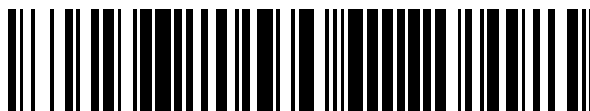


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 598 627**

51 Int. Cl.:

**A61K 38/40** (2006.01)

**A61P 25/00** (2006.01)

**A61P 9/10** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.11.2012 PCT/EP2012/072195**

87 Fecha y número de publicación internacional: **30.11.2016 WO2013068504**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.11.2012 E 12781352 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.06.2016 EP 2776058**

54 Título: **Apotransferrina para el tratamiento del ictus cerebral**

30 Prioridad:

**11.11.2011 ES 201131816 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**30.01.2017**

73 Titular/es:

**FUNDACIÓ INSTITUT D'INVESTIGACIÓ EN  
CIÈNCIES DE LA SALUT GERMANS TRIAS I  
PUJOL (100.0%)  
Carretera del Canyet s/n  
08916 Badalona, Barcelona, ES**

72 Inventor/es:

**GASULL DALMAU, TERESA;  
DEGREGORIO-ROCASOLANO BARBANY,  
NÚRIA;  
DÁVALOS ERRANDO, ANTONIO;  
SALOM SANVALERO, JUAN B;  
ALBORCH DOMÍNGUEZ, ENRIQUE y  
MARTÍ SISTAC, OCTAVI**

74 Agente/Representante:

**ZEA CHECA, Bernabé**

**ES 2 598 627 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**

Apotransferrina para el tratamiento del ictus cerebral

5 La presente invención está relacionada con el campo de la medicina, y particularmente con el campo de los accidentes cerebrovasculares. Específicamente se refiere al uso de apotransferrina para el tratamiento del ictus cerebral.

ESTADO DE LA TÉCNICA

10 La isquemia cerebral es la reducción del flujo sanguíneo hasta niveles que son insuficientes para mantener el metabolismo necesario para la normal función y estructura del cerebro. Cuando el riego sanguíneo disminuye, también disminuye el aporte de oxígeno, de nutrientes y la eliminación de productos del metabolismo de un tejido biológico, todo lo cual produce daños en el tejido cerebral.

15 La isquemia cerebral puede ser total o parcial, según afecte a la totalidad del cerebro o tan sólo a una o varias zonas. Causas frecuentes de isquemia cerebral total son la disminución del gasto cardíaco (parada cardíaca o arritmias) y la disminución de la resistencia periférica (shock sistémico, cirugía cardiovascular o hipotensión durante la anestesia por cirugía general). La causa más frecuente de la isquemia cerebral parcial es un ictus cerebral.

20 Un ictus cerebral es un trastorno circulatorio cerebral que ocasiona una alteración transitoria o definitiva del funcionamiento de una o varias partes del cerebro. Según su etiología, el ictus cerebral puede ser isquémico o hemorrágico. Un ictus isquémico se presenta cuando el cerebro pierde la irrigación sanguínea por la interrupción súbita e inmediata del flujo sanguíneo, lo que frecuentemente ocurre debido a la oclusión de alguna de las arterias que irrigan la masa cerebral a causa de un coágulo sanguíneo. Por el contrario, el ictus hemorrágico se desencadena por la ruptura de un vaso sanguíneo encefálico debido a un pico hipertensivo, un aneurisma congénito, u otras causas menos frecuentes.

25 La afectación de áreas específicas del cerebro por el ictus cerebral genera manifestaciones focalizadas como parálisis o plejía de un hemicuerpo (una mitad del cuerpo), parálisis facial, afasia (pérdida de capacidad de producir o comprender lenguaje) y desorientación, entre otras. En general, los síntomas del ictus son variables en función del área cerebral afectada. En los casos más leves, las consecuencias pueden pasar inadvertidas y ser poco limitantes para el paciente por lo anodino de la sintomatología. Sin embargo, con frecuencia el ictus provoca daños neuronales permanentes o resulta en la muerte del individuo. De hecho, el ictus cerebral es una de las principales causas de mortalidad, y de discapacidad permanente en adultos, en la mayoría de los países desarrollados.

30 Como se ha comentado anteriormente, los daños causados por la isquemia cerebral tras un ictus están relacionados con el mal funcionamiento del tejido cerebral y su posible muerte por falta de energía. Para reestablecer el aporte de energía tras un episodio isquémico se debe, por tanto, proceder a reestablecer la irrigación sanguínea en el área afectada.

35 Hasta el momento, el único tratamiento farmacológico aprobado para el tratamiento del ictus es el activador del plasminógeno tisular (tPA) por vía intravenosa. El tPA tiene efecto trombolítico, es decir, produce la disgregación del coágulo que origina la falta de riego sanguíneo en la zona cerebral en riesgo. Por tanto, este tratamiento sólo está indicado para pacientes de ictus isquémicos, siendo contraproducente en pacientes de ictus hemorrágico. Otra forma de reestablecer el flujo sanguíneo es mediante una intervención quirúrgica que elimine la oclusión.

40 Sea cual sea el tratamiento, es importante que se lleve a cabo con celeridad, de modo que se eviten mayores daños en el tejido causados por la isquemia cerebral. La administración de tPA sólo está indicada si se realiza durante las primeras 4,5 horas después del inicio de los síntomas, aunque también podría ser efectiva algunas horas más en aquellos casos en los que todavía existe tejido recuperable. Esto quiere decir que la ventana terapéutica del tratamiento trombolítico disponible es muy reducida. Además, el reestablecimiento del flujo sanguíneo (proceso conocido como reperfusión), pone fin a la situación de isquemia, conlleva a su vez nuevos daños en el tejido cerebral (daños por reperfusión).

45 Los daños por reperfusión se deben a la respuesta inflamatoria de los tejidos afectados por la isquemia y, muy especialmente, a la inducción de estrés oxidativo provocado por la repentina disponibilidad de oxígeno. Estos daños contribuyen de manera importante al detrimento de la salud del paciente de ictus. A pesar de que se están haciendo grandes esfuerzos que permitan minimizar los daños causados por la isquemia y reperfusión, hasta el momento no existen estrategias efectivas para ello.

50 Un área de investigación para limitar los efectos negativos de la reperfusión es la hipotermia terapéutica. La hipotermia puede ayudar a moderar la presión intracraneal y por lo tanto, reducir los efectos nocivos de la respuesta

inmune inflamatoria del paciente y la producción de radicales libres durante la reperfusión. Sin embargo, esta terapia es compleja en su aplicación y sus efectos son limitados.

