos, por ejemplo, sujetos afectados por estenosis, es decir, estrechamiento de los vasos sanguíneos, de forma que se obstaculiza el flujo sanguíneo normal.

20 Una opción para el tratamiento de sujetos afectados por hipoxia tisular consiste en mejorar el flujo sanguíneo al tejido induciendo la formación de nuevas células de la sangre, o el "brote" de nuevos vasos sanguíneos a partir de vasos preexistentes, lo que se denomina "angiogénesis" o "neoangiogénesis"; generalmente, las intervenciones terapéuticas destinadas a inducir el crecimiento del número de vasos sanguíneos se identifican como "angiogénesis terapéutica". En la actualidad, los tratamientos más usados en el campo de la angiogénesis terapéutica se basan en el uso de proteínas o factores de crecimiento, tales como, por ejemplo, FGF y VEGF. Sin embargo, tales tratamientos tienen algunos efectos adversos difíciles de soportar para un sujeto de edad avanzada.

30 En algunos casos, se trató a los sujetos de edad avanzada usando las preparaciones médicas que se consideran angiogénicas de una manera aguda y durante un período de tiempo corto. Por ejemplo, en condiciones postoperatorias se considera necesaria la administración intraarterial, intravenosa, intramuscular de tales sustancias: este tipo de tratamiento puede contribuir a la mejora de las afecciones médicas generales del paciente, pero puede ser al mismo tiempo una fuente de incomodidad para el sujeto de edad avanzada debilitado y no intervenir en la necesidad de revascularización del tejido dañado.

35 Está claro que en el sujeto de edad avanzada, la funcionalidad reducida del músculo cardíaco y de las actividades cerebrales, parcialmente en función de la reducción de la cantidad de oxígeno proporcionado a través de la irrigación sanguínea, podrían beneficiarse de un proceso angiogénico a largo plazo. Por lo tanto, surge la necesidad de nuevas composiciones incluso administradas durante largos períodos de tiempo, por tanto, preferentemente, para uso crónico, administrándose dichas composiciones por medios no invasivos, particularmente medios orales, y, sobre todo, fácilmente soportables por los sujetos de edad avanzada, y que son capaces de activar un proceso angiogénico efectivo en las regiones más privadas, tales como el corazón y el cerebro.

40 Una composición de aminoácidos que comprende prolina, glicina, lisina, leucina, isoleucina, treonina, valina, fenilalanina, histidina, triptófano, metionina, tirosina y cist(e)ína para su uso en terapia para la curación de heridas y lesiones en el campo oftálmico se divulga en el documento WO-A-03/013487.

Objetivos y sumario de la invención

45 La presente invención tiene el objetivo de proporcionar nuevas composiciones para un tratamiento profiláctico y terapéutico, preferentemente, pero no exclusivamente, destinado a sujetos de edad avanzada, de trastornos vasculares y angiogénicos. Dicho objetivo se consigue a través de la solución técnica descrita en las reivindicaciones expuestas más adelante en el presente documento.

50 En una realización, la composición descrita en el presente documento es particularmente útil en el tratamiento profiláctico y terapéutico de trastornos angiogénicos determinados por condiciones de hipoxia tisular y comprende una mezcla de aminoácidos en forma libre adecuados para su uso durante un largo período de tiempo.

De hecho, los inventores encontraron que la combinación de algunos aminoácidos libres es sorprendentemente eficaz en la estimulación de procesos de angiogénesis o neoangiogénesis en mamíferos, es decir, el aumento de la vascularización y la oxigenación local. En una aplicación preferida, dicha mezcla mejora la perfusión de sangre en sujetos afectados por hipoxia tisular, en particular en sujetos ancianos.

- 5 Por lo tanto, la presente invención se refiere a composiciones basadas en aminoácidos que tienen actividad proangiogénica en mamíferos que tienen, como ingredientes activos principales, los aminoácidos de cadena ramificada leucina, isoleucina y valina, treonina, lisina, histidina, fenilalanina, metionina, triptófano, tirosina y cistina.

