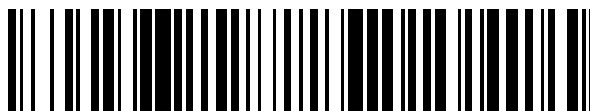


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 705 069**

51 Int. Cl.:

A61K 31/721 (2006.01)

A61P 9/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.06.2015** **PCT/SE2015/050677**

87 Fecha y número de publicación internacional: **17.12.2015** **WO15190989**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.06.2015** **E 15806705 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.10.2018** **EP 3154551**

54 Título: **Uso de sulfato de dextrano que tiene un peso molecular promedio inferior a 10000 da para inducir angiogénesis en un sujeto**

30 Prioridad:

12.06.2014 SE 1450729

22.09.2014 SE 1451120

15.12.2014 SE 1451540

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

21.03.2019

73 Titular/es:

TX MEDIC AB (100.0%)

Box 81

263 03 Viken, SE

72 Inventor/es:

WAAS, ANDERS;

BRUCE, LARS y

BRUCE, ADAM

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 705 069 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

Uso de sulfato de dextrano que tiene un peso molecular promedio inferior a 10000 da para inducir angiogénesis en un sujeto

5

CAMPO TÉCNICO

Las presentes realizaciones se refieren, en general, a angiogénesis y, en particular, al uso de sulfato de dextrano para inducir angiogénesis en un tejido u órgano isquémico en un sujeto.

10

ANTECEDENTES

La angiogénesis es el proceso fisiológico a través del cual se forman vasos sanguíneos nuevos a partir de vasos preexistentes. Esto es distinto de la vasculogénesis, que es la formación *de novo* de células endoteliales a partir de precursores de células mesodérmicas. Los primeros vasos del embrión en desarrollo se forman por vasculogénesis, después de lo cual la angiogénesis es responsable de la mayor parte, si no de todo, el crecimiento de los vasos sanguíneos durante el desarrollo y en la enfermedad.

15

La angiogénesis es un proceso normal y vital en el crecimiento y desarrollo, así como en la cicatrización de heridas y en la formación de tejido de granulación.

20

La angiogénesis se clasifica tradicionalmente como angiogénesis por brote o intususcepción, o angiogénesis por partición. La angiogénesis por brote forma vasos sanguíneos completamente nuevos, mientras que la angiogénesis por partición divide un vaso sanguíneo existente en dos.

25

La angiogénesis puede ser un objetivo para combatir enfermedades caracterizadas por una mala vascularización o una vasculatura anormal. La ausencia de vasos sanguíneos en un tejido reparador o metabólicamente activo puede inhibir la reparación u otras funciones esenciales. Varias enfermedades, tales como las heridas crónicas isquémicas, son el resultado de una falla o de una formación insuficiente de vasos sanguíneos y pueden ser tratadas por una expansión local de los vasos sanguíneos, trayendo así nuevos nutrientes al sitio, lo que la reparación.

30

La aplicación clínica moderna del principio de la angiogénesis puede dividirse en dos áreas principales: terapias antiangiogénicas y terapias proangiogénicas. Mientras que las terapias antiangiogénicas se emplean para tratar o prevenir cáncer y neoplasias malignas, que requieren una abundancia de oxígeno y nutrientes para proliferar, las terapias proangiogénicas se están explorando como opciones para tratar, por ejemplo, enfermedades cardiovasculares, enfermedad de las arterias coronarias, enfermedades arteriales ateroscleróticas, enfermedad coronaria, enfermedad de las arterias periféricas, trastornos de cicatrización de heridas, etc.

35

Los enfoques tradicionales en el tratamiento proangiogénico incluyen, entre otros, terapia génica, dirigida a los genes de interés para la amplificación o inhibición; terapia de proteínas, que manipula principalmente los factores de crecimiento angiogénico; y terapias basadas en células, que implican la implantación de tipos específicos de células.

40

Todavía existen serios problemas sin resolver relacionados con la terapia génica. Las dificultades incluyen la integración efectiva de los genes terapéuticos en el genoma de las células diana, la reducción del riesgo de una respuesta inmunitaria no deseada, la toxicidad potencial, la inmunogenicidad, las respuestas inflamatorias y la oncogénesis relacionadas con los vectores virales utilizados en la implantación de genes y la pura complejidad de la base genética de angiogénesis.

45

La terapia de proteínas proangiogénica utiliza diversos factores de crecimiento, tales como el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) y factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), para promover la angiogénesis. Un obstáculo de la terapia de proteínas es el modo de administración. Las vías de administración de proteínas orales, intravenosas, intraarteriales o intramusculares no siempre son tan eficaces, ya que la proteína terapéutica puede ser metabolizada o eliminada antes de que pueda entrar en el tejido diana. Las terapias proangiogénicas basadas en células todavía se encuentran en las primeras etapas de investigación, con muchas preguntas abiertas con respecto a los mejores tipos de células y dosis a utilizar.

50

La isquemia es una restricción en el suministro de sangre a los tejidos, que provoca una escasez de oxígeno y glucosa necesarios para el metabolismo celular. La isquemia generalmente es causada por problemas con los

60

vasos sanguíneos, con el consiguiente daño o disfunción del tejido. También significa anemia e hipoxia local en una parte determinada del cuerpo, a veces como resultado de la congestión, tal como vasoconstricción, trombosis o embolia.

5 La restauración del flujo sanguíneo coronario después de un período de isquemia prolongada a menudo implica la llamada lesión por reperfusión que causa daño endotelial y un endotelio afectado que asume un fenotipo procoagulante y proinflamatorio. La reperfusión acelera enormemente la activación y deposición del complemento inducida por la isquemia.

10 El sulfato de dextrano es un inhibidor del complemento conocido y, por lo tanto, ha sido propuesto para lograr citoprotección de endotelio contra la lesión por reperfusión después de la isquemia.

Experimental Cell Research 215, 294-302 (1994) describe que se pueden utilizar polisacáridos sulfatados, tales como heparina y sulfato de dextrano, *in vitro* para formación de tubos vasculares inducida por colágeno. Sin embargo, los datos experimentales *in vivo* indicaron que la heparina polisacárido sulfatada de bajo peso molecular (2,4 kDa) inhibió la angiogénesis, Glycobiology 3, 567-573 (1993), Pathophysiology of Haemostasis and Thrombosis 23, 141-149 (1993).

La patente estadounidense n.º 5.135.920 describe que el sulfato de dextrano con un peso molecular promedio de 20 500 000 Da es angiostático, es decir, inhibe la angiogénesis.

Todavía hay lugar para mejoras dentro del campo de la angiogénesis en la técnica.

RESUMEN

25

Un objetivo general es inducir la angiogénesis en un tejido u órgano isquémico en un sujeto.

Otro objetivo es aumentar el flujo sanguíneo en un sujeto que sufre isquemia.

30 Estos y otros objetivos se logran a través de las realizaciones según se describen en la presente.

Un aspecto de las realizaciones se refiere a sulfato de dextrano, o un derivado farmacéuticamente aceptable de este, que tiene un peso molecular promedio inferior a 10 000 Da para inducir la angiogénesis en un sujeto. Otro aspecto de las realizaciones se refiere a un procedimiento para inducir la angiogénesis en un sujeto. El 35 procedimiento comprende administrar al sujeto sulfato de dextrano, o un derivado farmacéuticamente aceptable de este, que tiene un peso molecular promedio inferior a 10 000 Da.

Un aspecto adicional de las realizaciones se refiere al uso de sulfato de dextrano, o un derivado farmacéuticamente aceptable de este, que tiene un peso molecular promedio inferior a 10 000 Da para la fabricación de un 40 medicamento para inducir la angiogénesis en un sujeto.

Aun otro aspecto de las realizaciones se refiere a sulfato de dextrano, o un derivado farmacéuticamente aceptable de este, que tiene un peso molecular promedio inferior a 10 000 Da para aumentar el flujo sanguíneo en un sujeto que sufre isquemia.

45

Un aspecto adicional de las realizaciones se refiere a un procedimiento para aumentar el flujo sanguíneo en un sujeto que sufre isquemia. El procedimiento comprende administrar a dicho sujeto sulfato de dextrano, o un derivado farmacéuticamente aceptable de este, que tiene un peso molecular promedio inferior a 10 000 Da.

50 Aun otro aspecto de las realizaciones se refiere al uso de sulfato de dextrano, o un derivado farmacéuticamente aceptable de este, que tiene un peso molecular promedio inferior a 10 000 Da para la fabricación de un medicamento para aumentar el flujo sanguíneo en un sujeto que sufre isquemia.

Aun otro aspecto de las realizaciones se refiere a sulfato de dextrano, o un derivado farmacéuticamente aceptable de este, que tiene un peso molecular promedio inferior a 10 000 Da para vascularizar el tejido isquémico en un 55 sujeto.

Un aspecto adicional de las realizaciones se refiere a un procedimiento para vascularizar el tejido isquémico en un sujeto. El procedimiento comprende administrar a dicho sujeto sulfato de dextrano, o un derivado 60 farmacéuticamente aceptable de este, que tiene un peso molecular promedio inferior a 10 000 Da.

Aun otro aspecto de las realizaciones se refiere al uso de sulfato de dextrano, o un derivado farmacéuticamente aceptable de este, que tiene un peso molecular promedio inferior a 10 000 Da para la fabricación de un medicamento para vascularizar el tejido isquémico en un sujeto.

5

Un aspecto adicional de las realizaciones se refiere a sulfato de dextrano, o un derivado farmacéuticamente aceptable de este, que tiene un peso molecular promedio igual o inferior a 10 000 Da para su uso *in vitro* o *ex vivo* en la inducción de angiogénesis en un órgano y/o tejido vascularizado, para su uso *in vitro* o *ex vivo* en el aumento del flujo sanguíneo en un tejido y/u órgano vascularizado, y/o para la vascularización *in vitro* o *ex vivo* de un tejido y/u órgano vascularizado, y procedimientos relacionados para ello.

10

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Las realizaciones, junto con otros objetivos y ventajas de estas, pueden entenderse mejor haciendo referencia a la siguiente descripción tomada junto con los dibujos adjuntos, en los cuales:

15

La figura 1 es un diagrama que ilustra el peso corporal medio en todo el modelo de isquemia crítica de las extremidades de ratón. ANOVA de dos vías seguido de comparaciones post-hoc de Bonferroni no revelaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.

20

La figura 2 es un diagrama que ilustra el flujo sanguíneo medio por grupo de estudio en todo el modelo de isquemia crítica de las extremidades de ratón. Se realizó ANOVA de dos vías para mediciones repetidas, seguido de prueba post-hoc de Bonferroni. La comparación de los grupos tratados con sulfato de dextrano 2M, 3M y 4M con el grupo de control 1M reveló diferencias estadísticamente significativas desde los días 14 y 21 hasta el día 35 ($p < 0,001$).

25

La figura 3 es un diagrama que ilustra la densidad de capilares CD34 de los grupos a través del estudio de isquemia crítica de las extremidades, después de tinción doble con dextrano etiquetado con FITC (DA). Las barras de DA representan capilares funcionales. El análisis estadístico se realizó utilizando ANOVA de dos vías seguido de comparaciones múltiples de Bonferroni.

30

La figura 4 es un diagrama que compara la densidad de capilares CD34 de las extremidades isquémicas y no isquémicas en los grupos a través del estudio de isquemia crítica de las extremidades, después de tinción doble con dextrano etiquetado con FITC (DA). Las barras de DA representan capilares funcionales. El análisis estadístico se realizó utilizando ANOVA de dos vías seguido de comparaciones múltiples de Bonferroni.

35

Las figuras 5A-5C ilustran la densidad de los capilares CD34 de los grupos en el estudio de isquemia crítica de las extremidades (figura 5A - ratón del grupo control de vehículo 1M; figura 5B - ratón del grupo sulfato de dextrano 3M 30 mg/kg repetido; figura 5C - ratón del grupo sulfato de dextrano 4M 30 mg/kg único). Los diagramas de la izquierda ilustran tinción de CD34 y los diagramas de la derecha ilustran tinción de dextrano etiquetado con FITC.

40

La figura 6 es un diagrama que ilustra la puntuación de la función de las extremidades en animales lesionados con HLI tratados con sulfato de dextrano. En el día 0, se indujo HLI mediante ligación y escisión de la arteria femoral. El tratamiento comenzó en el día 8 con vehículo, o 10 o 30 mg/kg de sulfato de dextrano, una vez a la semana (1x/sem) o 3 veces por semana (3x/sem). A la puntuación de las extremidades se le asignó los grados 0-3, donde 3 es el peor (arrastre de pies). El sulfato de dextrano indujo una mejora significativa desde el día 21 en adelante (análisis en los días 7, 14, 21, 28 y 35), calculada mediante ANOVA de dos vías.