Algunos estudios sugieren el uso de agentes quelantes de hierro para evitar los daños por reperfusión. Durante la reperfusión, el hierro transportado por la sangre es capaz de catalizar reacciones que producen especies reactivas del oxígeno, principalmente radicales hidroxilo. Estos radicales, a su vez, inician la peroxidación de los lípidos, provocan la degradación del ADN e inactivan enzimas. Debido a su elevado contenido lipídico, el cerebro es especialmente sensible a la peroxidación, lo que provoca daños considerables durante la reperfusión. La solicitud internacional de patente WO2006/20727 propone el uso de deferoxamina como agente neuroprotector contra los efectos nocivos de la reperfusión. Sin embargo, la administración de deferoxamina plantea problemas debido a su reducida vida media en plasma y porque su inyección intravenosa puede causar hipotensión con riesgo de shock letal, de modo que sólo es efectiva cuando se administra por vía intranasal en la parte superior de la cavidad nasal. En este sentido, Green AR (British Journal of Pharmacology, 2008, vol. 153, S325-S338) describe opciones de tratamiento para el ictus isquémico cerebral, uno de ellos siendo neuroprotección usando quelantes metálicos, como por ejemplo DP-b99, un derivado de BAPTA (ácido 1,2-bis(o-aminophenoxi)etano-N,N,N',N'-tetraacético), y PAN-811 (3-aminopiridina-2-carboxaldehído tiosemicarbazone)

Más aproximaciones farmacológicas se han sugerido en el campo pero ninguna de ellas ha demostrado efectividad *in vivo* para el tratamiento de daños causados por el ictus isquémico cerebral y reperfusión. Por ejemplo, Heikkinen y col. (Scandinavian Cardiovascular Journal, 2004, vol. 38, no. 3, p. 178-186) describe la administración de apotransferrina intravenosa a cerdos que sufrían un paro circulatorio hipotérmico. Sin embargo, los autores concluyen que no se observó una eficiencia terapéutica sustancial para este tratamiento.

Además, Chen-roetling J y col. (Neuropharmacology, 2011, vol. 60, no. 2-3, p.423-431) reportan que la apotransferrina puede mitigar la neurotoxicidad de hemoglobina después de hemorragia intracerebral *in vitro*. Pero este estudio no sugiere un tratamiento adecuado para condiciones no relacionadas con toxicidad de hemoglobina y subsecuente reperfusión.

Así, sería deseable encontrar nuevas estrategias para el tratamiento del ictus cerebral.

#### EXPLICACIÓN DE LA INVENCIÓN

Sorprendentemente, los presentes inventores han encontrado que la administración de apotransferrina (o transferrina libre de hierro) al torrente sanguíneo de un paciente reduce considerablemente los daños causados tras un ictus isquémico cerebral.

Así, en un primer aspecto, la invención proporciona el uso de la apotransferrina para la preparación de un medicamento para el tratamiento del ictus isquémico cerebral. Este aspecto se puede reformular como apotransferrina para su tratamiento del ictus isquémico cerebral.

La invención también se refiere a un método de tratamiento del ictus isquémico cerebral mediante la administración de apotransferrina a un animal que lo necesita. En una realización particular, el animal es un mamífero, preferentemente un humano.

Se entiende por "ictus cerebral" (también llamado infarto cerebral, accidente cerebrovascular, apoplejía o simplemente ictus) a un trastorno circulatorio cerebral que ocasiona una alteración definitiva o transitoria del funcionamiento de una o varias partes del cerebro. Cuando se afecta sólo un área del cerebro, el ictus cerebral se denomina "ictus cerebral focal". En algunos casos el ictus cerebral es transitorio, con el riego sanguíneo retornando a la zona afectada al cabo de un cierto tiempo (un proceso denominado como "reperfusión"). En otras ocasiones, no se produce una reperfusión significativa del tejido, dando lugar a un ictus cerebral permanente. Por otro lado, según su etiología, el ictus cerebral puede ser un isquémico ("ictus isquémico") o hemorrágico ("ictus hemorrágico") según se produzca como consecuencia de la oclusión de alguna de las arterias que irrigan la masa cerebral o de la ruptura de un vaso sanguíneo cerebral, respectivamente.

"Apotransferrina" es la fracción de la transferrina que se encuentra libre de hierro. La transferrina, o siderofilina, es la proteína transportadora de hierro en la sangre. Se trata de una beta 2 globulina, de forma elipsoidal y con un peso molecular que varía entre los 70000 y los 95000 daltons que tiene dos sitios activos de unión por el hierro. Cuando la transferrina está libre de hierro se denomina apotransferrina. Cuando la transferrina está saturada de hierro se denomina holotransferrina. El uso de apotransferrina en el tratamiento del ictus cerebral tiene la ventaja de que es una proteína endógena en los animales, lo que conlleva menor riesgo de generar reacciones adversas en el organismo. Preferentemente la apotransferrina para su uso en la presente invención es apotransferrina humana.

En una realización del primer aspecto de la invención la apotransferrina se administra por vía vascular.

Se entiende por “administración por vía vascular” cualquier vía de administración que introduce el medicamento en el flujo sanguíneo, a través del cual llega al tejido dañado. Ejemplos no limitativos de rutas de administración que introducen el medicamento en el flujo sanguíneo son: las rutas intravenosa (i.v) e intraarterial (i.a), las cuales introducen el medicamento directamente en el flujo sanguíneo, así como las rutas sublingual, conjuntiva, subcutánea, intramuscular, intradérmica, rectal, oral y tópica, las cuales introducen el medicamento indirectamente en el flujo sanguíneo.

Así, en una realización particular, la invención proporciona el uso de la apotransferrina en la preparación de un medicamento para el tratamiento del ictus isquémico cerebral, donde el medicamento preparado con apotransferrina se administra por vía vascular. Esta realización se puede reformular como apotransferrina para el tratamiento del ictus isquémico cerebral, donde la apotransferrina se administra por vía vascular.

La invención también se refiere a un método de tratamiento del ictus isquémico cerebral mediante la administración por vía vascular de apotransferrina a un paciente que lo necesita.

El hecho de que la administración de apotransferrina al torrente sanguíneo sea efectiva para el tratamiento del ictus isquémico cerebral es sorprendente, ya que es conocido que la apotransferrina no es capaz de atravesar la barrera hematoencefálica (Andrews N, y col. “Iron homeostasis: insights from genetics and animal models”. Nature Reviews Genetics, 2000, vol. 1, p. 208-217). Sin embargo, los inventores han demostrado la efectividad de la apotransferrina administrada al torrente sanguíneo por vía intravenosa (i.v) en el tratamiento de los daños por isquemia-reperusión en dos modelos experimentales in vivo de ictus focal isquémico transitorio (ver FIG. 1 y FIG. 2). En ambos modelos se estudió la afectación del tejido cerebral de ratas sometidas a isquemia-reperusión 24 h después de la administración de apotransferrina por inyección i.v en comparación con controles a los que no se administró apotransferrina. Los resultados indican claramente que el volumen de tejido dañado es significativamente inferior en los animales tratados con apotransferrina.

Los inventores han observado que, sorprendentemente, la administración vascular (por vía i.v) de apotransferrina también es beneficiosa en ausencia de reperusión o restauración del flujo sanguíneo. La FIG. 3 refleja los resultados obtenidos con la administración de apotransferrina en un modelo experimental in vivo de ictus focal isquémico permanente. En este modelo la apotransferrina se administró por vía i.v 50 min después de haberse producido en las ratas una oclusión permanente de la arteria cerebral media, sin reperusión. Se observa que las ratas tratadas con apotransferrina i.v presentan menores daños cerebrales que los controles no tratados; concretamente, se aprecia que el volumen de la zona cerebral dañada en las ratas tratadas con apotransferrina es un 50% menor. Además, los resultados preliminares de tests neurológicos realizados indican que las ratas sometidas a una oclusión permanente de la arteria cerebral media presentan menor déficit neurológico y realizan con mayor eficiencia tareas motoras que involucran el área cerebral isquémica cuando son tratadas con apotransferrina.