Una ventaja relacionada con el uso de las composiciones descritas en el presente documento reside en la alta tolerabilidad de la composición, que puede administrarse crónicamente. En una realización preferida, la administración se puede producir en un período de tiempo suficientemente largo para permitir el inicio y la continuación del proceso angiogénico, que se observa aproximadamente 60 días después de comenzar el tratamiento.

Una ventaja sustancial de las composiciones objeto de la invención está representada por el simple uso de las mismas para los pacientes tratados. Las composiciones se producen preferentemente, con o sin excipientes, de acuerdo con la producción conocida, en formulaciones adecuadas para administración oral. En una realización preferida, las composiciones descritas en el presente documento tienen un pH en solución acuosa comprendido entre 6,5 y 8,5, con o sin excipientes adecuados para la preparación de comprimidos, cápsulas, polvos, etcétera, a través de la cual se pretende obtener un rendimiento farmacológico adecuado para administración oral. Asimismo, las composiciones de aminoácidos producidas, aún de acuerdo con técnicas de producción conocidas *per se*, para otros tipos de administración se considerarán comprendidas en el alcance de la invención.

20 Una ventaja relacionada con el uso de la composición descrita en el presente documento reside en el hecho de que el uso de aminoácidos en forma libre permite la producción de tales composiciones a un coste comparativamente extremadamente bajo con respecto a la síntesis de proteínas y de factores de crecimiento, a través de procesos de producción conocidos *per se* y ampliamente utilizados en el campo de la preparación de composiciones basadas en aminoácidos libres. No obstante, el campo de aplicación de la invención puede también extenderse a los aminoácidos obtenidos mediante ingeniería genética o cualquier otro procedimiento artificial.

Breve descripción de las figuras

La invención se describirá a continuación de una manera detallada, estrictamente a título de ejemplo y no limitante, con referencia a las figuras adjuntas, en las que:

- la figura 1 representa una comparación de dos imágenes obtenidas por medio de un microscopio, con un aumento de 40x, de las respectivas secciones semifinas (de aproximadamente 0,5 μm de espesor) de muestras de corazón, respectivamente, de un animal tratado y no tratado con una mezcla de aminoácidos de acuerdo con la invención;
- la figura 2 representa una comparación de dos imágenes obtenidas de muestras similares a las utilizadas para la obtención de las imágenes de la figura 1, pero con un aumento de 100x.

Descripción detallada de las realizaciones preferidas de la invención

35 Las composiciones según la invención comprenden, como ingredientes activos principales, los aminoácidos ramificados leucina, isoleucina y valina. Las relaciones molares preferidas de isoleucina y valina, con respecto a un mol de leucina, son las siguientes:

isoleucina: de 0,2 a 0,7, preferentemente de 0,4 a 0,6;
valina: de 0,2 a 0,8, preferentemente de 0,4 a 0,7.

40 Los inventores determinaron que la actividad de las mezclas creció después de la adición de los aminoácidos treonina y lisina a los aminoácidos de cadena ramificada. Con mayor detalle, las relaciones molares preferidas de estos aminoácidos con respecto a un mol de leucina, son las siguientes:

treonina: de 0,15 a 0,50, preferentemente de 0,2 a 0,45;
lisina: de 0,15 a 0,60, preferentemente de 0,3 a 0,55.

45 En particular, en la actualidad, los estudios realizados por los inventores han demostrado que las composiciones más eficaces son aquellas en las que, teniendo en cuenta la suma de leucina, isoleucina y valina igual a 1, en la proporción estequiométrica mencionada anteriormente, la suma de treonina y lisina está comprendida entre 0,10 y 0,50 (es decir, 1:0,10 - 0,50), todavía de acuerdo con el peso molar, preferentemente entre 0,25 y 0,45 (es decir, 1:0,25 - 0,45).