45

La figura 7 es un diagrama que ilustra la densidad de capilares de los grupos en el estudio de isquemia crítica de las extremidades de la actina de músculo liso (SMA) de marcador endotelial. Significancia estadística de acuerdo con ANOVA de dos vías seguido de comparaciones múltiples de Bonferroni.

50

La figura 8 compara el flujo sanguíneo medido en dos ratones con imágenes de láser Doppler sin contacto 35 días después de la ligación de la arteria femoral de la extremidad posterior izquierda. La panel inferior se trató con vehículo (grupo 1M), el panel superior recibió tratamiento con sulfato de dextrano (grupo 3M).

La figura 9 ilustra la distribución del peso corporal en los grupos utilizados para el estudio de índice de apoplejía tMCAO.

55

La figura 10 ilustra Neuroscore por grupo de tratamiento en todo el estudio de índice de apoplejía tMCAO.

La figura 11 ilustra la prueba de paso por grupo de tratamiento en todo el estudio de índice de apoplejía tMCAO.

La figura 12 ilustra la prueba de colocación de extremidades superiores por grupo de tratamiento en todo el estudio de índice de apoplejía tMCAO.

La figura 13 ilustra el estudio de balanceo del cuerpo delta (giro a la izquierda-giro a la derecha) por grupo de tratamiento en todo el estudio de índice de apoplejía tMCAO.

60

La figura 14 ilustra la proporción de flujo sanguíneo cerebral y el cambio porcentual de diámetro promedio

de los vasos en ambos grupos de sulfato de dextrano en comparación con el control de vehículo el día 29.
La figura 15 ilustra la densidad capilar de SMA en ratas tratadas con 15 mg/kg de sulfato de dextrano diariamente en comparación con el control de vehículo el día 30.

La figura 16 ilustra el área GFAP (área de células positivas en micrones cuadrados por campo $\times 10$) en grupo tratado con sulfato de dextrano contra el grupo de vehículo de control el día 30.

Las figuras 17A y 17B ilustran el efecto del tratamiento en la densidad de capilares para una rata del grupo de control de vehículo (figura 17A) y del grupo de sulfato de dextrano (15 mg/kg, diariamente) (figura 17B).

La figura 18 ilustra el tamaño del infarto 35 días después de la inducción de MI.

La figura 19 compara la tinción de SMA 35 días después de la inducción de MI para el tratamiento con sulfato de dextrano (15 mg/kg 3 veces/semana durante 3 semanas) y el grupo de control de vehículo.

Las figuras 20A-20C ilustran la tinción de SMA para la densidad vascular para dos ratas tratadas con sulfato de dextrano (15 mg/kg 3 veces/semana durante 3 semanas) (figuras 20A, 20B) y una rata de control de vehículo (figura 20C).

La figura 21 ilustra el flujo sanguíneo medio en un modelo de HLI de rata.

La figura 22 ilustra las puntuaciones de extremidades en un modelo de HLI de rata.

La figura 23 ilustra la densidad capilar de SMA y el factor 8 en una pierna lesionada con HLI.

La figura 24 ilustra puntuación de capilares de angiografía en una pierna lesionada con HLI.

Las figuras 25A-25D ilustran imágenes de capilares de angiografía del animal de control de vehículo (figura 25A) y animales en los grupos de tratamiento 2M, 3M y 4M (figuras 25B-25D).

Todas las figuras muestran el promedio + error estándar de la media

DESCRIPCIÓN DETALLADA

Las presentes realizaciones se refieren, en general, a angiogénesis y, en particular, al uso de sulfato de dextrano para inducir angiogénesis en un sujeto.

Las presentes realizaciones se basan en el descubrimiento de que el sulfato de dextrano dentro de un peso molecular promedio particular tiene un efecto de inducción de angiogénesis y un efecto de aumento de flujo sanguíneo cuando se administra a un sujeto, preferentemente un sujeto mamífero y más preferentemente un sujeto humano.

Este efecto del sulfato de dextrano de las realizaciones fue altamente sorprendente a la luz de la técnica anterior que describe que los polisacáridos sulfatados inhiben la angiogénesis *in vivo* y que el sulfato de dextrano con un peso molecular promedio de 500 000 Da es angiostático, es decir, inhibe la angiogénesis.

Los datos experimentales que se presentan en la presente en claro contraste muestran que el sulfato de dextrano de las realizaciones tiene efectos *in vivo* en la inducción de angiogénesis como se observa al aumentar significativamente el flujo sanguíneo medio, disminuir la gravedad de la isquemia, aumentar la densidad capilar en un modelo de isquemia y en un modelo de apoplejía, y reducir el tamaño del infarto en un modelo de infarto de miocardio (MI). Además, el sulfato de dextrano de las realizaciones es capaz de formar selectivamente vasos sanguíneos en el tejido isquémico, sin provocar ninguna formación significativa de vasos en el tejido no isquémico.

Por consiguiente, un aspecto de las realizaciones se refiere a sulfato de dextrano, o un derivado farmacéuticamente aceptable de este, que tiene un peso molecular promedio inferior a 10 000 para su uso en la inducción de la angiogénesis en un sujeto.

En lo siguiente, la referencia al peso molecular (promedio) y al contenido de azufre del sulfato de dextrano aplica también a cualquier derivado farmacéuticamente aceptable de sulfato de dextrano. Por ende, el derivado farmacéuticamente aceptable de sulfato de dextrano preferentemente tiene el peso molecular promedio y el contenido de azufre como se describe en las siguientes realizaciones.

Se cree que el sulfato de dextrano fuera del intervalo de las realizaciones tiene efecto de angiogénesis inferior o incluso no tiene en absoluto. De hecho, por ejemplo, heparina, otro polisacárido sulfatado, con un peso molecular promedio de 2,4 kDa inhibió la angiogénesis tanto como lo hicieron las moléculas de sulfato de dextrano más grandes (Pathophysiology of Haemostasis y Thrombosis 23, 141-149 (1993);patente estadounidense n.º 5.135.920).

Además, el sulfato de dextrano de un peso molecular que supera 10 000 Da, en general, tiene un efecto menor contra el perfil de efectos secundarios en comparación con el sulfato de dextrano que tiene un peso molecular promedio inferior. Esto significa que la dosis máxima de sulfato de dextrano que se puede administrar de forma

segura a un sujeto es inferior para moléculas de sulfato de dextrano más grandes (>10 000 Da) en comparación con moléculas de sulfato de dextrano que tienen un peso molecular promedio dentro del presente intervalo. Como consecuencia, dichas moléculas de sulfato de dextrano más grandes son menos adecuadas en usos clínicos cuando el sulfato de dextrano es para ser administrado a sujetos *in vivo*. Además, las moléculas de sulfato de dextrano grandes tienen, de hecho, el efecto opuesto en comparación con el sulfato de dextrano de las realizaciones, tal como se demuestra en la patente estadounidense n.º 5.135.920.

Por ende, parece haber un intervalo muy estrecho con respecto al peso molecular promedio del sulfato de dextrano dentro del cual el sulfato de dextrano tiene efecto de angiogénesis cuando se administra a un sujeto y las moléculas de sulfato de dextrano fuera del intervalo de las realizaciones no tienen efecto de inhibición de la angiogénesis.

El sulfato de dextrano es un polisacárido sulfatado y, en particular, un glucano sulfatado, es decir, polisacárido hecho de muchas moléculas de glucosa. El peso molecular promedio como se define en la presente indica que los polisacáridos sulfatados individuales pueden tener un peso molecular diferente de su peso molecular promedio, pero que el peso molecular promedio representa el peso molecular medio de los polisacáridos sulfatados. Esto además implica que habrá una distribución natural de los pesos moleculares alrededor de este peso molecular promedio para una muestra de sulfato de dextrano.

El peso molecular promedio (M_w) de sulfato de dextrano se determina, normalmente, utilizando procedimientos indirectos, tales como cromatografía de exclusión/penetración en gel, dispersión de luz o viscosidad. La determinación del peso molecular promedio utilizando dichos procedimientos indirectos dependerán de la cantidad de factores, incluida la elección de la columna y el eluyente, la velocidad de flujo, los procedimientos de calibración, etc.

25 Peso molecular promedio

$$(M_w): \frac{\sum M_i^2 N_i}{\sum M_i N_i},$$

30 típico para procedimientos sensibles al tamaño molecular en lugar del valor numérico, p. ej., procedimientos de cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) y dispersión de luz. Si se asume una distribución normal, un mismo peso en cada lado de M_w , es decir, el peso total de las moléculas de sulfato de dextrano en la muestra que tiene un peso molecular inferior a M_w es igual al peso total de las moléculas de sulfato de dextrano en la muestra que tiene un peso total superior a M_w .

35 En una realización, el sulfato de dextrano o el derivado farmacéuticamente aceptable de este tiene un peso molecular promedio dentro de un intervalo de entre 2 000 y 10 000 Da. En una realización, el peso molecular promedio se encuentra dentro de un intervalo de entre 2 500 y 10 000 Da. En una realización preferida particular, el peso molecular promedio se encuentra dentro de un intervalo de entre 3 000 y 10 000 Da.

40 En una realización opcional pero preferida, menos del 40 % de las moléculas de sulfato de dextrano tienen un peso molecular inferior a 3 000 Da, preferentemente menos del 35 %, tal como menos del 30 % o menos del 25 % de las moléculas de sulfato de dextrano tienen un peso molecular inferior a 3 000 Da. Además, o alternativamente, menos del 20 % de las moléculas de sulfato de dextrano tienen un peso molecular superior a 10 000 Da, preferentemente menos del 15 %, tal como menos del 10 % o menos del 5 % de las moléculas de sulfato de dextrano tienen un peso molecular superior a 10 000 Da. Por ende, en una realización particular, el sulfato de dextrano tiene una distribución de peso molecular sustancialmente estrecho alrededor del peso molecular promedio.

50 En una realización particular, el peso molecular promedio de sulfato de dextrano, o el derivado farmacéuticamente aceptable de este, se encuentra dentro de un intervalo de entre 3 500 y 9 500 Da, tal como dentro de un intervalo de entre 3 500 y 8 000 Da.

En otra realización particular, el peso molecular promedio de sulfato de dextrano, o el derivado farmacéuticamente aceptable, se encuentra dentro de un intervalo de entre 4 500 y 7 500 Da.

55 En otra realización particular, el peso molecular promedio de sulfato de dextrano, o el derivado farmacéuticamente aceptable, se encuentra dentro de un intervalo de entre 4 500 y 5 500 Da.

Por ende, en una realización actualmente preferida, el peso molecular promedio de sulfato de dextrano, o el derivado farmacéuticamente aceptable de este, es preferentemente de aproximadamente 5 000 Da o al menos

sustancialmente cerca de 5 000 Da, tal como $5\,000 \pm 500$ Da, por ejemplo, $5\,000 \pm 400$ Da, preferentemente $5\,000 \pm 300$ Da o $5\,000 \pm 200$ Da, tal como $5\,000 \pm 100$ Da. Por ende, en una realización, el peso molecular promedio de sulfato de dextrano, o el derivado farmacéuticamente aceptable de este, es de 4,5 kDa, 4,6 kDa, 4,7 kDa, 4,8 kDa, 4,9 kDa, 5,0 kDa, 5,1 kDa, 5,2 kDa, 5,3 kDa, 5,4 kDa o 5,5 kDa.

5

En una realización particular, el peso molecular promedio de sulfato de dextrano, o el derivado farmacéuticamente de este, como se presentó anteriormente es M_w promedio, y se determina preferentemente mediante cromatografía de exclusión/penetración en gel, cromatografía de exclusión por tamaño, dispersión de luz o procedimientos basados en viscosidad.

- 10 En una realización particular, el sulfato de dextrano, o el derivado farmacéuticamente aceptable de este, consiste, en promedio, en aproximadamente o ligeramente superior a 5 unidades de glucosa y tiene un número de sulfato promedio por unidad de glucosa de al menos 2,0, tal como de al menos 2,5.

- 15 El sulfato de dextrano es un derivado polianiónico de dextrano y contiene azufre. El contenido de azufre promedio para sulfato de dextrano de las realizaciones es preferentemente de entre el 15 y el 20 % y más preferentemente de aproximadamente el 17 %, correspondiente, en general, a aproximadamente dos grupos de sulfato por residuo de glucosilo. En una realización particular, el contenido de azufre del sulfato de dextrano es preferentemente igual o al menos cercano al grado posible máximo de contenido de azufre de las moléculas de dextrano.

- 20 En una realización particular, el sulfato de dextrano de las realizaciones tiene un peso molecular promedio en número (M_n), según lo medido mediante espectroscopía de resonancia magnética nuclear (NMR), dentro de un intervalo de entre 1850 y 2000 Da.