El uso de apotransferrina en el tratamiento del ictus isquémico cerebral tiene, por lo tanto, la ventaja adicional de que su efectividad va más allá de reducir los daños por reperusión, produciendo efectos beneficiosos en aquellos pacientes de ictus cerebral que no pueden ser tratados con agentes trombolíticos, con neurointervencionismo o de ninguna otra manera. La relevancia clínica es significativa, puesto que los pacientes que se encuentran en dicha situación no pueden beneficiarse hasta el momento de ningún tratamiento.

Por otro lado, la efectividad de la apotransferrina para reducir los daños causados por la isquemia cerebral tras un ictus contrastan con los efectos perjudiciales que presenta la holotransferrina. La FIG 4 demuestra que la administración i.v de holotransferrina induce muerte neuronal y una extensiva producción de radicales libres en neuronas en cultivo sometidas a un modelo in vitro de isquemia denominado privación de oxígeno y glucosa (en inglés, glucose and oxygen deprivation, u OGD). Así, de las fracciones existentes de la transferrina, tan sólo la apotransferrina es capaz de ejercer efectos beneficiosos en el tejido isquémico. Además, la holotransferrina administrada intravascularmente antes de producir la isquemia incrementa el volumen de infarto evaluado en las primeras horas después del inicio de la oclusión en un modelo experimental de ictus in vivo (FIG. 5).

La ruta de administración vascular incluye la inyección i.v y la i.a. Estas rutas de administración implican diversas ventajas relacionadas con la rapidez de la acción (el medicamento alcanza rápidamente la zona afectada), la facilidad de administración, el control de la dosis, etc. Así, el tratamiento con apotransferrina para el ictus cerebral se puede administrar directamente al torrente sanguíneo a través de un catéter intraarterial o intravenoso lo cual es muy conveniente en pacientes que, como los pacientes de ictus cerebral, se encuentran bien demasiado agitados, bien imposibilitados para realizar acciones sencillas como ingerir un medicamento. Por otro lado, la administración de apotransferrina por vía i.v o i.a facilita la administración de este agente activo junto con un agente trombolítico, como tPA, o bien otro agente terapéutico, en una terapia combinada para el tratamiento del ictus cerebral.

La invención también contempla la administración de apotransferrina mediante otra ruta de administración vascular, por ejemplo, oral o sublingual. Adicionalmente, la invención contempla la administración de apotransferrina mediante inyección epidural, inyección intracraneal o aplicación intranasal.

5 Así, en una realización particular la ruta de administración de apotransferrina es intravenosa o intraarterial. En otra realización particular la ruta de administración de la apotransferrina es sublingual. En otra realización particular la ruta de administración es intranasal.

10 La administración de apotransferrina según la invención es útil para el tratamiento del ictus cerebral independientemente de la magnitud del ictus. Así, la invención se refiere al tratamiento del ictus cerebral permanente o transitorio, así como para el tratamiento de un ictus cerebral provocado por un trombo (isquémico).

15 En una realización particular, la invención proporciona apotransferrina para el tratamiento de un ictus cerebral isquémico, que es un ictus isquémico focal agudo.

En una realización, la invención proporciona apotransferrina para el tratamiento de un ictus cerebral permanente. En otra realización se proporciona apotransferrina para el tratamiento de un ictus cerebral transitorio.

20 Los pacientes que han sufrido un ictus isquémico pueden en ocasiones ser susceptibles de tratamiento con terapia trombolítica. En estos casos, el tratamiento del ictus con la terapia trombolítica se puede combinar ventajosamente con la terapia a base de apotransferrina. Mientras el agente trombolítico permite reestablecer la circulación de la sangre en la zona afectada, la apotransferrina minimiza los daños producidos por la isquemia y la reperfusión, evitando mayores daños al tejido. Así, en una realización particular, la invención proporciona apotransferrina para el tratamiento del ictus cerebral isquémico en combinación con un agente trombolítico. Preferentemente, el agente trombolítico es un activador del plasminógeno tisular humano.

25 En general, el tratamiento con apotransferrina se realizará lo antes posible con el fin de evitar mayores daños al tejido cerebral, de modo que el profesional médico puede considerar adecuado administrar la apotransferrina tan pronto como el paciente de ictus llega a sus manos. En algunos casos, como en pacientes susceptibles de ser tratados con terapia trombolítica, la apotransferrina se puede administrar en el momento de la reperfusión. Por "en el momento de la reperfusión" se entiende desde dos horas antes hasta 2 horas después de la reperfusión, o bien justamente en el mismo momento de la reperfusión. Esto implica que la apotransferrina se puede administrar al mismo tiempo que se administra un agente trombolítico, o en el momento de realizar una intervención quirúrgica para eliminar el trombo que obstruye el flujo sanguíneo. En los casos en los cuales la restauración del flujo sanguíneo es inexistente o muy limitada también es beneficiosa la administración de apotransferrina y, por lo general, ésta se hará lo antes posible después del diagnóstico.

30 La presente invención también proporciona el uso de apotransferrina para el tratamiento de pacientes de ictus isquémico cerebral en combinación con otras terapias. Terapias adecuadas para su uso en combinación con la terapia a base de apotransferrina son, como se ha comentado anteriormente, tratamiento trombolítico y/o intervención quirúrgica para eliminar el trombo que causa el ictus isquémico. Otras terapias adecuadas para su uso en combinación con la terapia a base de apotransferrina son, sin limitación, la intervención quirúrgica para frenar la hemorragia que provoca el ictus hemorrágico, el tratamiento con citicolina, con agentes quelantes, con agentes antioxidantes, con limitadores del daño excitotóxico, con agentes antiinflamatorios, con fluoxetina, o junto a otras apoformas de moléculas transportadoras de hierro que utilizan receptores para su transporte como por ejemplo la lactoferrina.

35 En una realización particular, la apotransferrina se usa en terapia de combinación con un agente quelante, por ejemplo un agente quelante de hierro. En otra realización particular, el agente quelante es deferoxamina. En otra realización particular la apotransferrina se utiliza en terapia de combinación con un agente quelante de otro metal diferente al hierro. En otra realización particular la apotransferrina se usa en combinación con citicolina. La citicolina (citidina 5'-difosfocolina) es un intermediario en la síntesis de fosfatidilcolina a partir de la colina que ha demostrado un efecto beneficioso en la evolución de la hipoxia e isquemia cerebral.

40 El experto en la materia entiende que la terapia de combinación es efectiva cuando los agentes terapéuticos son administrados formando parte de una misma composición, pero también cuando forman parte de composiciones diferentes, ya sea para administración separada, secuencial o simultánea. Por otro lado, el experto en la materia entenderá que la apotransferrina se puede prescribir para el tratamiento del ictus cerebral con una indicación para usar en combinación con otro agente activo.