50 Los estudios realizados por los inventores han demostrado además que tales composiciones son más activas en presencia de histidina, fenilalanina, metionina y triptófano. Teniendo en cuenta la suma de leucina, isoleucina, valina, treonina y lisina igual a 1, la cantidad total de los demás aminoácidos esenciales puede variar entre 0,02 a 0,25 (es decir, 1:0,02-0,25), preferentemente de 0,05 a 0,15 (es decir, 1:0,05-0,15), todavía indicados como la relación molar.

La suma de la cantidad de treonina y lisina, todavía sobre la base del peso molecular, es preferentemente inferior con respecto a la suma de las cantidades individuales de los aminoácidos ramificados usados, pero mayor con respecto a

la suma de la cantidad de los demás aminoácidos esenciales utilizados en la mezcla. Adicionalmente, aún preferentemente y sobre una base de peso molecular:

- la cantidad de lisina es inferior con respecto a las cantidades individuales de los aminoácidos ramificados, pero mayor con respecto a las cantidades individuales de cada uno de los demás aminoácidos esenciales utilizados en las mezclas (y, por lo tanto, incluso mayores que la suma de las cantidades individuales de tales otros aminoácidos esenciales, sin considerar entre ellos la treonina);
- la cantidad de treonina es inferior con respecto a las cantidades individuales de lisina y de los aminoácidos ramificados, pero mayor con respecto a las cantidades individuales de los demás aminoácidos esenciales utilizados en las mezclas y, mucho más preferentemente, mayor que la suma de las cantidades individuales de los demás aminoácidos esenciales.

En el caso en que se use metionina, la actividad de las mezclas se aumenta más proporcionando también la inserción del aminoácido no esencial cistina (y/o cisteína) en la composición, en una cantidad de moles al menos equivalente a la de metionina y, preferentemente, comprendida entre 150 y 350 % de metionina.

Junto a los aminoácidos mencionados anteriormente, las composiciones descritas en el presente documento también comprenden el aminoácido no esencial tirosina, cuya cantidad ideal deberá estar comprendida entre 15 y 50 %, preferentemente entre 20 y 35 %, de la cantidad de fenilalanina en moles.

Aunque las composiciones pueden, posiblemente, comprender otros aminoácidos con respecto a las descritas anteriormente, la cantidad total de dicho otros aminoácidos no excederá del 20 % del total de los ingredientes activos, y/o no superará el 10 % por cada dicho otro ácido amino individual (aún en peso molar). Adicionalmente, en particular, al preparar las composiciones de acuerdo con la invención, los aminoácidos serina, prolina, glicina, alanina, ácido glutámico y, sobre todo, arginina, preferentemente se evitan, dado que pueden ser contraproducentes o incluso perjudiciales en algunos casos.

Los aminoácidos usados en la experimentación que condujeron a la identificación de las proporciones indicadas son aquellos del tipo levógiro, correspondientes a los presentes en la naturaleza y que, por tanto, se deben considerar la forma activa preferida. Sin embargo, los inventores comprobaron que también la forma racémica puede realizar la misma actividad, aunque de una manera proporcionalmente menor. Asimismo, los derivados activos de los aminoácidos indicados, en particular, las sales de los mismos, se considerarán, obviamente, incluidos dentro del alcance de la presente invención.

Otras especificaciones, en términos de cantidades y relaciones entre los diversos aminoácidos proporcionados por las composiciones de actividad proangiogénica, están contenidas en las reivindicaciones adjuntas, las cuales forman una parte integral de la enseñanza técnica proporcionada en el presente documento en relación con la invención.

Aunque expresadas sobre la base de peso molecular (es decir, en moles), las proporciones indicadas son aplicables, en términos generales, también en caso de cálculo de acuerdo con el peso en gramos de los diferentes aminoácidos indicados (sin embargo, teniendo en cuenta que la cantidad de lisina, expresada en gramos, puede por tanto ser mayor con respecto a las cantidades individuales de isoleucina y valina).