- 25 En otra realización particular, el sulfato de dextrano de las realizaciones tiene en promedio 5,1 unidades de glucosa y un número de sulfato promedio por unidad de glucosa de entre 2,6 y 2,7, lo que normalmente conlleva un peso molecular promedio en número (M_n), según lo medido mediante espectroscopía de resonancia magnética nuclear (NMR), dentro de un intervalo de entre 1850 y 2000 Da.

Peso molecular promedio en número

30

$$(M_n): \frac{\sum M_i N_i}{\sum N_i},$$

- 35 normalmente derivado mediante ensayos de grupo extremo, p. ej., cromatografía o espectroscopía de NMR. Si se asume una distribución normal, se puede encontrar un mismo número de moléculas de sulfato de dextrano en cada lado de M_n , es decir, el número de moléculas de sulfato de dextrano en la muestra que tiene un peso molecular inferior a M_n es igual al número de moléculas de sulfato de dextrano en la muestra que tiene un peso molecular superior a M_n .

- 40 El sulfato de dextrano de acuerdo con las realizaciones puede proporcionarse como un derivado farmacéuticamente aceptable de sulfato de dextrano. Dichos derivados farmacéuticamente aceptables incluyen sales y solvatos de sulfato de dextrano, p. ej., una sal de sodio o potasio.

- 45 El sulfato de dextrano, o el derivado farmacéuticamente aceptable de este, de las realizaciones se administra preferentemente por inyección al sujeto y, en particular, por inyección intravenosa (i. v.), inyección subcutánea (s. c.) o inyección intraperitoneal (i. p.), preferentemente inyección i. v. o s. c. Otras vías de administración parenteral que pueden utilizarse incluyen inyección intramuscular e intraarticular. La inyección de sulfato de dextrano, o el derivado farmacéuticamente aceptable de este, se podría realizar alternativamente, o además, directamente, por ejemplo, en un tejido u órgano isquémico u otro lugar en el cuerpo del sujeto, en el cual se llevará a cabo la
50 angiogénesis y el aumento del flujo sanguíneo.

- El sulfato de dextrano, o el derivado farmacéuticamente aceptable de este, de las realizaciones se formula preferentemente como una solución de inyección acuosa con un disolvente o excipiente seleccionado. El disolvente es ventajosamente un disolvente acuoso y, en particular, una solución amortiguadora. Un ejemplo no taxativo de
55 una solución amortiguadora tal es un tampón de ácido cítrico, tal como tampón de monohidrato de ácido cítrico (CAM), o un tampón de fosfato. Por ejemplo, el sulfato de dextrano de las realizaciones puede disolverse en solución salina, tal como solución salina de NaCl al 0,9 % y luego, opcionalmente, puede tamponarse con CAM 75 mM, ajustando el pH a aproximadamente 5,9 utilizando hidróxido de sodio. También son posibles soluciones no amortiguadas, incluidas soluciones de inyección acuosas, tal como solución salina, es decir, NaCl (ac.). Además, se
60 pueden utilizar otros sistemas amortiguadores diferentes de CAM si se desea una solución tamponada.

Las realizaciones no se limitan a inyecciones y se pueden utilizar otras vías de administración de forma alternativa, incluidas vía oral, nasal, bucal, rectal, dérmica, traqueal, bronquial o tópica. El principio activo, sulfato de dextrano, luego se formula con un excipiente o vehículo adecuado que se selecciona en función de la vía de administración particular.

Los intervalos de dosis adecuados para el sulfato de dextrano de las realizaciones puede variar de acuerdo con el tamaño y el peso del sujeto, la afección por la cual se trata al sujeto y otras consideraciones. En particular para sujetos humanos, un intervalo de dosificación posible puede ser entre 1 µg/kg y 150 mg/kg de peso corporal, preferentemente entre 10 µg/kg y 100 mg/kg de peso corporal.

En realizaciones preferidas, el sulfato de dextrano, o el derivado farmacéuticamente aceptable de este, se formula para ser administrado en una dosificación en un intervalo entre 0,05 y 50 mg/kg de peso corporal del sujeto, preferentemente entre 0,05 o 0,1 y 40 mg/kg de peso corporal del sujeto, y más preferentemente entre 0,05 o 0,1 y 30 mg/kg, o entre 0,1 y 25 mg/kg, o entre 0,1 y 15 mg/kg, o entre 0,1 y 10 mg/kg de peso corporal del sujeto. La administración de sulfato de dextrano, o el derivado farmacéuticamente aceptable de este, de las realizaciones se inicia preferentemente lo antes posible después de la lesión u otra afección que provoca la isquemia, apoplejía o una enfermedad cardiovascular en el sujeto o que provoca una afección médica que se podría tratar o al menos aliviar mediante inducción de la angiogénesis desencadenada por la administración de sulfato de dextrano, o el derivado farmacéuticamente aceptable de este.

La administración de sulfato de dextrano, o el derivado farmacéuticamente aceptable de este, no tiene que estar necesariamente limitada al tratamiento de una afección médica presente sino que, alternativamente, o adicionalmente, puede ser utilizada para profilaxis. En otras palabras, el sulfato de dextrano de las realizaciones se puede administrar a un sujeto que se va a someter a un procedimiento médico, como una cirugía, que puede provocar isquemia local u otro efecto médico que se puede tratar, inhibir o aliviar mediante la inducción de la angiogénesis y/o aumento del flujo sanguíneo.

El sulfato de dextrano de las realizaciones puede administrarse en una sola ocasión de administración, tal como en forma de una inyección de bolo única. La dosis de bolo puede inyectarse con bastante rapidez al paciente pero se infunde ventajosamente con el tiempo, de modo que la solución de sulfato de dextrano se infunde al paciente en unos pocos minutos de tiempo, tal como durante 5 a 10 minutos.

Alternativamente, el sulfato de dextrano de la realización puede administrarse en múltiples, es decir, al menos dos, ocasiones, durante un período de tratamiento. La duración de dicho período de tratamiento está relacionada típicamente con el período endógeno de la cicatrización de una herida en los diferentes tipos y el tipo de lesión. Para obtener más información sobre los períodos de tratamiento adecuados, se puede consultar Capítulo 1 Overview of Wound Healing in Different Tissue Types, páginas 3-40 de Indwelling Neural Implants: Strategies for Contending with the In Vivo Environment, ed. William M. Reichert, 2008 de Taylor & Francis Group, LLC (ISBN: 978-0-8493-9362-4).

Por ende, el sulfato de dextrano de las realizaciones se puede administrar una o varias veces al día, una o varias veces a la semana, una o varias veces al mes como ejemplos ilustrativos.

En general, para enfermedades agudas, por ejemplo que provocan isquemia aguda, por ejemplo, en la apoplejía, infarto de miocardio (MI), trasplante de células y órganos, la duración del período de tratamiento puede ser una sola administración, pero preferentemente es en forma de varias administraciones durante un período de tratamiento de, por ejemplo, una semana, algunas semanas o un mes. Los períodos de tratamiento más largos, de hasta tres meses o incluso un año, pueden mejorar aún más la curación y la recuperación.

Para las afecciones isquémicas de tipo intermitente, puede existir la opción de utilizar el tratamiento como profilaxis (prevención) o tratamiento directamente después de la exacerbación de la enfermedad. Este tipo de protocolo de administración podría ser adecuado para enfermedades como la esclerosis múltiple (MS), la esclerosis lateral amiotrófica (ALS) y la enfermedad de células falciformes. Los períodos de tratamiento pueden ser de hasta 1-3 meses para el tratamiento después de la exacerbación. Para la profilaxis de la enfermedad, se pueden utilizar opcionalmente períodos de tratamiento más largos.

La inducción de la angiogénesis en un sujeto mediante la administración de sulfato de dextrano, o el derivado farmacéuticamente aceptable de este, de las realizaciones se produce preferentemente en un sujeto humano que sufre una enfermedad, trastorno o afección médica que provoca isquemia en el cuerpo del sujeto humano.

La isquemia es una restricción en el suministro de sangre a los tejidos, que provoca una escasez de oxígeno y glucosa necesarios para el metabolismo celular. La isquemia generalmente es causada por problemas con los vasos sanguíneos, con el consiguiente daño o disfunción del tejido u órgano. También significa anemia e hipoxia local en una parte determinada del cuerpo, a veces como resultado de la congestión, tal como vasoconstricción, 5 trombosis o embolia.

Un tratamiento efectivo de la isquemia o un enfoque efectivo para prevenir o al menos reducir el riesgo de sufrir isquemia es inducir la angiogénesis. La angiogénesis provoca un aumento del flujo sanguíneo en el tejido pertinente y, por lo tanto, puede contrarrestar cualquier restricción en el suministro de sangre al tejido provocada por la 10 enfermedad, trastorno o afección médica.

Algunos ejemplos no exhaustivos sino ilustrativos de enfermedades, trastornos o afecciones médicas que pueden provocar isquemia incluyen cicatrización de heridas, isquemia periférica, como isquemia posterior al trasplante de órganos, tejidos o células, enfermedad arterial periférica, isquemia de las extremidades, piernas inquietas, síndrome 15 de Raynaud, enfermedad de células falciformes o tromboangiitis obliterante; isquemia coronaria, como la provocada por insuficiencia cardíaca congestiva, infarto de miocardio o enfermedad arterial coronaria; enfermedades isquémicas en niños, como enfermedades perinatales o neonatales, enfermedades infantiles, p. ej. lesión cerebral hipóxica o isquémica neonatal, encefalopatía por asfixia, parálisis cerebral; isquemia en el sistema nervioso central, como la provocada por lesión cerebral traumática, arteritis temporal, hipoxia provocada por 20 esclerosis múltiple, apoplejía, esclerosis lateral amiotrófica; o enfermedad distrófica muscular; isquemia provocada por lesiones trombóticas, hemorrágicas o traumáticas.

La cicatrización de heridas generalmente implica cuatro fases, que normalmente se denominan fase temprana, fase inflamatoria, fase proliferativa y fase de maduración y remodelación. La angiogénesis es uno de los procesos que se 25 producen durante la fase proliferativa. La administración de sulfato de dextrano, o el derivado farmacéuticamente aceptable de este, puede favorecer el efecto de la angiogénesis que tiene lugar como uno de los subprocesos de la cicatrización de heridas. El proceso de la angiogénesis se produce simultáneamente con la proliferación de fibroblastos durante la cicatrización de heridas, cuando las células endoteliales migran a la zona de la herida. Como la actividad de los fibroblastos y las células epiteliales requiere oxígeno y nutrientes, la angiogénesis es 30 imprescindible para otras etapas de la cicatrización de heridas, como la migración epidérmica y de fibroblastos.

La isquemia periférica generalmente denota estados isquémicos que tienen lugar en tejidos y órganos diferentes del corazón (isquemia coronaria) y del sistema nervioso central (isquemia del SNC). Puede haber diversas causas de isquemia periférica. Un ejemplo típico es el trasplante de órganos o tejidos a un sujeto. El órgano o tejido 35 trasplantado se suele exponer a la isquemia durante el proceso inicial de injerto que tiene lugar desde el momento del trasplante hasta que se forman nuevos vasos sanguíneos alrededor del órgano o tejido trasplantado. Existe un alto riesgo de daño o disfunción del órgano o tejido debido a la isquemia y la hipoxia si no se establece un suministro suficiente de sangre poco después del trasplante. Por lo tanto, la inducción de la angiogénesis por el sulfato de dextrano, o el derivado farmacéuticamente aceptable de este, de acuerdo con las realizaciones referidas 40 al trasplante, puede reducir significativamente el riesgo de daño o disfunción del órgano o tejido trasplantado debido a isquemia y/o hipoxia. La administración del sulfato de dextrano, o el derivado farmacéuticamente aceptable de este, de acuerdo con las realizaciones se puede producir antes del trasplante para inducir la angiogénesis y proporcionar un aumento del flujo sanguíneo en el sitio de trasplante antes del evento de trasplante real. En tal caso, el aumento del flujo sanguíneo inducido por el sulfato de dextrano de las realizaciones puede ser suficiente 45 para prevenir o al menos reducir los daños isquémicos al órgano o tejido trasplantado.

La enfermedad vascular periférica (PVD), comúnmente conocida como enfermedad arterial periférica (PAD) o enfermedad oclusiva de las arterias periféricas (PAOD) o arteriopatía ocluyente periférica, se refiere a la obstrucción de arterias grandes que no están dentro de la arteria coronaria, la vasculatura del arco aórtico o el 50 cerebro. La PVD puede ser el resultado de la aterosclerosis, procesos inflamatorios que producen estenosis, embolia o formación de trombos. Provoca isquemia aguda o crónica. Un tratamiento eficiente de la PVD es restaurar el flujo sanguíneo mediante la administración de sulfato de dextrano, o el derivado farmacéuticamente aceptable de este, de acuerdo con las realizaciones.