45 La invención también se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden una cantidad terapéuticamente efectiva de apotransferrina, junto con cantidades suficientes de vehículos y excipientes farmacéuticamente

aceptables. En una realización particular, la composición farmacéutica de la invención está diseñada para su administración vascular, por ejemplo para su administración por vía i.v o i.a.

Por "farmacéuticamente aceptables" se entiende que compuestos, materiales o composiciones son apropiados para ser administrados en un animal, incluyendo un humano, sin inducir toxicidad, irritación, incompatibilidad, inestabilidad, respuesta alérgica o similar. Cada vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable también debe ser aceptable en el sentido de ser compatible con los demás ingredientes de la composición farmacéutica de la invención. Las composiciones de la presente invención pueden comprender, adicionalmente, componentes que permitan una liberación controlada o mayor confort.

Preferentemente, las composiciones de la invención se administrarán a los pacientes por vía i.v o i.a. Como podrán apreciar los expertos en la materia, las composiciones pueden prepararse en diferentes formas adecuadas para administrar por vía i.v o i.a. En una realización particular la composición comprende apotransferrina y suero fisiológico.

En las aplicaciones terapéuticas, los agentes activos se administran a un paciente que sufre de una enfermedad en una cantidad terapéuticamente efectiva. Por "cantidad terapéuticamente efectiva" se entiende una cantidad de agente activo suficiente para producir beneficios al paciente. La cantidad de apotransferrina que comprende la composición farmacéutica de la invención puede ser determinada por una persona experta en la materia siguiendo protocolos estándar en el campo de la clínica médica. La cantidad terapéuticamente efectiva se conoce también como la dosis. La dosis exacta dependerá de la vía de administración, la severidad de la enfermedad y del estado general de salud del paciente. Pueden administrarse al paciente dosificaciones únicas o múltiples (a intervalos de tiempo) del agente activo. Por ejemplo, para administración i.v o i.a de apotransferrina se pueden usar cantidades entre 1 a 2000 mg por Kg de peso, o bien entre 10 y 1500 mg por Kg de peso o bien entre 50 y 1000 mg por Kg de peso, o bien entre 100 y 800 mg por Kg de peso, o bien entre 100 y 600 mg por Kg de peso, o bien entre 120 y 500 mg por Kg de peso, o bien entre 150 y 400 mg por Kg de peso.

La apotransferrina para su uso en la presente invención se puede preparar por métodos conocidos en el estado de la técnica. Por ejemplo, la solicitud internacional de patente WO2000/001407 describe métodos para preparar apotransferrina humana para composiciones farmacéuticas. También se puede obtener apotransferrina de manera recombinante.

La presente invención también contempla una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de apotransferrina, junto con cantidades suficientes de excipientes y vehículos farmacéuticamente aceptables, para su uso en el tratamiento del ictus isquémico cerebral. Esto se puede reformular como el uso de una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de apotransferrina, junto con cantidades suficientes de vehículos y excipientes farmacéuticamente aceptables, para la preparación de un medicamento para el tratamiento del ictus isquémico cerebral. En una realización particular, el tratamiento del ictus isquémico cerebral se lleva a cabo administrando la composición de la invención por vía vascular, por ejemplo por vía i.v o i.a, y la composición está formulada para su administración por vía i.v o i.a.

Por último, la invención también se refiere a un método de tratamiento del ictus isquémico cerebral que comprende administrar al paciente, preferentemente por vía vascular, una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de apotransferrina, junto con cantidades suficientes de vehículos y excipientes farmacéuticamente aceptables.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Además, la presente invención cubre todas las posibles combinaciones de realizaciones particulares y preferidas aquí indicadas.

#### BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

FIG. 1. Volumen de infarto cortical inducido en ratas por 60 min de oclusión de la arteria cerebral media mediante ligadura. A, imagen del área afectada en los cerebros de las ratas. B, porcentaje del volumen de tejido cerebral infartado con administración de: (2) apotransferrina o (1) vehículo. Con respecto a los ejemplos, la FIG. 1 se relaciona con el apartado 1 de resultados.

FIG. 2. Volumen de infarto cortical inducido en ratas por 90 min de oclusión de la arteria cerebral media mediante filamento intraluminal. A, imagen del área afectada en el cerebros de una rata. B, porcentaje del volumen de tejido infartado con administración de: (2) apotransferrina o (1) vehículo. Con respecto a los ejemplos, la FIG. 2 se relaciona con el apartado 1 de resultados.

FIG. 3. Porcentaje de volumen de infarto cortical inducido en ratas por la oclusión permanente de la arteria cerebral media mediante ligadura con administración de: (2) apotransferrina o (1) vehículo. Con respecto a los ejemplos, la FIG. 3 se relaciona con el apartado 1 de resultados.

5 FIG. 4. A, Determinación del efecto de diferentes concentraciones de holotransferrina (HTf) sobre la muerte neuronal en: (a) cultivos normóxicos o (b) cultivos sometidos a privación de glucosa y oxígeno (OGD) y 30 min de reperusión. El eje Y muestra la muerte neuronal determinada por la incorporación de yoduro de propidio a las células. B, producción de radicales libres en: (a) neuronas en cultivo control, (1) neuronas con adición de 50  $\mu\text{M}$   $\text{FeCl}_3$  o (2) neuronas con adición de 5  $\mu\text{M}$  HTf. El eje Y muestra el porcentaje de fluorescencia DCF vs OGD/vehículo. Con respecto a los ejemplos, la FIG. 4 se relaciona con el apartado 2 de resultados.

10 FIG. 5. Daño neuronal medido por resonancia magnética nuclear en ratas sometidas a la oclusión transitoria de la arteria cerebral media mediante filamento intraluminal previa inyección intravascular de vehículo (1) u holotransferrina (2). El eje X representa el tiempo en min mientras que el eje Y representa el volumen de daño neuronal en  $\text{mm}^3$  según la secuencia DWI. Con respecto a los ejemplos, la FIG. 5 se relaciona con el apartado 2 de resultados.

## EJEMPLOS

20 Los siguientes ejemplos se proporcionan a modo de ilustración y sin intención de ser limitantes para la presente invención.

### Materiales y métodos

#### 1. Modelo in vitro

25 1.1. Cultivo primario de neuronas de corteza cerebral de rata. Los cultivos de neuronas corticales se prepararon siguiendo el protocolo previamente descrito (Ponce J., y col. "The effect of simvastatin on the proteome of detergent resistant membrane domains: decreases of specific proteins previously related to cytoskeleton regulation, calcium homeostasis and cell fate", *Proteomics* 2010, vol. 10, p. 1954-1965), si bien las neuronas se sembraron en placas de 24 pocillos.

35 1.2. Privación de oxígeno y glucosa. Los estudios se realizaron en neuronas de 11 días en cultivo. Para producir la privación de oxígeno y glucosa (OGD) el medio de cultivo condicionado se retiró y guardó aparte. Las células expuestas a OGD se incubaron durante 90 min con medio basal de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (Invitrogen, Barcelona, España) en una atmósfera que contenía 0,1%  $\text{O}_2$ . Las células control se incubaron con DMEM suplementado con 4,5 g/l de glucosa en condiciones de normoxia. La reperusión se produjo retornando el medio condicionado y las condiciones de normoxia a las células durante 30 min.