A continuación se presenta una demostración, por medio de ejemplos no limitantes, de los efectos neoangiogénicos producidos en mamíferos mediante la administración crónica oral de una composición de aminoácidos libres obtenidos de acuerdo con la invención. Dichos estudios se realizaron *in vivo* en ratones de edad avanzada. Teniendo en cuenta que, en el caso de los seres humanos de edad avanzada, los órganos más afectados por alteraciones de los vasos con consecuencias considerables son el corazón y el cerebro, el estudio se centró principalmente en la evaluación cuantitativa de los efectos de la administración de la mezcla sobre la vascularización de la miocardio y de la corteza cerebral.

1. MATERIALES Y PROCEDIMIENTOS

1.1 Animales y tratamientos

El estudio se realizó de conformidad con las Directrices Nacionales de Protección de Animales. Se usaron veinte ratones C57BL/6 macho de edad avanzada (11 meses de edad, peso medio $28,3 \pm 2$ g al comienzo del tratamiento. Los animales de edad avanzada se dividieron en dos grupos: grupo control (CA, n = 10) y grupo tratado con la mezcla de aminoácidos (AA, n = 10). Los animales se mantuvieron en habitaciones con temperatura y humedad controladas, con un ciclo de luz artificial/oscuridad de 12/12 horas (de 7 de la mañana a 7 de la tarde). Los animales del grupo CA fueron alimentados con una dieta estándar y con agua a demanda, mientras que los del grupo AA se suplementaron durante 90 días en una dieta estándar y 1,5 g/kg/día de la mezcla de los aminoácidos disueltos en agua. El peso de los animales, el consumo de agua (grupo CA) y el consumo de la mezcla de aminoácidos disueltos en agua (grupo AA) se midieron diariamente en cada grupo. Al final del periodo de tratamiento se anestesió profundamente a los animales y se les sacrificó mediante perfusión intraventricular usando glutaraldehído al 2,5 % y paraformaldehído al 4 % en PBS. Se extrajeron el corazón y la corteza cerebral, se fijaron después en 1 % de O_5O_4 en PBS y se incluyeron en araldita (Sigma Chemical Co, Milán, Italia) según las instrucciones del producto.

Con el fin de evaluar el área y la densidad de los vasos en las muestras de corazón y de corteza cerebral, se realizaron secciones semifinas de aproximadamente 0,5 μm de espesor, se tiñeron con azul de toluidina. Los datos se recogieron con el microscopio óptico de los campos obtenidos al azar en diferentes niveles de tejidos. Las figuras adjuntas 1 y 2 son imágenes de los campos respectivos obtenidos del corazón de un animal no tratado y de un animal tratado, a diversos aumentos (40 x y 100 x, respectivamente).

En cuanto al corazón, se analizaron 30 campos en los animales control (CA) y 44 campos en los animales tratados (AA), respectivamente.

En cuanto a la corteza cerebral, se analizaron 27 campos tanto en los animales control (CA) como en los animales tratados (AA).

1.2 Morfometrías

Todas las mediciones se obtuvieron utilizando técnicas morfométricas estándar, como se describe, por ejemplo, en las referencias bibliográficas 1), 2) y 3). Las siguientes mediciones se obtuvieron de cada uno de los campos examinados:

Corazón: área total del campo (ATot, μm^2), área del miocardio (AMi, μm^2), área del conjuntivo (ACo, μm^2), número de vasos (NVa), área de la luz del vaso (AVa, μm^2). Este dato se usó para calcular las relaciones ACo/ATot, AVa/ATot, así como el número de vasos por unidad de área (NVa por 1000 μm^2);

Corteza cerebral: área total del campo (ATot, μm^2), número de vasos (NVa), área de la luz del vaso (AVa, μm^2). Este dato se usó para calcular las relaciones AVa/ATot, así como el número De vasos por unidad de área (NVa per 1000 μm^2).

1.3 Estadística

Los datos morfométricos se expresaron como la media \pm SD. La significación estadística de la diferencia entre las medias se evaluó a través de la prueba t de Student. Una probabilidad inferior al 5 % se consideró significativa (P <0,05). Adicionalmente, una prueba no paramétrica, la prueba de Mann-Whitney, se aplicó fijando el intervalo de confianza al 95 %.