La isquemia de las extremidades, que a menudo se conoce como isquemia aguda de las extremidades, se produce cuando hay una falta repentina de flujo sanguíneo a una extremidad. La isquemia aguda de las extremidades se debe típicamente a una embolia o a una trombosis. La trombosis suele ser provocada por enfermedad vascular periférica (enfermedad aterosclerótica que conduce a la obstrucción de los vasos sanguíneos), mientras que una embolia puede deberse al aire, traumatismo, grasa, líquido amniótico o un tumor. Los sujetos que sufren de 60 isquemia de las extremidades se beneficiarían de la administración de sulfato de dextrano, o del derivado

farmacéuticamente aceptable de este, de las realizaciones.

En medicina, el fenómeno de Raynaud es la reducción excesiva del flujo sanguíneo en respuesta al frío o al estrés emocional, lo que provoca la decoloración de los dedos de las manos y de los pies y, ocasionalmente, de otras áreas. El fenómeno de Raynaud por sí mismo es solo un signo (hipoperfusión) acompañado por un síntoma. Cuando se relaciona con la patogénesis, puede formar parte de la enfermedad de Raynaud (también conocida como fenómeno de Raynaud primario), cuya causa se desconoce, o parte del síndrome de Raynaud (fenómeno de Raynaud secundario), que es un síndrome provocado por una enfermedad primaria conocida, más comúnmente trastornos del tejido conectivo como el lupus eritematoso sistémico. Es una hiperactivación del sistema nervioso simpático que provoca una vasoconstricción extrema de los vasos sanguíneos periféricos, lo que provoca hipoxia tisular. Los casos crónicos y recurrentes del fenómeno de Raynaud pueden provocar atrofia de la piel, los tejidos subcutáneos y los músculos, lo que puede causar úlceras y gangrena isquémica. La administración de sulfato de dextrano, o el derivado farmacéuticamente aceptable de este, de las realizaciones puede ser un medio eficiente para reducir el riesgo de sufrir, tratar o al menos aliviar los síntomas del síndrome de Raynaud o de la enfermedad de Raynaud.

La enfermedad de células falciformes (SCD), o la anemia de células falciformes (SCA) o la drepanocitosis, es un trastorno hereditario de la sangre, caracterizado por la presencia de glóbulos rojos que adoptan una forma anormal, rígida y falciforme. La anemia falciforme disminuye la flexibilidad de los glóbulos rojos y da lugar a un riesgo de flujo de sangre inadecuado a una parte del cuerpo. La inducción de la angiogénesis utilizando sulfato de dextrano, o el derivado farmacéuticamente aceptable de este, de las realizaciones se puede utilizar para reducir el riesgo de desarrollar isquemia periférica en sujetos que sufren SCD.

La tromboangeítis obliterante, también conocida como enfermedad de Buerger o gangrena presenil, es una inflamación progresiva recurrente y trombosis (coagulación) de las arterias y venas pequeñas y medianas de las manos y los pies. Por lo tanto, la tromboangeítis obliterante puede causar isquemia en las manos y los pies debido a la restricción del flujo sanguíneo en estas extremidades. La administración de sulfato de dextrano, o el derivado farmacéuticamente aceptable de este, de las realizaciones puede ser un medio eficiente para aumentar el flujo sanguíneo a las manos y los pies.

La isquemia coronaria es un término médico que se refiere a la falta de sangre suficiente a través de las arterias coronarias. La isquemia coronaria está relacionada con enfermedades cardíacas y ataques cardíacos. También se conoce como isquemia cardíaca. La enfermedad arterial coronaria (CAD) se produce cuando las sustancias grasas se adhieren a las paredes de las arterias coronarias, lo que estrecha las arterias y restringe el flujo sanguíneo. Esto provoca una falta de oxígeno y sangre en el corazón, lo que puede provocar un infarto de miocardio (ataque cardíaco). La CAD provoca estrechamiento de las arterias, lo que provoca una falta de flujo sanguíneo a través de las arterias, así como de oxígeno, un proceso que se denomina aterosclerosis. La aterosclerosis es la causa más común de isquemia coronaria. El aumento del flujo sanguíneo en el músculo cardíaco a través de la inducción de la angiogénesis desencadenada por la administración de sulfato de dextrano, o el derivado farmacéuticamente aceptable de las realizaciones, puede ser importante para reducir el riesgo o reducir el daño provocado por la isquemia coronaria. La trombosis también puede ser causa de isquemia coronaria.

El infarto de miocardio (MI) o el infarto de miocardio agudo (AMI), comúnmente denominado ataque cardíaco, se produce cuando el flujo sanguíneo se detiene en una parte del corazón y provoca daño al músculo cardíaco. La mayoría de los MI se producen debido a la enfermedad arterial coronaria. El mecanismo de un MI suele comprender la ruptura de una placa aterosclerótica, lo que produce un bloqueo completo de una arteria coronaria. La administración del sulfato de dextrano, o el derivado farmacéuticamente aceptable de este, de las realizaciones reduce el tamaño del infarto. Por consiguiente, los daños permanentes a los músculos cardíacos provocados por el MI se pueden reducir significativamente de acuerdo con las realizaciones.

La isquemia en el SNC se puede deber a diversas causas. Por ejemplo, una lesión cerebral traumática puede provocar una obstrucción o restricción del flujo sanguíneo a una parte del cerebro. Dicha restricción en el flujo sanguíneo puede tener consecuencias graves si la hipoxia se produce en el cerebro. El aumento del flujo sanguíneo provocado por la administración de sulfato de dextrano, o el derivado farmacéuticamente aceptable de este, de las realizaciones, se puede utilizar para reducir el riesgo de daños cerebrales permanentes provocados por la isquemia después de una lesión cerebral traumática.

La arteritis temporal, también conocida como arteritis de células gigantes (GCA), arteritis craneal o enfermedad de Horton, es una enfermedad inflamatoria de los vasos sanguíneos que afecta con mayor frecuencia a las arterias grandes y medianas de la cabeza, mayoritariamente las ramas de la arteria carótida externa. Es una forma de

vasculitis. La inducción de la angiogénesis y el aumento del flujo sanguíneo como consecuencia de la administración de sulfato de dextrano, o del derivado farmacéuticamente aceptable de este, de las realizaciones puede ser beneficioso para los sujetos que sufren arteritis temporal.

- 5 La apoplejía, a veces denominada accidente cerebrovascular (CVA), ataque cerebrovascular (CVI) o coloquialmente ataque cerebral, es la pérdida de la función cerebral debido a una alteración en el suministro de sangre al cerebro. Esta alteración se debe a una isquemia o una hemorragia. La isquemia es causada por la obstrucción de un vaso sanguíneo mediante trombosis o embolia arterial, o por hipoperfusión sistémica. La apoplejía hemorrágica es provocada por el sangrado de los vasos sanguíneos del cerebro, ya sea directamente en el parénquima cerebral o
- 10 en el espacio subaracnoideo que rodea el tejido cerebral. Los sujetos que sufren apoplejía se beneficiarían de un tratamiento que aumente el flujo sanguíneo al cerebro para reducir el riesgo de daños causados por un suministro insuficiente de sangre. Como consecuencia, la administración de sulfato de dextrano, o el derivado farmacéuticamente aceptable de este, de las realizaciones se da de forma beneficiosa a los sujetos que sufren una apoplejía.

- 15 Diversos trastornos neurológicos pueden provocar una restricción en el suministro de sangre al SNC, como parte del cerebro. Por ejemplo, *Múltiple Sclerosis International* 2013, 1-6 (2013) describe que las lesiones de esclerosis múltiple (MS) tempranas están asociadas con la hipoxia. Por lo tanto, los sujetos que sufren MS pueden beneficiarse del aumento del flujo sanguíneo para tratar o al menos reducir o inhibir la hipoxia asociada con la MS.

- 20 La esclerosis lateral amiotrófica (ALS), también denominada enfermedad de la neurona motora (MND) y enfermedad de Lou Gehrig, es una enfermedad neurodegenerativa con diversas causas. Se caracteriza por una debilidad que avanza rápidamente debido a la atrofia muscular y la espasticidad muscular, la dificultad para hablar (disartria), para tragar (disfagia) y para respirar (disnea). Los experimentos han demostrado que la ALS está
- 25 asociada con una reducción del flujo sanguíneo, por ejemplo, en las regiones premotoras del lóbulo frontal, *Acta Neurológica Escandinavia* 116, 340-344 (2007). Se especula que el aumento del flujo sanguíneo a través de la inducción de la angiogénesis podría ser beneficioso para los sujetos que sufren ALS.

- La inducción de la angiogénesis de acuerdo con las realizaciones se puede utilizar además en relación con el
- 30 implante de diversos dispositivos médicos, sensores, etc., donde puede ser ventajoso inducir la microcirculación hacia o relacionada con el implante.

- El sulfato de dextrano de las realizaciones se puede utilizar para tratar, inhibir o prevenir diversas enfermedades, trastornos y afecciones isquémicas, así como componentes isquémicos en diversas enfermedades, trastornos y
- 35 afecciones.

- Una ventaja significativa de las presentes realizaciones es que el sulfato de dextrano de las realizaciones es capaz de inducir selectivamente la angiogénesis en un sujeto, es decir, inducir la angiogénesis en un sitio, como un tejido o un órgano, donde se necesita la angiogénesis. Por ejemplo, la angiogénesis se induce y se produce en el tejido
- 40 isquémico, pero no en el tejido no isquémico, como se ejemplifica en la figura 4, que muestra la presencia de formación de pequeños capilares (como se ilustra por CD-34) y confirma la presencia de capilares en funcionamiento y activos (como se ilustra por DA) en la extremidad isquémica derecha, pero no en la extremidad no isquémica izquierda.

- 45 Otro aspecto de las realizaciones se refiere a un procedimiento para inducir la angiogénesis en un sujeto. El procedimiento comprende administrar al sujeto sulfato de dextrano, o un derivado farmacéuticamente aceptable de este, que tiene un peso molecular promedio inferior a 10 000 Da.

- Un aspecto adicional de las realizaciones se refiere al uso de sulfato de dextrano, o un derivado farmacéuticamente
- 50 aceptable de este, que tiene un peso molecular promedio inferior a 10 000 Da para la fabricación de un medicamento para inducir la angiogénesis en un sujeto.

- Aun otro aspecto de las realizaciones se refiere a sulfato de dextrano, o un derivado farmacéuticamente aceptable de este, que tiene un peso molecular promedio inferior a 10 000 Da para uso para aumentar el flujo sanguíneo en
- 55 un sujeto que sufre isquemia.

- Un aspecto relacionado de las realizaciones define un procedimiento para aumentar el flujo sanguíneo en un sujeto que sufre isquemia. El procedimiento comprende administrar al sujeto sulfato de dextrano, o un derivado farmacéuticamente aceptable de este, que tiene un peso molecular promedio inferior a 10 000 Da. Otro aspecto
- 60 relacionado de las realizaciones define el uso de sulfato de dextrano, o un derivado farmacéuticamente aceptable

de este, que tiene un peso molecular promedio inferior a 10 000 Da para la fabricación de un medicamento para aumentar el flujo sanguíneo en un sujeto que sufre isquemia.

En una realización particular, el sulfato de dextrano, o el derivado farmacéuticamente aceptable de este, es capaz de aumentar el flujo sanguíneo en un tejido u órgano isquémico del sujeto.

El tejido o el órgano puede ser un órgano periférico, el corazón o tejido del SNC, como el cerebro, como se planteó anteriormente.

10 Aun otro aspecto de las realizaciones se refiere a sulfato de dextrano, o un derivado farmacéuticamente aceptable de este, que tiene un peso molecular promedio inferior a 10 000 Da para vascularizar el tejido isquémico en un sujeto.

Un aspecto relacionado de las realizaciones define un procedimiento para vascularizar el tejido isquémico en un sujeto. El procedimiento comprende administrar al sujeto sulfato de dextrano, o un derivado farmacéuticamente aceptable de este, que tiene un peso molecular promedio inferior a 10 000 Da. Otro aspecto relacionado de las realizaciones define el uso de sulfato de dextrano, o un derivado farmacéuticamente aceptable de este, que tiene un peso molecular promedio inferior a 10 000 Da para la fabricación de un medicamento para vascularizar el tejido isquémico en un sujeto.

20 El tejido isquémico puede ser un órgano periférico, el corazón o tejido del SNC, como el cerebro, como se planteó anteriormente.

La vascularización, es decir, la formación de pequeños capilares, inducida o desencadenada por el sulfato de dextrano de las realizaciones, es selectiva en términos de que tiene lugar en el tejido isquémico de un sujeto, pero no en el tejido no isquémico, es decir, sano, del sujeto. La vascularización inducida de acuerdo con las realizaciones se produce en el sitio donde se necesita, mientras que el tejido sano no se ve afectado (sin formación significativa de vascularización).