40 1.3. Tratamientos en los cultivos de neuronas. Las neuronas corticales en cultivo se trataron con  $\text{FeCl}_3$  (10-50  $\mu\text{M}$ ), holotransferrina (HTf) (1-5  $\mu\text{M}$ ) o apotransferrina (1-5  $\mu\text{M}$ ) (Sigma, Madrid, España) durante el período de reperusión.

45 1.4. Determinación de la muerte celular. Los estudios de muerte celular se determinaron siguiendo la medición de la incorporación de yoduro de propidio a las células (Sigma, Madrid, España) usando el método previamente descrito (Rudolph J.G., y col. "Use of a multiwell fluorescence scanner with propidium iodide to assess NMDA mediated excitotoxicity in rat cortical neuronal cultures". *Neurosci. Lett.*, 1997, vol. 221, p. 149-152).

50 1.5. Producción de radicales libres del oxígeno. Como un índice de la producción de  $\bullet\text{OH}$  + peróxido se estudió la conversión de la mezcla de isómeros del compuesto éster acetilo de 5-(and-6)-clorometil-2,7-diclorodihidrofluoresceína diacetato (CM-H2DCFDA) (Invitrogen, Barcelona, España) a diclorofluoresceína (DCF). Neuronas expuestas a OGD fueron reperfundidas durante 30 min en presencia o ausencia de 5  $\mu\text{M}$  HTf o 50  $\mu\text{M}$   $\text{FeCl}_3$ . El compuesto CM-H2DCFDA (10  $\mu\text{M}$ ) se añadió al medio de reperusión y se adquirieron imágenes al microscopio con el filtro apropiado según lo indicado por el fabricante. La intensidad de la señal se cuantificó utilizando el programa Image J (NIH, USA).

#### 55 2. Modelos in vivo

60 Todos los protocolos experimentales en los que intervienen animales fueron aprobados por el comité ético de experimentación animal de la Fundació Institut D'investigació en Ciències de la Salut Germans Trias i Pujol. Se indujo anestesia a los animales por exposición a 5% isoflurano o 2% sevoflurano en una mezcla de 30/70%  $\text{O}_2/\text{N}_2\text{O}$ . Los animales permanecieron anestesiados durante todo el procedimiento quirúrgico por inhalación de una dosis de mantenimiento de anestesia de 1,5-2,0% isoflurano o 0,5-1 sevoflurano en una mezcla de 30/70%  $\text{O}_2/\text{N}_2\text{O}$ . Una vez finalizadas las intervenciones para realizar los modelos experimentales de ictus, las incisiones quirúrgicas

se suturaron y los animales retornaron a sus cajas permaneciendo en ellas 24 h hasta el momento de realizar los tests neurológicos postisquemia y el sacrificio del animal. En algunos casos, los animales fueron sometidos a tests neurológicos en días previos a la realización de la cirugía cuyos resultados se compararon con los resultados de test idénticos realizados postcirugía.

5 2.1. Procedimiento de isquemia cerebral focal transitoria realizada mediante ligadura de la arteria cerebral media (MCA).

10 Ratas macho Sprague-Dawley (250-270 g, Harlan Laboratories, Barcelona) fueron sometidas a una pequeña craneotomía para exponer la arteria cerebral media que se ligó justo antes de su bifurcación en la rama frontal y parietal justo antes de la rama oftálmica. Se comprobó bajo lupa quirúrgica la interrupción del flujo sanguíneo, y se ocluyeron ambas arterias carótidas durante 60 min. Al finalizar los 60 min se desligaron ambas carótidas y la cerebral media, e inmediatamente después se administró vehículo (solución salina fisiológica) o 50 mg de apotransferrina (Sigma, Madrid, España) en solución vehículo directamente al compartimento intravascular por inyección en los vasos de la cola del animal.

2.2. Procedimiento de isquemia cerebral focal permanente realizada mediante ligadura de la MCA.

20 El protocolo es idéntico al descrito en el apartado 2.1. excepto que la MCA y la carótida izquierda permanecieron ligadas hasta el momento del sacrificio del animal y que se administró el vehículo o la apotransferrina 50 min después del inicio de la isquemia.

2.3. Procedimiento de isquemia cerebral focal transitoria utilizando filamento intraluminal. Efecto de la administración de apotransferrina.

25 Ratas machos Wistar (300-350 g, Charles River Laboratories, Barcelona, España) se anestesiaron con una inyección de 5 mg/kg diazepam (Almirall Prodesfarma, Barcelona, España), 100 mg/kg ketamina (Ketolar, Parke-Davis, El Prat de Llobregat, Barcelona, España) and 0,3 mg/kg atropina (B Braun Medical, Rubí, Barcelona, España) para permitir su intubación para ventilación mecánica (Harvard Apparatus, 683 rodent ventilator, Holliston, MA, USA). Se prolongó la anestesia por exposición a 0,5–1% sevoflurano (Sevorane, Abbott Laboratories, Madrid, España) en una mezcla de 30/70% O<sub>2</sub>/N<sub>2</sub>O. Se indujo la isquemia focal en el hemisferio derecho usando un filamento de nilón que se introduce hasta ocluir la MCAO siguiendo el protocolo descrito por Longa E.Z. y colaboradores (Longa E.Z., y col. "Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats". Stroke 1989, vol. 20, p. 84-91). La oclusión y reducción del flujo sanguíneo se midieron con una sonda laser-doppler fijada al craneo en la zona parietal adyacente al extremo a la zona de irrigación de la MCA. 90 min después del inicio de la isquemia el filamento intraluminal se retiró, se esperaron 5-10 min para verificar el restablecimiento efectivo del flujo sanguíneo a sus niveles previos, y se administró intravascularmente 100 mg totales de apotransferrina en dos administraciones realizadas con 30 min de diferencia (Sigma, Madrid, España). Como control se utilizaron ratas a las que se administró vehículo en lugar de apotransferrina.

40 2.4. Isquemia cerebral focal transitoria utilizando filamento intraluminal. Efecto de la administración de holotransferrina.

45 En este experimento se utilizó el mismo procedimiento descrito por Longa E.Z. y colaboradores pero en ratas macho Sprague-Dawley de 250-280 g (Animalario de la Universidad de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, España). Además, los animales fueron inyectados intravascularmente con 85 mg de holotransferrina o vehículo 10 min antes de iniciar la oclusión. Tras haberse realizado la oclusión, los animales fueron introducidos en un aparato de resonancia magnética nuclear de (9,4 T) (Bruker Biospan, Ettlingen, Alemania) para determinar el volumen de tejido cerebral hipoperfundido durante los 90 min de isquemia y la secuencia diffusion-weighted imaging (DWI) correspondiente a zona cerebral dañada. Se realizaron diversas determinaciones en intervalos de 15 min a lo largo de los 90 min de isquemia y hasta llegar a los 165 min del inicio de la oclusión.