2. RESULTADOS

La mezcla de aminoácidos utilizada, obtenida de acuerdo con los principios indicados anteriormente, se muestra en la siguiente tabla:

TABLA 1

Aminoácido	Peso molecular*	g/100g	% sobre el total	% en el grupo
L- Leucina	131,17	31,2500	31,25%	50,00%
L-Isoleucina	131,17	15,6250	15,63%	25,00%
L-Valina	117,15	15,6250	15,63%	25,00%
grupo ramificado		62,5000	62,50%	100,00%
L-lisina	146,19	16,2500	16,25%	65,00%
L-Treonina	119,12	8,7500	8,75%	35,00%
grupo de lisina + treonina		25,0000	25,00%	100,00%
L-histidina	155,16	3,7500	3,75%	46,88%
L-fenilalanina	165,19	2,5000	2,50%	31,25%
L-metionina	149,21	1,2500	1,25%	15,63%
L-triptófano	204,23	0,5000	0,50%	6,25%
Grupo de esenciales adicionales		8,0000	8,00%	100,00%
L-tirosina	181,19	0,7500	0,75%	
L-cistina	240,30	3,7500	3,75%	
composición total		100,0000	100,00%	
* de "Amino Acid, Nucleic Acids & Related Compounds - Specification/General Tests", 8ª Edición, Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd,				

En la siguiente tabla, las cantidades de composición en gramos de acuerdo con la Tabla 1 se expresan de acuerdo con el peso molecular, es decir, en moles.

TABLA 2

Aminoácido	Peso molecular	Mol	% sobre el total	% en el grupo
L- Leucina	131,17	0,23824	31,97%	48,55%
L-Isoleucina	131,17	0,11912	15,98%	24,27%
L-Valina	117,15	0,13338	17,90%	27,18%
grupo ramificado		0,49074	65,85%	100,00%
L-lisina	146,19	0,11116	14,92%	60,21%
L-Treonina	119,12	0,07346	9,86%	39,79%
grupo de lisina + treonina		0,18461	24,77%	100,00%
L-histidina	155,16	0,02417	3,24%	48,21%
L-fenilalanina	165,19	0,01513	2,03%	30,19%
L-metionina	149,21	0,00838	1,12%	16,71%
L-triptófano	204,23	0,00245	0,33%	4,88%
Grupo de esenciales adicionales		0,05013	6,73%	100,00%
L-tirosina	181,19	0,00414	0,56%	
L-cistina	240,30	0,01561	2,09%	
composición total		0,74522	100,00%	

Como se puede observar en la tabla 1, las relaciones en peso entre leucina, isoleucina y valina son, preferentemente, equivalentes a 2:1:1. La Tabla 1 y la Tabla 2 también muestran que las cantidades individuales (peso en gramos o moles) de histidina, fenilalanina, metionina y triptófano preferentemente disminuyen (es decir, la cantidad de histidina es mayor que la de fenilalanina, que es mayor que la de metionina, que es mayor que la de triptófano) y la cantidad (peso en gramos o moles) de cistina (y/o cisteína) es, preferentemente, mayor que la de tirosina. Después del tratamiento, el peso medio, así como el consumo medio diario de alimentos, agua o solución acuosa y aminoácidos en los dos grupos de animales (control y tratados) se resumen en la Tabla 3. No hubo variaciones significativas en el peso corporal y en el consumo de líquidos y alimentos en los animales que recibieron el suplemento con la mezcla de aminoácidos (animales tratados identificados con AA con respecto a los animales no tratados identificados con CA).

TABLA 3

	CA (n = 10)	AA (n = 10)
Peso corporal (g)	28 ± 2,1	29,14 ± 3,43
Consumo de alimentos (g/día)	4,71 ± 0,63	4,10 ± 0,54
Consumo de agua (ml/día)	6,36 ± 1,54	-
Consumo de agua + mezcla de aminoácidos (ml/día)	-	5,72 ± 0,41

Sin embargo, se observó una variación significativa de los parámetros morfométricos de los tejidos cardíaco y de la corteza cerebral con respecto a los animales control de la misma edad en los animales tratados con una mezcla de aminoácidos.