30 El sujeto es preferentemente un sujeto mamífero, más preferentemente un primate y en particular un sujeto humano. La presente realización, sin embargo, se puede utilizar también en aplicaciones veterinarias. Algunos ejemplos no taxativos de sujetos animales incluyen primate, gato, perro, cerdo, caballo, ratón, rata.

Las realizaciones también se pueden aplicar a un tratamiento *in vitro* y/o *ex vivo* de tejidos y/u órganos vascularizados para inducir la angiogénesis en el tejido y/u órgano vascularizado, aumentar el flujo sanguíneo en el tejido y/u órgano vascularizado y/o vascularizar un tejido y/u órgano vascularizado.

En tal caso, el sulfato de dextrano, o un derivado farmacéuticamente aceptable de este, se puede agregar al tejido y/u órgano vascularizado en diversas aplicaciones *in vitro* o *ex vivo*. Por ejemplo, el sulfato de dextrano, o un derivado farmacéuticamente aceptable de este, se puede agregar a un medio de cultivo en el cual el tejido y/u órgano vascularizado se sumerge o se pone en contacto *in vitro*. Alternativa o adicionalmente, el tejido y/u órgano vascularizado se puede rociar con una solución que comprende sulfato de dextrano, o un derivado farmacéuticamente aceptable de este. Además, si el tejido y/u órgano vascularizado se conecta a una bomba de circulación extracorpórea o dispositivo de oxigenación por membrana extracorpórea (ECMO), entonces el sulfato de dextrano, o un derivado farmacéuticamente aceptable de este, se puede agregar a la sangre que se bombea a través del tejido y/u órgano vascularizado.

EXPERIMENTOS

50 EJEMPLO 1

Evaluación de la angiogénesis en un modelo de ratón con isquemia crítica de extremidades posteriores

La enfermedad arterial periférica (PAD) es una forma de enfermedad vascular periférica (PVD) en la cual hay una obstrucción parcial o total del suministro de sangre a una extremidad, generalmente la pierna, lo que lleva a un deterioro del flujo sanguíneo y a la hipoxia en el tejido. Cuando la PAD avanza, alcanza la etapa de isquemia crítica de las extremidades (CLI) con úlceras cutáneas, gangrena y amputaciones inevitables. La angiogénesis terapéutica surgió como un medio no invasivo de promover la neovascularización en los tejidos isquémicos. Como se describe en el presente estudio, la administración subcutánea sistémica de sulfato de dextrano promueve la angiogénesis y provoca la formación de pequeños vasos sanguíneos y la proliferación de células endoteliales. En el presente

estudio, se aplicó un modelo de isquemia grave estable (Journal of Experimental and Clinical Medicine 31, 128-132 (2006)) para evaluar la seguridad y la eficacia del sulfato de dextrano sobre la angiogénesis y el resultado funcional.

5 Materiales

El sulfato de dextrano con un peso molecular promedio dentro de un intervalo de entre 5-7 kDa se obtuvo de pK Chemicals A/S, Dinamarca. En las figuras 1-4, 6, 7, el sulfato de dextrano se indica como TM-700.

El día anterior al inicio del estudio se preparó una solución de inyección de sulfato de dextrano. Como vehículo, se utilizó NaCl al 0,9 % (solución salina) (Teva Pharmaceutical Industries Ltd). La solución de inyección se preparó agregando el volumen correspondiente de NaCl al compuesto pesado para obtener una concentración objetivo para la administración (10 o 30 mg/kg de peso corporal). El sulfato de dextrano se disolvió mediante agitación en vórtex o simplemente girando el tubo unas cuantas veces. Se almacenó la solución a 2-8 °C durante la noche para que los agregados se estabilizaran. Al día siguiente, se agitó en vórtex el tubo y se filtró la solución a través de un filtro de 0,2 µm para obtener una solución estéril. Se prepararon las soluciones en el día 7, para usar en los días 8-21, y se realizó una segunda preparación en el día 21, para usar en los días 22-35. Se almacenó la solución a 2-8 °C entre las fechas de aplicación.

En total 60 ratones Balb/c macho, de 9 semanas, con un peso corporal promedio de 24,7 g en el inicio del estudio (día 0) se obtuvieron de Harlan Laboratories, Israel. El peso mínimo y máximo registrado en cada grupo se encontraba dentro del intervalo de ± 20 % de la media del grupo. Los animales se manipularon de acuerdo con el Instituto Nacional de Salud (NIH) y la Asociación para la Evaluación y Acreditación del Cuidado de los Animales de Laboratorio (AAALAC). Los animales se colocaron en jaulas de polisulfona (PSU) (5/jaula) que medían 42,5 × 265,6 × 18,5 cm, con parrilla superior de acero inoxidable con instalaciones para alimentos granulados y agua potable en botella de policarbonato transparente; lecho: se utilizó cáscara de arroz esterilizada al vapor (Harlan, Sani-chip, n.º de cat.: 106S8216) y el material del lecho se cambió junto con la jaula al menos dos veces por semana. Los animales se alimentaron *ad libitum* con alimento para roedores comercial (Teklad Certified Global 18 % Protein Diet n.º de cat.: 106S8216). Los animales tenían acceso libre a agua potable esterilizada en autoclave y acidificada (pH entre 2,5 y 3,5) obtenida del suministro municipal. Los animales se mantuvieron en condiciones estándar de laboratorio, con aire acondicionado y filtrado (HEPA F6/6) con suministro adecuado de aire fresco (mínimo 15 cambios de aire/hora). Los animales se mantuvieron en un ambiente con clima controlado. El intervalo de temperaturas era 20-24 °C y el intervalo de RH era 30-70 % con un ciclo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad.

35 Procedimiento quirúrgico

El día de la cirugía, se indujo la anestesia mediante isoflurano a entre el 1,5 y el 3,0 %, N₂O al 1,5 % y O₂ al 0,5 % . Bajo anestesia, los ratones se colocaron con el lado ventral hacia arriba. Se realizó una incisión de 0,5-1,0 cm en la piel en el área inguinal. La arteria femoral se ligó proximalmente justo después de la parte distal de la arteria ilíaca y distalmente después de la bifurcación con la arteria femoral profunda con hilo de seda 6-0, se seccionó y se extirpó entre dos ligaduras. Se cerró la herida con hilo de seda 4-0 y se dejó que los ratones se recuperaran.

Tratamiento con sulfato de dextrano

En el día 8, semana 2 después de la cirugía, cada animal en los grupos 2M y 3M se inyectó con solución de sulfato de dextrano s.c. tres veces por semana. Los animales en el grupo 4M se inyectaron s.c. una vez por semana y los del grupo 1M recibieron tratamiento de vehículo (NaCl), véase la tabla 1.

Tabla 1 - Asignación de grupos

Grupo	Tratamiento	Volumen	Vía de administración
1M (n=15)	Control de vehículo	10 ml/kg	s.c. repetido tres veces por semana
2M (n=15)	Sulfato de dextrano 10 mg/kg		
3M (n=15)	Sulfato de dextrano 30 mg/kg		
4M (n=15)	Sulfato de dextrano 30 mg/kg		s.c. repetido una vez por semana

60 Mediciones de peso corporal

El peso corporal se midió el día del estudio -1 antes de la cirugía y una vez por semana a partir de ese momento. Entre el día 0 y el día 7, se observó una pequeña reducción en el peso corporal medio en todos los grupos de animales 1M, 2M, 3M y 4M que oscila entre 1,1 g y 1,6 g, véase la figura 1. A partir del día 14, se observó un aumento gradual del peso. En consecuencia, entre el día 0 y el día 35, el aumento medio en el peso corporal osciló entre 0,4 g y 1,7 g, véase la tabla 2.

Tabla 2 - Cambio medio con respecto a la referencia en el peso corporal por grupo de estudio

Grupo	Tratamiento	Cambio en el peso corporal medio desde el día 0 hasta el día 35 (g)
1M	Vehículo 3 veces/semana	0,4
2M	Sulfato de dextrano 10 mg/kg 3 veces/semana	1,0
3M	Sulfato de dextrano 30 mg/kg 3 veces/semana	1,7
4M	Sulfato de dextrano 30 mg/kg 1 vez/semana	1,0

Mediciones de flujo sanguíneo

Los flujos sanguíneos en las piernas de ambos lados se midieron con un Doppler láser sin contacto antes de la cirugía en el día -1 y en los días: 1, 7, 14, 21, 28 y 35 después de la operación. Las mediciones del flujo sanguíneo se expresaron como la relación entre el flujo en la extremidad isquémica y el de la extremidad normal.

Todos los grupos de animales 1M, 2M, 3M y 4M presentaron un aumento en el flujo sanguíneo medio en la extremidad operada entre el día 1 y el día 35, véase la figura 2. El flujo sanguíneo medio aumentó desde la referencia después de la cirugía en el grupo tratado con sulfato de dextrano 2M (10 mg/kg 3 veces/semana) en 46,7 unidades; en el grupo tratado con sulfato de dextrano 3M (30 mg/kg 3 veces/semana) en 59,3 unidades y en el grupo tratado con sulfato de dextrano 4M (30 mg/kg 1 vez/semana) en 51,1 unidades en comparación con un aumento de 19,5 unidades en el grupo de control de vehículo 1M. Esto representa un aumento de 2,2, 3,0 y 2,8 veces respectivamente en el flujo sanguíneo medio debido al tratamiento con sulfato de dextrano, véase la tabla 3 y la figura 2.

Tabla 3 - Cambio medio en el flujo sanguíneo por grupo de estudio

Grupo	Tratamiento	Cambio medio en el flujo sanguíneo en el día 35 frente al día 1
1M	Vehículo 3 veces/semana	19,5
2M	Sulfato de dextrano 10 mg/kg 3 veces/semana	46,7
3M	Sulfato de dextrano 30 mg/kg 3 veces/semana	59,3
4M	Sulfato de dextrano 30 mg/kg 1 vez/semana	51,1

La figura 8 compara el flujo sanguíneo medido en un ratón de control (grupo 1M) y un ratón tratado con sulfato de dextrano de acuerdo con el grupo 3M. La figura muestra imágenes de un Doppler láser sin contacto 35 días después de la ligación de la arteria femoral de la extremidad posterior izquierda.

5 Evaluación macroscópica de la gravedad isquémica

La evaluación macroscópica de la extremidad isquémica se realizó en el día 7 y una vez por semana a partir de ese momento utilizando grados morfológicos para el área necrótica, véase la tabla 4.

10 Tabla 4 - Grados morfológicos para el área necrótica

Grado	Descripción
0	ausencia de necrosis
1	necrosis que se limita al dedo del pie (pérdida del dedo del pie)

15

2	necrosis que se extiende hasta el dorsum pedis (pérdida del pie)
3	necrosis que se extiende hasta raíz (pérdida de la rodilla)
4	necrosis que se extiende hasta el muslo (pérdida total del miembro posterior)

20

25 Se evaluó macroscópicamente la extremidad isquémica semanalmente desde el día 7 hasta el día 35 utilizando escalas morfológicas graduadas para el área necrótica, véase la tabla 4. En todos los grupos de animales tratados con vehículo y sulfato de dextrano se encontró necrosis en los dedos de los pies o amputación de los pies (clasificación de 1 a 2, véase la tabla 6). Las tasas porcentuales de amputación de pies en cada grupo de tratamiento se muestran en la tabla 5 y en la tabla 6. Se encontró amputación de pies en el grupo de control tratado con vehículo 1M (15,4 %) y en el grupo tratado con sulfato de dextrano 4M (30 mg/kg 1 vez/semana) (7,1 %). La tasa de necrosis de los dedos de los pies en el grupo de control tratado con vehículo 1M fue de 23,1 % animales. En los grupos de animales tratados con sulfato de dextrano 2M y 3M, 35 días después de la inducción de HLI, la tasa de necrosis de los dedos de los pies fue de 21,4 % y 14,3 % respectivamente. En el grupo de animales 4M tratado con sulfato de dextrano no se produjo incidencia de necrosis de los dedos de los pies (tabla 6).

35

Tabla 5 - Incidencia de ratones con necrosis en los dedos de los pies y las extremidades en el día 7

Grupo	Incidencia de ratones con necrosis en los dedos de los pies (%)	Incidencia de ratones con amputación de extremidades (%)
1M	7,6	0,0
2M	0,0	0,0
3M	0,0	0,0
4M	0,0	0,0

40

45

Tabla 6 - Incidencia de ratones con necrosis en los dedos de los pies y las extremidades en el día 35

Grupo	Incidencia de ratones con necrosis en los dedos de los pies (%)	Incidencia de ratones con amputación de extremidades (%)
1M	23,1	15,4
2M	21,4	0,0
3M	14,3	0,0
4M	0,0	7,1

50

55

60 Evaluación in vivo de la función de las extremidades y el daño isquémico

Se realizó una evaluación semicuantitativa del uso inadecuado de la extremidad isquémica una vez por semana después de la cirugía utilizando la siguiente escala, véase la tabla 7.