2.5. Test neurológicos.

55 La isquemia cerebral focal unilateral practicada sólo afecta a la función sensorial y motora del lado contralateral del animal. Con el fin de evaluar el grado de afectación cerebral sensorial y motora izquierda y derecha del animal se llevó a cabo una batería de tests neurológicos. El resultado de todos estos tests dio como resultado un valor de déficit neurológico que se correlacionó con el volumen de infarto. Como control se realizó para cada animal un pretest basal antes de realizar la isquemia focal. Se llevaron a cabo los siguientes tests, los cuales son bien conocidos en el estado de la técnica:

60 2.5.1. Test de los bigotes: Se evaluó la capacidad de respuesta del animal a una estimulación de los bigotes del lado izquierdo y derecho realizado de forma que el animal no tiene información visual al respecto.



2.5.2. Test de capacidad prensil: Se evaluó el tiempo que cada animal fue capaz de mantenerse agarrado por las dos extremidades superiores a una varilla suspendida aguantando su propio peso.

2.5.3. Test del giro en la esquina: Se evaluó la habilidad del animal para realizar giros a la derecha o a la izquierda cuando fue situado frente a una esquina en ángulo 30 ° de forma que debía girarse para poder moverse.

2.5.4. Test de la pegatina: Se adhirió una pegatina a cada una de las extremidades superiores del animal y se contabilizó el tiempo que tardó en arrancar cada pegatina.

2.5.6. Test de suspensión por la cola: Se contabilizó el porcentaje y el ángulo de los giros corporales a derecha e izquierda que realizó el animal suspendido por la cola.

2.5.7. Test de la rejilla: Evalúa la fuerza que puede realizar el animal con sus extremidades superiores agarradas a una rejilla.

2.6. Determinación del volumen de infarto.

Una vez sacrificado el animal a las 24 horas del inicio de la isquemia cerebral, se diseccionó el cerebro y se cortó en rodajas coronales de 2 mm que fueron incubadas con una solución de 1% de cloruro de 2,3,5-trifeniltretazolio (TTC) (Sigma, Madrid, España) durante 20 min a 37 °C. Las rodajas fueron fotografiadas y se calculó el porcentaje de área cerebral no teñida con TTC respecto al área presente en el hemisferio ipsilesional. La zona no teñida con TTC se corresponde con la zona dañada por el ictus.

Resultados

1. La administración intravenosa de apotransferrina reduce considerablemente los daños neuronales causados tras un ictus cerebral.

Las FIGs 1 y 2 muestran la efectividad de la apotransferrina administrada al torrente sanguíneo por vía intravenosa en el tratamiento de la isquemia cerebral en dos modelos experimentales in vivo de ictus focal isquémico transitorio. La FIG. 1 representa la reducción del volumen de infarto cortical inducido por 60 min de oclusión de la arteria cerebral media mediante ligadura de la MCAO en los animales tratados con apotransferrina en comparación con los controles a los que sólo se administró vehículo. La FIG. 2 representa la reducción del volumen de infarto inducido por 90 min de oclusión de la arteria cerebral media mediante filamento intraluminal en los animales tratados con apotransferrina en comparación con los controles. Las zonas más claras en las imágenes (A) de las FIGs 1 y 2 indican la zona cerebral afectada. En ambos casos los resultados demuestran claramente que la administración de apotransferrina es altamente beneficiosa para reducir los daños causados por el ictus cerebral focal isquémico transitorio.

El efecto de la administración por vía intravenosa de apotransferrina también se observó en un modelo de ictus cerebral focal permanente. En la FIG. 3 se observa como la administración i.v de apotransferrina 50 min después de haberse producido en las ratas una oclusión permanente de la arteria cerebral media provocó que se redujera considerablemente (alrededor de un 50%) el volumen de zona cerebral dañada. Por lo tanto, la administración de apotransferrina también es efectiva para el tratamiento del ictus focal permanente, donde no se produce la reperusión del tejido isquémico. Los animales sometidos a oclusión permanente de la arteria cerebral media también fueron objeto de tests neurológicos con el fin de evaluar su grado de afectación cerebral sensorial y motora. Los resultados preliminares de estos tests indicaron que las ratas presentaron menor déficit neurológico y realizaron con mayor eficiencia tareas motoras que involucran el área cerebral afectada cuando fueron tratadas con apotransferrina, confirmando así los resultados anteriores.

2. La holotransferrina incrementa el daño neuronal en modelos in vitro e in vivo de ictus cerebral.

También se estudió el efecto de la holotransferrina (fracción de la transferrina que está saturada de hierro) en un modelo in vitro de isquemia denominado OGD. Según se muestra en la FIG. 4, la holotransferrina induce muerte neuronal (A) y una extensiva producción de radicales libres (B) en neuronas en cultivo sometidas a OGD. Consistentemente se observó que la holotransferrina inyectada intravascularmente antes de que tenga lugar el ictus cerebral incrementa el daño neuronal causado por el ictus. La FIG. 5 muestra el DWI (volumen de diffusion-weighted image) medido por resonancia magnética nuclear en animales sometidos a isquemia cerebral focal transitoria utilizando filamento intraluminal. Este DWI se corresponde a la zona de tejido que va a morir. En la figura se observa que los animales tratados con holotransferrina a diferentes tiempos antes de realizar la oclusión de la MCA presentaron mayor DWI que los controles, es decir, presentaron mayores daños neuronales que los controles.

Estos resultados indican que, a diferencia de la apotransferrina, la holotransferrina es perjudicial para los pacientes de ictus cerebral.