Los resultados en cuanto el corazón se muestran en la Tabla 4, en la que se proporcionaron los datos relativos a la comparación entre las medidas morfométricas obtenidas de secciones semifinas del corazón de animales control (CA) y tratados (AA) de edad avanzada. Tabla 5 muestra los resultados con respecto a la comparación entre las mediciones morfométricas obtenidas de secciones semifinas de la corteza cerebral de animales control (CA) y tratados (AA) de edad avanzada.

TABLA 4 - Corazón - = p<0,01**

	CA (n = 30)	AA (n = 44)	Δ %
Área total μm^2 (ATot)	720.000,00	1.007.343,75	-
Número total de vasos (NVa)	1648	3,070	-
Área total del miocardio μm^2 (AMi)	686.562,50	984.062,50	-
Área total del conjuntivo μm^2 (ACo)	33.437,50	23.281,25	-
Área total de los vasos (luz) μm^2 (AVa)	8.087,50	61.843,75	-
ACo/ATot	0,05 ± 0,01	0,03 ± 0,01 **	-40

(continuación)

	CA (n = 30)	AA (n = 44)	Δ %
NVa por 1000 μm ²	2,29 ± 0,54	3.05 ± 0.53 **	+ 33
AVa/ATot	0,011 ± 0,003	0,06 ± 0,015 **	+ 465

5 Después del tratamiento utilizando la mezcla de aminoácidos en sujetos de edad avanzada del grupo de AA hay una reducción de la relación de ACO/ATot de un 40 %, lo que indica una reducción de la fibrosis. Por encima de todo, a nivel del vaso se produce un aumento del 33 % de la densidad por unidad de superficie (NVa por 1000 μm²) asociado a un aumento de aproximadamente un 465 % significativo de la relación entre el área de la luz del vaso y el área total examinada (AVa/ATot).

10 Las imágenes de las figuras 1 y 2 permiten una observación visual inmediata de la capacidad considerable de la mezcla para inducir la vascularización de los tejidos examinados: junto con el incremento del número de capilares, las imágenes también muestran un aumento considerable de la luz de los mismos en los animales tratados de edad avanzada, con respecto a los animales no tratados.

TABLA 5 – Corteza cerebral - = p<0,01**

	CA (n = 27)	AA (n = 27)	Δ %
Área total μm ² (ATot)	648.437,50	649.218,75	-
Número total de vasos (NVa)	166	292	-
Área total de los vasos (luz) μm ² (AVa)	2,381.25	5.562,50	-
NVa por 1000 im ²	0,26 ± 0,14	0,45 ± 0,13 **	+ 72
AVa/ATot	0,004 ± 0,002	0,01 ± 0,002 **	+ 125

15 Existe un aumento aproximado del 70 % de la densidad de los vasos por unidad de área (NVa por 1000 μm²) asociado a un incremento aproximado de 125 % de la relación entre el área de la luz del vaso y el área total examinada (AVa/ATot).

20 Por lo tanto, el tratamiento prolongado de sujetos de edad avanzada utilizando la mezcla descrita permitió aumentar la vascularización, mejorando por lo tanto la profusión de la sangre y, del mismo modo, la funcionalidad del corazón y de la corteza cerebral. Esto demuestra que las mezclas obtenidas de acuerdo con la invención tienen una actividad proangiogénica significativa en mamíferos de edad avanzada.

En conclusión, la composición de aminoácidos libres propuesta en la presente invención encuentra aplicación en el campo de la angiogénesis terapéutica, como una alternativa a las opciones terapéuticas ya en uso. Las composiciones de la presente invención son adecuadas para el tratamiento de alteraciones/trastornos vasculares y angiogénicos, especialmente los relacionados con la hipoxia tisular.

25 Aunque la actividad de la mezcla se analizó con referencia particular al corazón y al cerebro, los principios de la invención se considerarán aplicables también a otros órganos, con fines angiogénicos terapéuticos o preventivos.