5 Tabla 7 - Evaluación de la función de las extremidades

Grado	Descripción
0	flexionar el dedo del pie para resistir la tracción suave de la cola
1	flexión plantar
2	sin arrastre pero sin flexión plantar
3	arrastre de pie

10

La función de las extremidades se calificó como "no aplicable" en el caso de amputación parcial o total de las extremidades. En tal caso, las mediciones del flujo sanguíneo no se incluyeron en el análisis estadístico.

En paralelo con las mediciones del flujo sanguíneo y en comparación con el grupo de control de vehículo 1M, todos los grupos tratados con sulfato de dextrano 2M, 3M y 4M presentaron mejores resultados en la mejora funcional de las extremidades, véase la tabla 8 y la tabla 9 abajo y la figura 6.

Tabla 8 - Incidencia de ratones con puntuaciones de función de extremidades 0, 1, 2 y 3 en el día 7

Grupo	Incidencia de ratones con puntuación de función de extremidades 0 (%)	Incidencia de ratones con puntuación de función de extremidades 1 (%)	Incidencia de ratones con puntuación de función de extremidades 2 (%)	Incidencia de ratones con puntuación de función de extremidades 3 (%)
1M	0,0	0,0	0,0	100,0
2M	0,0	0,0	21,4	79,6
3M	0,0	0,0	21,4	79,6
4M	0,0	0,0	7,1	92,9

Tabla 9 - Incidencia de ratones con puntuaciones de función de extremidades 0, 1, 2 y 3 en el día 35

Grupo	Incidencia de ratones con puntuación de función de extremidades 0 (%)	Incidencia de ratones con puntuación de función de extremidades 1 (%)	Incidencia de ratones con puntuación de función de extremidades 2 (%)	Incidencia de ratones con puntuación de función de extremidades 3 (%)
1M	9,1	72,7	0,0	18,2
2M	50,0	42,9	7,1	0,0
3M	72,4	21,5	7,1	0,0
4M	69,2	30,8	0,0	0,0

Inmunohistoquímica y análisis de la densidad de capilares

Se sacrificaron los ratones al final del estudio el día 36 Se inyectó conjugado de isotiocianato de fluoresceína (FITC) - dextrano 500000 Da 10 mg/ml i.v. en una dosis de 200 µl por ratón 5 minutos antes del sacrificio de todos los animales. El músculo del cuádriceps se disecó en la parte coronaria. Se fijó el músculo en paraformaldehído nuevo al 2,5 % (pH 7,4) durante 24 horas y después se incrustó en parafina para la actina de músculo liso (SMA) con anticuerpos monoclonales de ratón (Ab-1 anti-SMA, clon 1A4, 1:800, Thermo scientific) y CD34 con inmunotinción anti CD34 (1:200, Cedralene). La incrustación en parafina se realizó según el procedimiento de incrustación estándar.

Se evaluaron las secciones manchadas y se fotografiaron con un microscopio de fluorescencia (E600; Nikon, Tokio, Japón) equipado con objetivos plan flúor conectados a una cámara CCD (DMX1200F; Nikon). En estas condiciones Cy3 muestra fluorescencia roja brillante: Ex (máx.): 543 nm; Em (máx.) 570 nm mientras que el dextrano de fluoresceína muestra fluorescencia verde intensa (Ex (máx.): 488 nm; Em (máx.): 530 nm). Las imágenes digitales se recogieron y analizaron utilizando el software Image Pro+. Se tomaron cuatro secciones de muestras de músculo de las mismas áreas de ocho animales de los grupos 1M, 3M y 4M. Se midió el área de los vasos sanguíneos. La densidad se expresó como el número medio de capilares por campo de vista. Los vasos totales representaron todos los vasos sanguíneos en el área medida.

10

La cantidad de capilares positivos de CD34 fue mayor en los grupos tratados con sulfato de dextrano 3M y 4M en comparación con el grupo de control 1M en el día 35 del estudio, véase las figuras 3, 4 y 5A-5C. La tinción positiva de CD34 se consideró como un indicio para la formación de capilares pequeños y, por ende, los resultados obtenidos respaldaron la mejora del flujo sanguíneo observada en los grupos de animales tratados con sulfato de dextrano. La tinción de dextrano confirmó que estos capilares están en funcionamiento y activos. La tinción de SMA reveló el mismo aumento en las formaciones de capilares que la tinción de CD34, véase la figura 7.

15

La figura 4 muestra claramente que el sulfato de dextrano de las realizaciones solo induce la angiogénesis en el tejido isquémico, es decir, en la extremidad derecha, y no en el tejido no isquémico, es decir, la extremidad izquierda. Por ende, el sulfato de dextrano de las realizaciones provoca una inducción selectiva de la angiogénesis solo donde se necesita.

20

Angiogénesis inadecuada es una de las características de las enfermedades isquémicas. La diana más establecida para angiogénesis terapéutica ha sido VEGF y sus receptores. Sin embargo, los ensayos clínicos para aliviar la isquemia fueron decepcionantes, lo que indica la necesidad de nuevas dianas terapéuticas para tratar enfermedades isquémicas.

25

En el presente estudio, se examinó la mejora del flujo sanguíneo en el modelo de isquemia de extremidades posteriores de ratón para evaluar la eficacia del sulfato de dextrano. La administración de sulfato de dextrano repetida (tres veces por semana) o (una vez por semana) en una dosis de 30 mg/kg s.c. restauró significativamente la perfusión sanguínea en comparación con el control tratado con vehículo. En el día 35, se observaron valores de perfusión de flujo sanguíneo de dos y medio a tres veces más altos en los grupos tratados con sulfato de dextrano en comparación con el grupo de control, con un efecto estadísticamente significativo a partir de los catorce días después del tratamiento.

35

Los datos agrupados del estudio confirmaron la eficacia terapéutica del sulfato de dextrano administrado s.c. para el tratamiento de la enfermedad arterial periférica oclusiva en el modelo animal de ratón Balb/c. Las amputaciones espontáneas o la tasa de necrosis de los dedos del pie también disminuyeron en los animales tratados con sulfato de dextrano en comparación con el grupo de control. El tratamiento con sulfato de dextrano mejoró la restauración funcional de las extremidades en todo el grupo de animales tratado con fármacos en comparación con el control tratado con vehículo. El tratamiento con sulfato de dextrano no provocó ningún efecto adverso en los animales tratados.

40

Los hallazgos de inmunohistoquímica confirmaron los resultados *in vivo*. En conjunto, los datos de este estudio confirmaron la eficacia terapéutica del sulfato de dextrano para el tratamiento de la enfermedad arterial periférica oclusiva en el modelo de ratón.

45

El tratamiento con sulfato de dextrano en ratones con isquemia de extremidades posteriores dio como resultado una recuperación rápida y significativa del flujo sanguíneo, medida por Doppler láser y demostrada también por la disminución de la gravedad isquémica de las extremidades y una mejora más rápida de la función de las extremidades.

50

No se registró ningún efecto adverso sobre la salud general en ninguno de los grupos. Estos datos se confirmaron por la evaluación inmunohistoquímica. Los hallazgos reflejan los cambios en la morfología de los vasos sanguíneos, es decir, el aumento de la densidad de los capilares y la angiogénesis de los vasos sanguíneos.

55

EJEMPLO 2

Evaluación de la eficacia de la angiogénesis en un modelo de apoplejía en ratas

60

El modelo de ratas de tMCAO de apoplejía se utilizó para evaluar la eficacia del tratamiento con sulfato de dextrano. Se trataron las ratas con sulfato de dextrano durante 28 días mediante inyecciones subcutáneas, comenzando dos horas después del procedimiento quirúrgico, ya sea con 30 mg/kg tres veces por semana o con una dosis diaria de 15 mg/kg. Durante el estudio, se monitorizaron las funciones neurológicas, motoras y somatosensoriales en una batería de pruebas de comportamiento.

Se demostraron diferencias claras entre los grupos tratados con sulfato de dextrano y el grupo de control tratado con el vehículo. Se demostró mejora en las funciones motoras, según lo evaluado por Neuroscore, la prueba de paso y la prueba de balanceo corporal, en ambos grupos tratados con fármacos. Las funciones motoras sensoriales también se recuperaron después del tratamiento con sulfato de dextrano. Es probable que el efecto de los tratamientos con sulfato de dextrano deba atribuirse a su actividad angiogénica. Esta conclusión fue apoyada por un aumento en la perfusión sanguínea cerebral y en la densidad de los capilares positivos de actina de músculo liso (SMA) en el hemisferio afectado. El tratamiento con sulfato de dextrano también redujo la respuesta inflamatoria en comparación con el control tratado con vehículo.

A la luz de estos hallazgos, se puede concluir que el tratamiento con sulfato de dextrano mejoró claramente los déficits motores y somatosensoriales, así como la perfusión sanguínea cerebral y la actividad angiogénica en el modelo de apoplejía de ratas.

La apoplejía es una causa importante de discapacidad grave a largo plazo y la tercera causa principal de muerte en Estados Unidos. Se estima que los costos totales de salud por discapacidad debido a apoplejías son de 53,6 mil millones de dólares anuales. Las apoplejías isquémicas comprenden más del 88% de todas las apoplejías, lo que las convierte en el tipo más común de lesión cerebrovascular. Las afecciones isquémicas en el cerebro provocan la muerte neuronal, lo que produce déficits sensoriomotores permanentes. Ahora está claro que el tratamiento inmediato para los pacientes con apoplejías a menudo es imposible en el ámbito clínico. Los médicos necesitan de forma urgente nuevas estrategias de tratamiento para los tratamientos de apoplejías.

Se han utilizado varios modelos animales para estudiar la isquemia cerebral en un esfuerzo por comprender su fisiopatología e identificar estrategias terapéuticas para reducir al mínimo la gravedad del daño isquémico. La isquemia focal provoca un infarto cerebral localizado y es inducida por la oclusión de la arteria cerebral media (MCAO) en las ratas. Ha obtenido una aceptación cada vez mayor como modelo para el infarto hemisférico en los seres humanos. Después de MCAO se produce un infarto cortical y estriatal con evolución temporal y espacial dentro del territorio vascular suministrado por la arteria cerebral media.

En la última década, se han recogido cada vez más pruebas para la evaluación del comportamiento en los estudios de apoplejía en animales. Se encontró que la mejora funcional es altamente fiable como medida de la eficacia terapéutica. Uno de los tratamientos innovadores más prometedores para las complicaciones vasculares en la apoplejía es la angiogénesis terapéutica, que surgió como un medio no invasivo para promover la neovascularización en los tejidos isquémicos.

En este estudio se estudió el potencial neuroprotector y rehabilitador del sulfato de dextrano en el modelo de apoplejía en ratas MCAO transitorio.

Materiales

El sulfato de dextrano con un peso molecular promedio dentro de un intervalo de entre 5-7 kDa se obtuvo de pK Chemicals A/S, Dinamarca. En las figuras 9-16, el sulfato de dextrano se indica como TM-700.

Se disolvió sulfato de dextrano en NaCl al 0,9 % (solución salina) (Teva Pharmaceutical Industries Ltd) hasta una concentración de 60 mg/ml para la inyección tres veces por semana y 30 mg/ml para la inyección diaria. La formulación se mantiene estable durante una semana. Los animales recibieron 0,5 ml/kg, igual a 30 y 15 mg/kg de peso corporal.

En total, 46 ratas SD macho con un peso corporal promedio de 342 g en el inicio del estudio (día 0) se obtuvieron de Harlan Laboratories, Israel. El peso mínimo y máximo registrado en cada grupo se encontraba dentro de un intervalo de ± 20 % del peso medio del grupo. Los animales se manipularon de acuerdo con las directrices del Instituto Nacional de Salud (NIH) y la Asociación Internacional para la Evaluación y Acreditación del Cuidado de Animales de Laboratorio (AAALAC). Los animales se colocaron en jaulas de polietileno (5/jaula) que medían 35 × 30 × 15 cm, con parilla superior de acero inoxidable que facilitaba alimento granulado y agua potable en botella de plástico; material de lecho: se utilizó vaina de arroz paddy limpia esterilizada con vapor (Harlan, Sani-chip n.º de

cat.:2018SC+F) y se cambió el material de lecho junto con la jaula al menos dos veces por semana. Los animales se alimentaron ad libitum con alimento para roedores comercial (Teklad Certified Global 18 % Protein Diet n.º de cat.: 106S8216). Los animales tenían acceso libre a agua potable esterilizada en autoclave y acidificada (pH entre 2,5 y 3,5) obtenida del suministro municipal. Los animales se colocaron en jaulas en condiciones de laboratorio estándar, se climatizaron con aire acondicionado y se filtraron (HEPA F6/6) con suministro de aire fresco adecuado (mínimo 15 cambios de aire/hora). Los animales se mantuvieron en un entorno controlado climatizado. El intervalo de temperaturas era 20-24 °C y el intervalo de RH era 30-70 % con un ciclo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad.