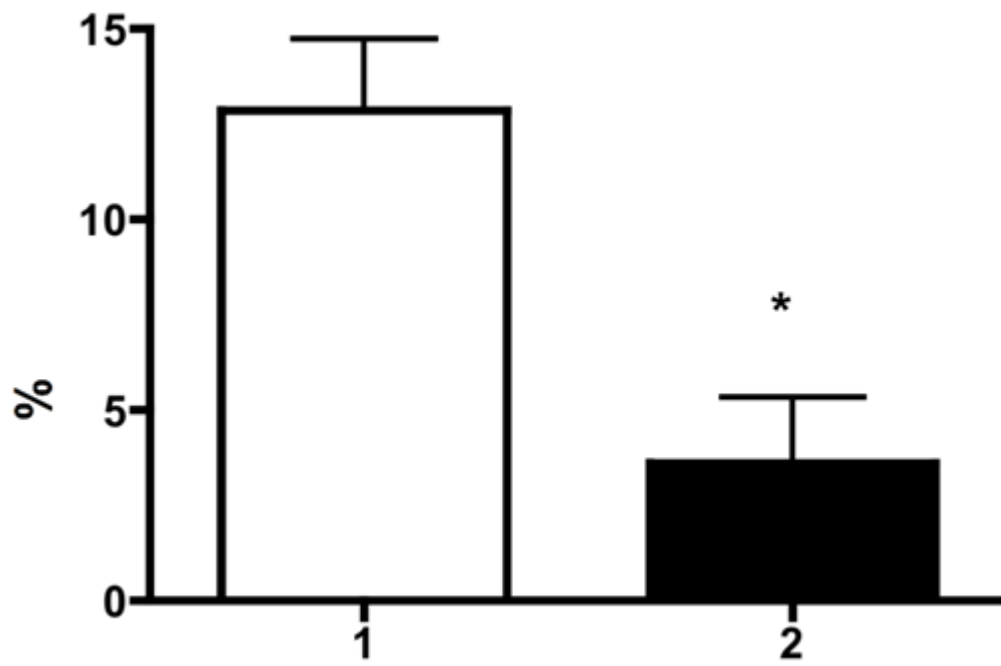
**REIVINDICACIONES**

1. Apotransferrina para su uso en el tratamiento del ictus isquémico cerebral.
- 5 2. Apotransferrina para su uso según la reivindicación 1, que es para administración por vía vascular.
3. Apotransferrina para su uso según la reivindicación 2, que es para administración por vía intravenosa o intraarterial.
- 10 4. Apotransferrina para su uso según la reivindicación 3, donde el ictus isquémico es un ictus isquémico focal agudo.
5. Apotransferrina para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en combinación con un agente seleccionado del grupo que consiste en un agente trombolítico, un agente quelante, citicolina, fluoxetina y lactoferrina.
- 15 6. Apotransferrina para su uso según la reivindicación 5, donde la combinación es con un agente trombolítico.
7. Apotransferrina para su uso según la reivindicación 6, donde el agente trombolítico es un activador del plasminógeno tisular humano.
- 20 8. Apotransferrina para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 6-7, que es administrado en el momento de la reperfusión.
9. Apotransferrina para su uso según la reivindicación 5, donde el agente quelante es deferoxamina.
- 25 10. Apotransferrina para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-9, donde el ictus cerebral es un ictus transitorio.
- 30 11. Apotransferrina para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-9, donde el ictus cerebral es un ictus permanente.
12. Apotransferrina para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-11, donde la dosis a administrar de apotransferrina está comprendida entre 1 y 1000 mg por Kg de peso.