30 Las composiciones de acuerdo con la invención se proporcionan para el uso crónico o prolongado, es decir, con la administración extendida preferentemente durante al menos 60 días, de una manera tal que estimulan la formación de nuevos vasos a lo largo de todas las etapas del proceso angiogénico y destinadas particularmente a los ancianos, es decir, los sujetos más afectados por la reducción del número de vasos sanguíneos. Las composiciones de acuerdo con invención encuentran uso específico en sujetos de edad avanzada, pero pueden ser beneficiosas también para sujetos que no son de edad avanzada afectados por trastornos de la vascularización, por ejemplo en presencia de estenosis u otros trastornos angiogénicos.

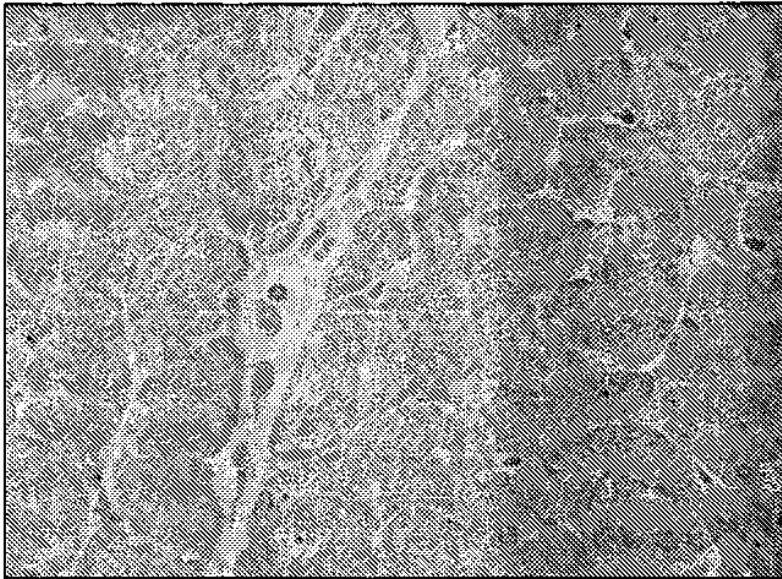
REIVINDICACIONES

1. Composición que comprende leucina, isoleucina, valina, treonina, lisina, histidina, fenilalanina, metionina, triptófano, tirosina y cistina para su uso en el tratamiento de trastornos angiogénicos mediante la promoción de la angiogénesis o de la neoangiogénesis en un sujeto, particularmente, pero no exclusivamente, un sujeto de edad avanzada.
- 5 2. Composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que dichos trastornos angiogénicos se seleccionan de hipoxia y estenosis.
3. Composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en la que composición es adecuada para administración oral.
- 10 4. Composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que la composición es adecuada para administración crónica durante un largo período de tiempo.
5. Composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que
 - la relación molar leucina:isoleucina está comprendida en el intervalo de 1:0,2 - 0,7, preferentemente entre 1:0,4 - 0,6, y/o
 - la relación molar leucina:valina está comprendida en el intervalo de 1:0,2 - 0,8, preferentemente entre 1:0,4 - 0,7.
- 15 6. Composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que
 - la relación molar leucina:treonina está comprendida en el intervalo de 1:0,15 - 0,50, preferentemente entre 1:0,20 - 0,45, y/o
 - la relación molar leucina:lisina está comprendida en el intervalo de 1:0,15 - 0,60, preferentemente entre 1:0,30 - 0,55.
- 20 7. Composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que la relación en peso de leucina:isoleucina:valina es sustancialmente equivalente a 2:1:1.
8. Composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que para una cantidad total de leucina, isoleucina y valina equivalente a un mol, la treonina y la lisina están en una relación molar total con respecto a leucina, isoleucina y valina comprendida entre 0,10 y 0,50 (1:0,10 - 0,50), preferentemente entre 0,25 y 0,45 (1:0,25 - 0,45).
- 25 9. Composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que para una cantidad total de leucina, isoleucina, valina, treonina y lisina equivalente a un mol, histidina, fenilalanina, metionina y triptófano están en una relación molar total con respecto a la leucina, isoleucina, valina, treonina y lisina comprendida entre 0,02 y 0,25 (1:0,02 - 0,25), preferentemente entre 0,05 y 0,15 (1:0,05 - 0,15).
- 30 10. Composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que dicha composición comprende metionina y cistina, estando la relación molar de metionina:cistina y/o cisteína comprendida en el intervalo de 1:1 - 3,5.
11. Composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que la relación molar fenilalanina:tirosina está comprendida en el intervalo de 1:0,15 - 0,5, preferentemente de 1:0,2 - 0,35.
- 35 12. Composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que dicha composición está libre de arginina.
13. Composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que dicha composición está libre de serina, prolina, glicina, alanina, ácido glutámico.