10 Procedimiento quirúrgico

El día de la cirugía, se indujo la anestesia con isoflurano al 4 % en una mezcla de N₂O al 70 % y O₂ al 30 % y se mantuvo con isoflurano al 1,5-2 %.

- 15 Se realizó la oclusión de la arteria cerebral media transitoria de acuerdo con el procedimiento descrito anteriormente en Stroke 29, 2162-2170 (1998). La arteria carótida común derecha (CCA) se expuso a través de una incisión en el cuello de la línea media y se diseccionó cuidadosamente, sin los nervios y fascias circundantes, desde su bifurcación hasta la base del cráneo. Las ramas de la arteria occipital de la arteria carótida externa (ECA) se aislaron, y estas ramas se disecaron y se coagularon. El ECA se disecó más distalmente y se coaguló junto con las
- 20 ramas terminales de las arterias lingual y maxilar, que luego se dividieron. Se aisló la arteria carótida interna (ICA) y se separó cuidadosamente del nervio vago adyacente, y se ligó la arteria pterigopalatina cerca de su origen con una sutura de nylon 5-0 (SMI, Bélgica). A continuación, se ató suavemente una sutura de seda 4-0 alrededor del muñón ECA movilizado y se insertó una sutura de nylon de monofilamento 4-0 de 4 cm de largo (la punta de la sutura se suavizó con una llama y se recubrió la sutura con polilisina antes de la inserción) a través de la parte proximal de
- 25 ECA dentro de ICA y luego dentro del círculo de Willis, lo cual efectivamente obstruyó la MCA. La herida quirúrgica se cerró y los animales se devolvieron a las jaulas para recuperarse de la anestesia. Dos horas después de la oclusión se volvieron a anestesiarse las ratas, se retiró el monofilamento para permitir la reperusión, se cerró la herida quirúrgica y las ratas volvieron a sus jaulas.
- 30 Una hora después de la oclusión, los animales se sometieron a una evaluación neurológica utilizando los "Neuroscore for exclusion criteria". Solamente se incluyeron en el estudio animales con una puntuación global ≥ 10 .

Tratamiento con sulfato de dextrano

- 35 Comenzó dos horas después de la oclusión (inmediatamente después de la reperusión), los animales en los grupos 2M y 3M (sulfato de dextrano en dosis de 30 mg/kg tres veces por semana o 15 mg/kg diariamente) y los animales en el grupo 1M (control de vehículo) se inyectaron por vía subcutánea, véase la tabla 10.

Tabla 10 - Asignación de grupos

40

	Grupo	Tratamiento	Dosis	Administración	Duración del tratamiento (días)
45	1M (n=13)	Vehículo	0	s.c. 3 veces por semana	28
	2M (n=15)	Sulfato de dextrano	30 mg/kg		
50	3M (n=15)	Sulfato de dextrano	15 mg/kg	s.c diariamente	

Análisis de datos

- A menos que se especifique lo contrario, todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando ANOVA de dos vías para mediciones repetidas, seguido de pruebas de comparación post-hoc de Bonferroni.

Pesos corporales

- A lo largo del estudio, no se observaron diferencias estadísticamente significativas en el peso corporal entre los distintos grupos de tratamiento, véase la figura 9.

60

Puntuación de la prueba neurológica (Neuroscore)**Evaluación: antes de la operación, una hora después de la oclusión y en los días 7, 14, 21 y 28**

5

Se realizó la escala de calificación neurológica modificada (mNRS). La persona que hizo las evaluaciones de comportamiento no estaba al tanto del fármaco/dosis administrado (prueba a ciegas). Se realizó Neuroscore con una puntuación total de 18 de acuerdo con Stroke 32, 1005-1011 (2001).

- 10 El Neuroscore incluyó un conjunto de pruebas clínico-neurológicas (compuesto de pruebas motoras, sensoriales, de reflejos y de equilibrio) que se utilizaron para evaluar el efecto de los tratamientos evaluados. El Neuroscore se calificó en una escala de 0 a 18 (en la que la puntuación normal es 0 y la puntuación de déficit máxima está representada por 18). Como se esperaba, en todos los grupos de ratas se observó una fuerte disminución de las funciones neurológicas dos horas después de la inducción de tMCAO, con una mejora espontánea a lo largo del
- 15 tiempo a partir de ese momento. Se mostraron diferencias estadísticamente significativas en los grupos tratados con 2M con 30 mg/kg de sulfato de dextrano tres veces por semana y 3M tratados con 15mg/kg de sulfato de dextrano diariamente, en comparación con el control tratado con vehículo, desde la primera prueba en el día 7 a lo largo del estudio hasta el día 28, véase la figura 10. No se encontraron diferencias estadísticas entre los dos programas de dosificación 2M y 3M.

20 Prueba de paso**Evaluación: antes de la operación y en los días 7, 14, 21 y 28**

- Se analizaron los animales para detectar acinesia de extremidad anterior utilizando la prueba de paso. El animal se
- 25 sujetó con las extremidades traseras y una de las extremidades delanteras fijadas con una mano, y la pata delantera sin sujetar se arrastró a lo largo de la mesa. Se contó la cantidad de pasos de ajuste mientras el animal se movía lateralmente a lo largo de la superficie de la mesa (85 cm en aproximadamente cinco segundos), en la dirección de la derecha y del revés para ambas extremidades anteriores.
- 30 Se analizaron los animales para detectar acinesia de las extremidades anteriores en la prueba de paso, comúnmente utilizada para la medición de la función neuromuscular, como un índice para la función motora del animal. Se observó cierta mejora en la función motora con el tiempo en todos los animales que fueron sometidos a tMCAO, principalmente como resultado de la recuperación funcional espontánea. Sin embargo, la mejora funcional en ratas tratadas con sulfato de dextrano fue más pronunciada en comparación con los controles tratados con
- 35 vehículos. En ambos grupos de animales tratados, el grupo 2M y el 3M, esta mejora alcanzó significancia estadística en comparación con el control a partir de la primera prueba en el día 7 y continuó mejorando hasta la finalización del estudio en el día 28, véase la figura 11. No se encontraron diferencias estadísticas entre los dos programas de dosificación 2M y 3M.

40 Colocación de las extremidades anteriores**Evaluación: antes de la operación y en los días 7, 14, 21 y 28**

- Para la prueba de colocación de las extremidades anteriores, el examinador sostiene la rata cerca de un tablero y
- 45 califica la capacidad de la rata de colocar la extremidad anterior en el tablero en respuesta a una estimulación en los bigotes, visual, táctil o propioceptiva. Se obtuvieron subpuntuaciones separadas para cada modo de entrada sensorial y se sumaron para obtener las puntuaciones totales (0 = normal, 12 = deterioro máximo).

Prueba de colocación de las extremidades anteriores (0-12):

50

Colocación de bigotes (0-2);
Colocación visual (hacia adelante (0-2), hacia los lados (0-2))
Colocación táctil (dorsal (0-2), lateral (0-2))
Colocación propioceptiva (0-2).

55

Para cada subprueba, los animales se puntuaron de la siguiente manera:

0,0 = respuesta inmediata
0,5 = respuesta en 2 segundos
1,0 = respuesta de 2-3 segundos
1,5 = respuesta de >3 segundos

60

2,0 = sin respuesta

La prueba de colocación de las extremidades anteriores se utilizó para evaluar las deficiencias somatosensoriales y sensoriales motoras. De manera similar a las otras pruebas, se observó cierta mejora espontánea en los déficits motores sensoriales a lo largo del tiempo en todos los animales que se sometieron a tMCAO. Sin embargo, todas las ratas tratadas con sulfato de dextrano mostraron una mejora estadísticamente significativa en comparación con el tratamiento con control de vehículo, comenzando el día 14 y hasta la finalización del estudio el día 28, véase la figura 12. En el grupo 3M, la mejora de los déficits motores sensoriales ya alcanzó significancia estadística en la primera prueba del día 7.

10

Estudio de balanceo del cuerpo

Evaluación: antes de la operación y en los días 7, 14, 21 y 28

- 15 La rata se sostuvo aproximadamente a una pulgada de la base de la cola. Después se elevó a una pulgada por encima de la superficie de una mesa. La rata se mantuvo en el eje vertical, definido como no más de 10° a la izquierda o a la derecha. Se registró un balanceo cuando la rata mueve su cabeza fuera del eje vertical a ambos lados. Antes de intentar otro balanceo, la rata volvió a la posición vertical para que se contara el siguiente balanceo. Se contaron veinte balanceos en total. Una rata normal típicamente tiene un número igual de balanceos a cada lado. Después de la isquemia focal, la rata tiende a balancearse hacia el lado contralateral (lado izquierdo en este caso). Las puntuaciones de balanceo corporal se expresan como porcentaje de balanceos hacia la derecha sobre el total de balanceos. Hubo una recuperación parcial espontánea de las puntuaciones de balanceo corporal (hacia el 50%) durante el primer mes después de la apoplejía.
- 20
- 25 Los animales se sometieron a pruebas de acinesia de las extremidades anteriores en la prueba de balanceo corporal, comúnmente utilizada para la medición de las funciones neuromusculares. Se observó cierta mejora espontánea en la función motora a lo largo del tiempo en todos los animales que se sometieron a tMCAO. Sin embargo, todas las ratas tratadas con sulfato de dextrano mostraron una mejora estadísticamente significativa en comparación con el tratamiento con control de vehículo, comenzando en la primera prueba el día 7 y hasta la finalización del estudio el día 28, véase la figura 13. No se encontraron diferencias estadísticas entre los dos grupos de dosificación 2M y 3M.
- 30

Evaluación del flujo sanguíneo cerebral

35 Evaluación: día 29

La evaluación del flujo sanguíneo en la corteza cerebral y la constricción de los vasos se llevaron a cabo utilizando el sistema de láser Doppler Flow-R, donde se monitorizó el flujo sanguíneo intracraneal y el diámetro de los vasos (constricción/dilatación). Esto se llevó a cabo el día 29 después de la iniciación de la apoplejía. El procedimiento de Doppler se realizó mientras los animales se encontraban con anestesia de isoflurano.

40

Los animales también fueron examinados para la restauración del flujo sanguíneo cerebral en el hemisferio dañado el día 29. Se observó una mejora estadísticamente significativa en la tasa de perfusión sanguínea cerebral en todos los animales que se sometieron a tMCAO y se trataron con sulfato de dextrano (grupo 2M y 3M) frente al grupo tratado con vehículo de control 1M. La proporción del diámetro de los vasos también aumentó en animales tratados con sulfato de dextrano frente al control, véase las figuras 14 y 15.

45

Recolección de muestras y sacrificio

50 El día 30 después de MCAO, las ratas se anestesiaron con ketamina/xilacina y recibieron perfusión transcardíacamente por paraformaldehído amortiguado (PFA) al 4 %. Se recolectaron los cerebros fijos en PFA amortiguado al 4 % para la inmunotinción y la evaluación histológica.

Se tomaron dos secciones de muestras de cerebro de las mismas áreas de seis animales de los grupos 1M y 3M. Los capilares se contaron con microscopio en un total de tres campos aleatorios de cada sección. La densidad se expresó como el número medio de capilares por campo de vista. El tratamiento con sulfato de dextrano 15 mg/kg diariamente aumentó la cantidad de capilares 30 días después de la apoplejía, en comparación con el grupo de control tratado con vehículo.

55

60 Se observó una mejora en la cantidad de capilares de SMA con diámetro menor a 30 µm en animales que se

sometieron a tMCAO, y que se trataron con sulfato de dextrano 15 mg/kg diariamente, en comparación con el grupo de control tratado con vehículo, como resultado del efecto angiogénico, véase la figura 16.

Las figuras 17A y 17B ilustran el efecto del tratamiento en la densidad de capilares para una rata del grupo de control de vehículo (figura 17A) y del grupo de sulfato de dextrano (15 mg/kg, diariamente) (figura 17B).

Mortalidad y signos clínicos

Murieron dieciocho ratas durante el estudio. Una rata murió justo después de la reperusión antes de la dosificación, y diecisiete ratas dentro de las 10 horas después de la dosificación (6 en el grupo 1M, 6 en el grupo 2M y 5 en el grupo 3M). No se observaron signos clínicos adversos no relacionados con el modelo en todos los grupos de animales.