**A**

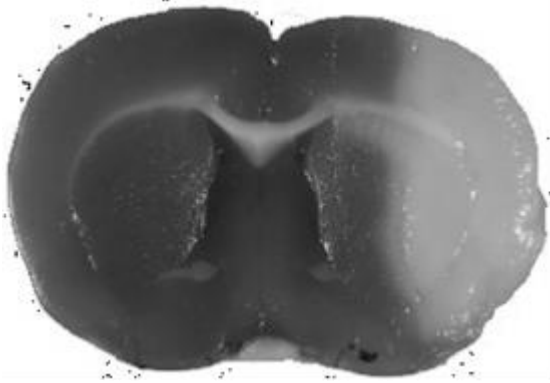


**B**

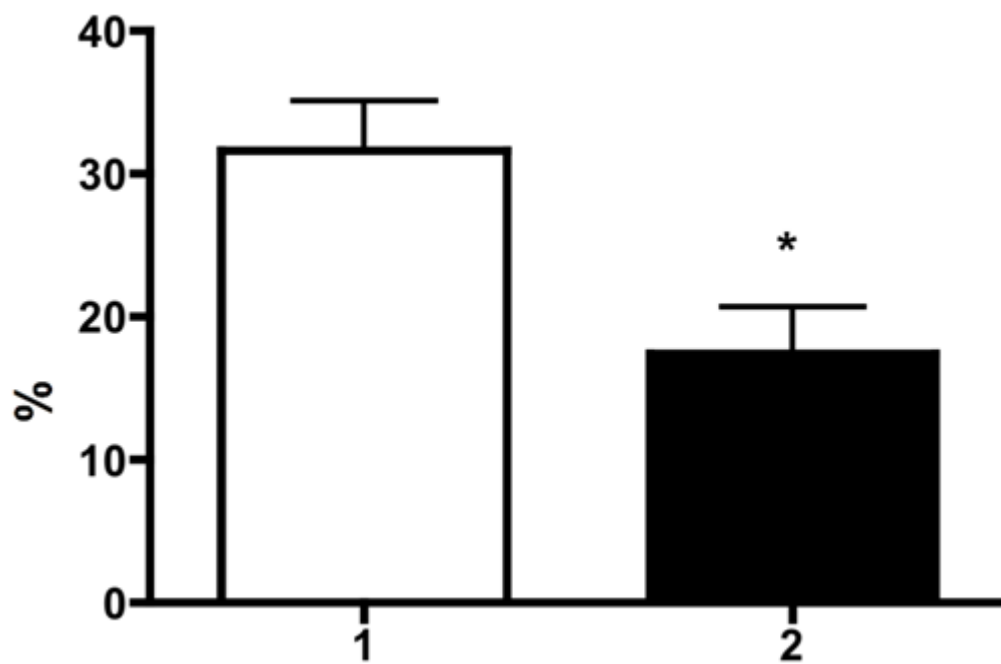


**FIG. 1**

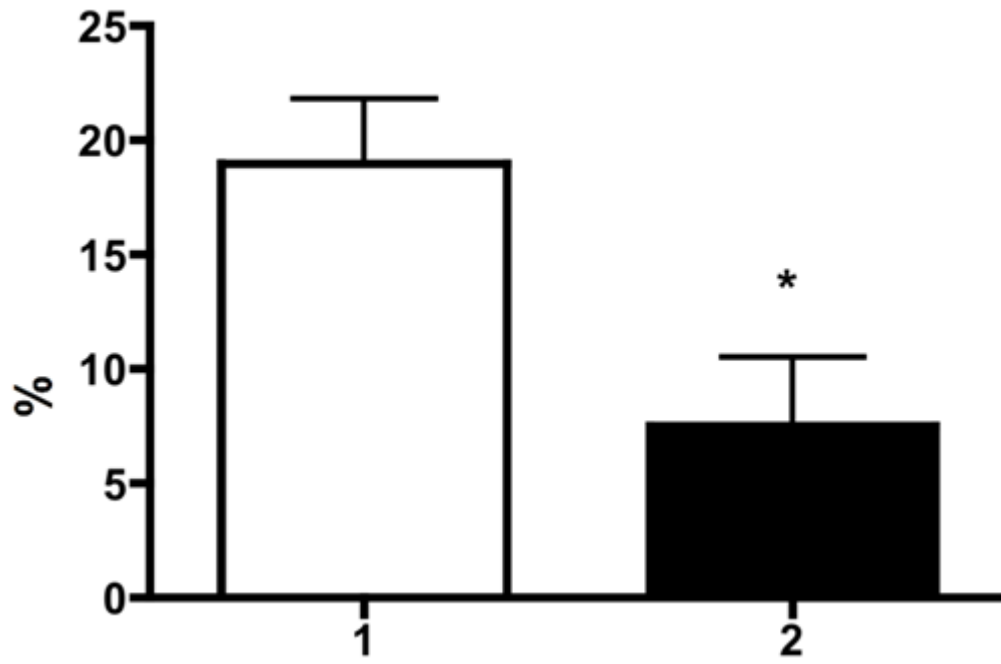
**A**



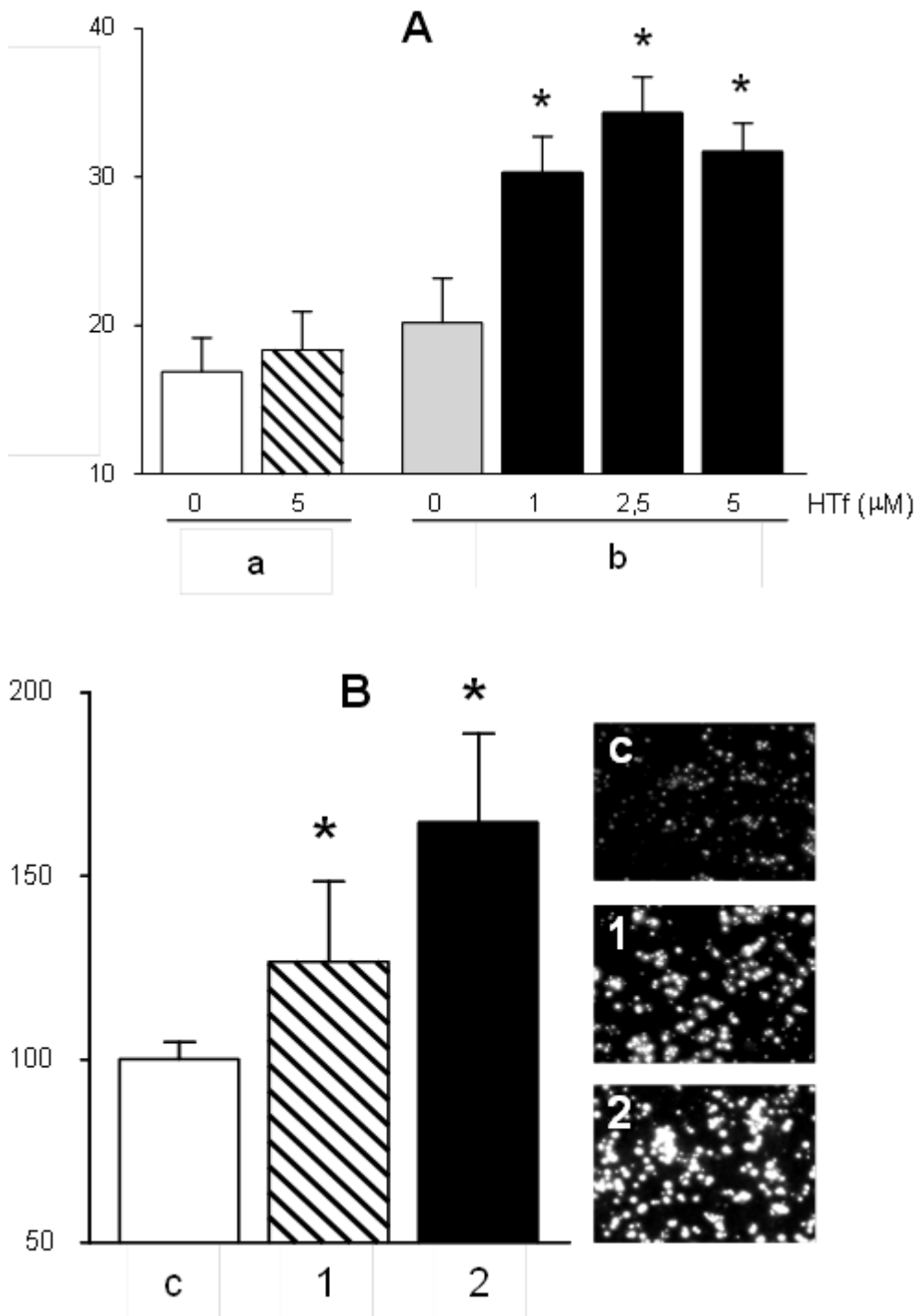
**B**



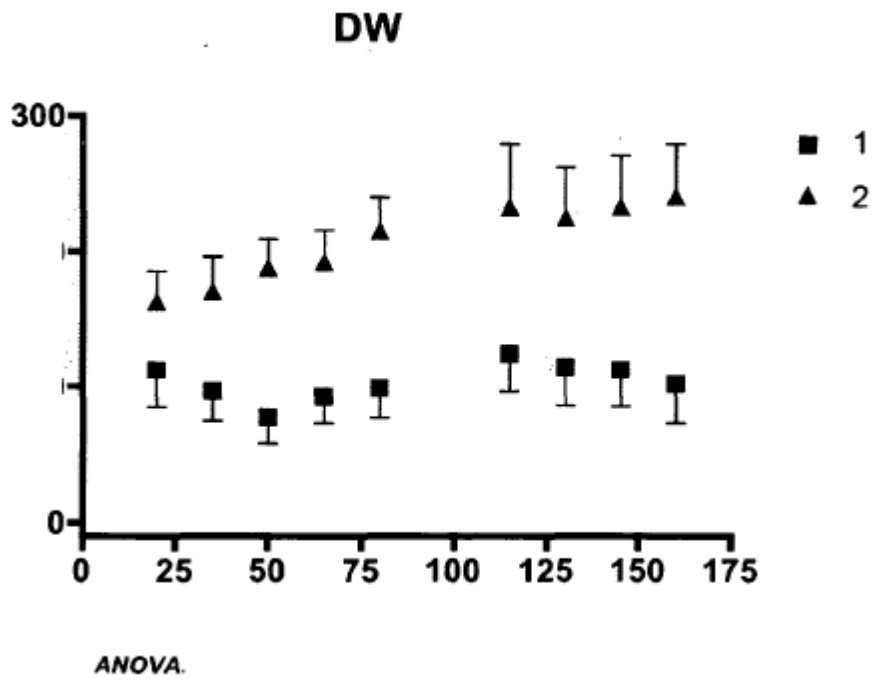
**FIG. 2**



**FIG. 3**



**FIG. 4**



**FIG. 5**



**REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN**

5 *Esta lista de referencias citadas por el solicitante es únicamente para la comodidad del lector. No forma parte del documento de la patente europea. A pesar del cuidado tenido en la recopilación de las referencias, no se pueden excluir errores u omisiones y la EPO niega toda responsabilidad en este sentido.*

**Documentos de patentes citados en la descripción**

- WO 200620727 A [0011]
- WO 2000001407 A [0043]

10

**Literatura diferente de patentes citada en la descripción**

- **GREEN AR.** *British Journal of Pharmacology*, 2008, vol. 153, S325-S338 [0011]
- **HEIKKINEN et al.** *Scandinavian Cardiovascular Journal*, 2004, vol. 38 (3), 178-186 [0012]
- **CHEN-ROETLING J et al.** *Neuropharmacology*, 2011, vol. 60 (2-3), 423-431 [0013]
- **ANDREWS N et al.** Iron homeostasis: insights from genetics and animal models. *Nature Reviews Genetics*, 2000, vol. 1, 208-217 [0024]
- **PONCE J. et al.** The effect of simvastatin on the proteome of detergent resistant membrane domains: decreases of specific proteins previously related to cytoskeleton regulation, calcium homeostasis and cell fate. *Proteomics*, 2010, vol. 10, 1954-1965 [0049]
- **RUDOLPH J.G. et al.** Use of a multiwell fluorescence scanner with propidium iodide to assess NMDA mediated excitotoxicity in rat cortical neuronal cultures. *Neurosci. Lett.*, 1997, vol. 221, 149-152 [0049]
- **LONGA E.Z. et al.** Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke*, 1989, vol. 20, 84-91 [0054]