Fig. 1

Aumento 40x

Grupo de ratones no tratados de edad avanzada CA



Grupo de ratones tratados de edad avanzada AA

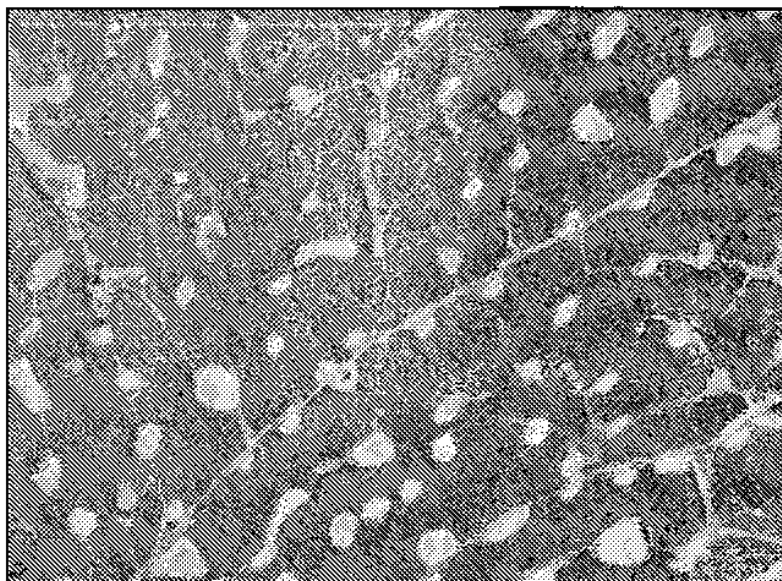
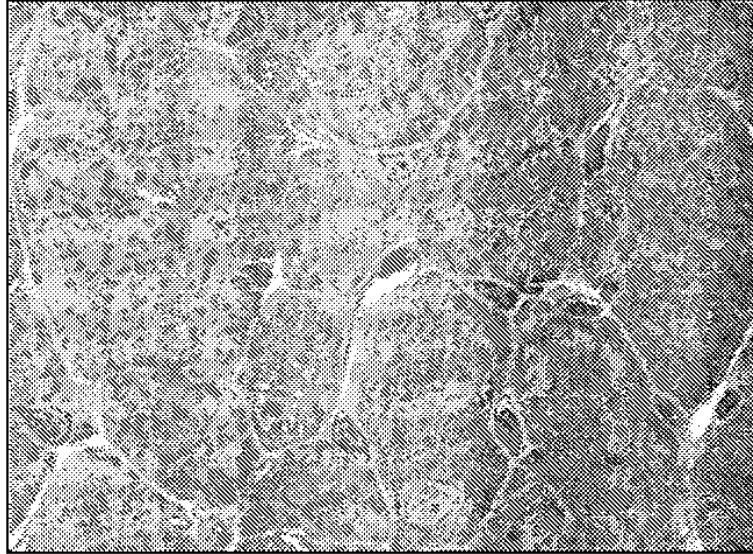


Fig. 2

Aumento 100x

Grupo de ratones no tratados de edad avanzada CA



Grupo de ratones tratados de edad avanzada AA