El modelo de ratas de tMCAO de apoplejía tradicionalmente es un modelo aceptado para evaluar la eficacia neuroprotectora y de rehabilitación de los tratamientos con fármacos. Este modelo se utilizó en el presente estudio para evaluar la eficacia del tratamiento con sulfato de dextrano en dos programas de dosificación. Se trataron las ratas con sulfato de dextrano durante 28 días mediante inyecciones subcutáneas, comenzando dos horas después del procedimiento quirúrgico, ya sea con 30 mg/kg tres veces por semana o con una dosis diaria de 15 mg/kg. Durante el estudio, se monitorizaron las funciones neurológicas, motoras y somatosensoriales en una batería de pruebas de comportamiento.

Tal como se esperaba, se observó cierta recuperación espontánea de las funciones neurológicas durante el seguimiento de 28 días después de la inducción de la apoplejía. Sin embargo, se demostraron diferencias claras entre los grupos tratados con sulfato de dextrano y el grupo de control tratado con el vehículo. Sin embargo, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los dos cronogramas de dosificación. Se demostró mejora en las funciones motoras, según lo evaluado por Neuroscore, la prueba de paso y la prueba de balanceo corporal, en ambos grupos tratados con fármacos (figuras 10, 11 y 13). Las funciones motoras sensoriales también se recuperaron después del tratamiento con sulfato de dextrano (figura 12). Los efectos beneficiosos se observaron a partir de la primera prueba el día 7 del tratamiento y continuaron mejorando hasta la finalización del estudio el día 28. Los efectos observados no pueden atribuirse a diferencias en la salud general de las ratas, ya que todos los grupos aumentaron de peso a la misma velocidad sin diferencias significativas entre ellos (figura 9). Además, no se observaron diferencias en los signos clínicos generales. Es probable que el efecto de los tratamientos con sulfato de dextrano deba atribuirse a su actividad angiogénica. Esta conclusión fue apoyada por un aumento en la perfusión sanguínea cerebral y en la densidad de los capilares positivos de SMA en el hemisferio afectado. El tratamiento con sulfato de dextrano también redujo la respuesta inflamatoria en comparación con el control tratado con vehículo.

A la luz de estos hallazgos, se puede concluir que el tratamiento con sulfato de dextrano mejoró claramente los déficits motores y somatosensoriales, así como la perfusión sanguínea cerebral y la actividad angiogénica en el modelo de apoplejía de ratas.

Por ende, se ha demostrado que el sulfato de dextrano de las realizaciones induce de forma selectiva la angiogénesis en modelos de CLI (ejemplo 1) y apoplejía (ejemplo 2). Los resultados experimentales indican que incluso un tratamiento atrasado (día de inicio 15 después de la ligación) es efectivo. Las dosis dentro del intervalo de entre 3 y 30 mg/kg (s.c.) son eficaces y todos los protocolos de administración de dosis única, una vez semanalmente y 3 veces por semana son eficaces. La histología documenta la formación de vasos funcionales recién formados. Por ende, el sulfato de dextrano de las realizaciones proporciona un efecto selectivo en áreas isquémicas.

EJEMPLO 3

Evaluación de sulfato de dextrano en un modelo de infarto de miocardio

El presente estudio evaluó la eficacia angiogénica del tratamiento con sulfato de dextrano en un modelo de rata de infarto de miocardio.

El corazón tiene capacidad regenerativa limitada, por lo que la pérdida de músculo debido a infarto de miocardio agudo (MI) normalmente se reemplaza por tejido cicatricial no contráctil con vascularización limitada. La promoción de la angiogénesis y el aumento de la perfusión del tejido es una estrategia prometedora para la reparación cardíaca después de MI.

Materiales y procedimientos

El modelo de infarto de miocardio en rata implicó ligaciones de la arteria coronaria izquierda permanentemente con una sutura intramural. La cirugía provocó obstrucción del flujo sanguíneo y, posteriormente, daño isquémico grave e infarto de las paredes cardíacas.

En total, 150 ratas SD hembra que tenían un peso corporal promedio de 178 g en el inicio del estudio (día 0) se obtuvieron de Harlan Laboratories, Israel. Se alimentaron animales *ad libitum* con una dieta para roedores comercial (dieta de proteína al 18 % de Teklad Certified Global). Los animales tenían acceso libre a agua potable acidificada (pH entre 2,5 y 3,5) obtenida del suministro municipal. Los animales se colocaron en jaulas en condiciones de laboratorio estándar. El intervalo de temperaturas era 20-24 °C y el intervalo de RH era 30-70 % con un ciclo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad.

El sulfato de dextrano con un peso molecular promedio dentro de un intervalo de entre 5-7 kDa se obtuvo de pK Chemicals A/S, Dinamarca. El sulfato de dextrano se disolvió en NaCl al 0,9 % (salina) (Teva Pharmaceutical Industries Ltd) para inyectarse por vía subcutánea en dosis de 15 mg/kg o 3 mg/kg.

El día de la cirugía, los animales se anestesiaron con una combinación de 90 mg/kg de ketamina y 10 mg/kg de xilacina. Para inducir MI, con anestesia y analgesia, se abrió el pecho de la rata mediante toracotomía izquierda, se retiró el pericardio y se ocluyó permanentemente la arteria coronaria izquierda proximal con una sutura intramural (circulación 117, 1388-1396 (2008)). Dos horas después de la cirugía, cada animal en todos los grupos tratados se inyectaron s.c. con sulfato de dextrano o vehículo salino de acuerdo con la tabla 11.

Tabla 11 - Asignación de grupos

Grupo	Tratamiento	Volumen	S.C. Administración
1M (n=30)	Control de vehículo	0,5 ml/kg	3 veces por semana, comenzando el día 1 durante 3 semanas
2M (n=30)	Sulfato de dextrano 15 mg/kg		3 veces por semana, comenzando el día 1 durante 3 semanas
3M (n=30)	Sulfato de dextrano 15 mg/kg		3 veces por semana, comenzando el día 1 durante 1 semana
4M (n=30)	Sulfato de dextrano 15 mg/kg		dosis única el día 1
5M (n=30)	Sulfato de dextrano 3 mg/kg		3 veces por semana, comenzando el día 1 durante 1 semana

El día 36 después de la inducción de MI, las ratas se sacrificaron mediante inhalación de CO₂ y los corazones se recolectaron y se fijaron en solución de formalina amortiguada al 4 %. Se realizó incrustación en parafina de rutina utilizando procedimientos histológicos estándar.

Para el fin de identificar el tamaño del MI, se utilizó tinción tricrómica de Masson. Nueve corazones de un grupo tratado (2M) y ocho del grupo no tratado (1M) se dividieron transversalmente en cinco secciones que se incrustaron en parafina. Se realizaron cinco secciones de parafina en 5 µm en un microtomo Lika. Todas las secciones se tiñeron de acuerdo con el protocolo tricrómico de Masson estándar. Las secciones se visualizaron en un sistema de imágenes por computadora y el tamaño del infarto se marcó y se calculó utilizando el programa ImageJ. El tamaño del infarto se expresó como el porcentaje de área de infarto (no teñido) contra el área de ventrículo izquierdo total. Para cada animal, se analizaron cinco secciones seriales, incluida una que contenía la ligadura, y se calculó el valor medio de todas las secciones para cada corazón. Se utilizó marcador de inmunohistoquímica (actina de músculo liso - SMA) para evaluar el conteo de densidad vascular.

Se realizó el conteo de densidad vascular por 1 mm cuadrado en el borde de la lesión del infarto del área de miocardio afectada. Se tomaron imágenes utilizando un microscopio Olympus BX43 que utiliza aumento del objetivo X40. Se realizó el conteo de densidad vascular de los vasos positivos de SMA utilizando un software de análisis de imágenes - Image Pro Plus 5.1 de Media Cybernetics.

Resultados

La figura 18 ilustra el tamaño del infarto 35 días después de la inducción de MI. Todos los grupos de tratamiento tuvieron tamaño de infarto promedio menor en comparación con el grupo de control no tratado. Hubo una diferencia considerable entre el grupo de tratamiento 2M y el grupo de control 1M.

La figura 19 compara la tinción de SMA 35 días después de la inducción de MI para el grupo de tratamiento 2M y el grupo de control 1M. El tratamiento con sulfato de dextrano produjo una mayor densidad capilar de SMA en comparación con el control de vehículo.

10

Las figuras 20A-20C ilustran imágenes de la tinción de SMA para la densidad vascular para dos ratas en el grupo de tratamiento 2M (figuras 20A y 20B) y una rata en el grupo de control 1M (figura 20C). El tratamiento con sulfato de dextrano produjo una mayor densidad vascular de SMA en comparación con el control de vehículo.

15 El sulfato de dextrano disminuyó significativamente el volumen del infarto en el grupo tratado 2M después del infarto de miocardio en ratas en comparación con el grupo tratado con vehículo de control. El mismo grupo tratado con sulfato de dextrano reveló una tendencia al aumento de la densidad de capilares en la región del infarto de los corazones en comparación con el grupo tratado con vehículo de control. Por ende, el sulfato de dextrano promueve la reparación del miocardio y los vasos sanguíneos y mejora la angiogénesis en la región del infarto después de un
20 infarto de miocardio. Esto puede mejorar la remodelación ventricular izquierda a largo plazo y mejorar la recuperación de la función ventricular izquierda.

EJEMPLO 4

25 Evaluación de la eficacia de la angiogénesis en un modelo de isquemia de extremidades posteriores de rata

En el estudio descrito anteriormente en el ejemplo 1, se probó la eficacia angiogénica de sulfato de dextrano en un modelo de isquemia grave estable en ratones. En este estudio, se aplicó un modelo de isquemia grave estable en ratas (Toakai J Exp Clin Med 31(3), 128-13 (2006)) para evaluar la eficacia de sulfato de dextrano sobre la
30 angiogénesis y el resultado funcional mediante el uso de diferentes especies de animales.

Materiales

Se prepararon soluciones de sulfato de dextrano el día antes del inicio del estudio. Se utilizó NaCl (salina) al 0,9 %
35 como vehículo. El volumen relevante de NaCl se agregó al compuesto pesado para obtener la concentración de 6 y 60 mg/ml, que corresponde a la administración de 0,5 ml/kg para obtener la dosis de 3 y 30 mg/kg, respectivamente. Se disolvió sulfato de dextrano (un peso molecular promedio dentro de un intervalo de 5-7 kDa se obtuvo de pK Chemicals A/S, Dinamarca) mediante agitación en vórtex o simplemente girando el tubo unas cuantas veces. Se almacenó la solución a 4 °C durante la noche para que los agregados se estabilizaran. Al día siguiente, el
40 tubo se mezcló en vórtex y se filtró a través de un filtro 0,2 µm para obtener una solución estéril. La preparación se consideró confiable durante hasta 15 días cuando se almacenó a 4 °C. Se prepararon soluciones el día 7 y se utilizaron los días 8-21; una segunda preparación se realizó el día 21 y se utilizó los días 22-28.

90 ratas SD macho con un peso corporal promedio de 277 g en el inicio del estudio (día 0) se obtuvieron de Harlan
45 Laboratories, Israel. Se alimentaron animales *ad libitum* con una dieta para roedores comercial (dieta de proteína al 18 % de Teklad Certified Global). Los animales tenían acceso libre a agua potable acidificada (pH entre 2,5 y 3,5).

Los animales se manipularon de acuerdo con las directrices del Instituto Nacional de Salud (NIH) y la Asociación Internacional para la Evaluación y Acreditación del Cuidado de Animales de Laboratorio (AAALAC). Los animales se
50 colocaron en jaulas de polietileno (3/jaula) que medían 35 × 30 × 15 cm, con parilla superior de acero inoxidable que facilitaba alimento granulado y agua potable en botella de plástico; material de lecho: se utilizó vaina de arroz paddy limpia esterilizada con vapor (Harlan, Sani-chip n.º de cat.: 7090A) y se cambió el material de lecho junto con la jaula al menos dos veces por semana. Los animales se alimentaron *ad libitum* con alimento para roedores comercial (Teklad Certified Global 18 % Protein Diet n.º de cat.: 106S8216). Los animales tenían acceso libre a agua potable
55 esterilizada en autoclave y acidificada (pH entre 2,5 y 3,5) obtenida del suministro municipal. Los animales se colocaron en jaulas en condiciones de laboratorio estándar, se climatizaron con aire acondicionado y se filtraron (HEPA F6/6) con suministro de aire fresco adecuado (mínimo 15 cambios de aire/hora). Los animales se mantuvieron en un entorno controlado climatizado. El intervalo de temperaturas fue de 20-24 °C y el intervalo de
60 humedad relativa (RH) fue del 30-70 % con 12 horas de luz y un ciclo oscuro de 12 horas.

Todos los procedimientos quirúrgicos se realizaron con anestesia y analgesia (entre el 1,5 y el 3,0 % de isoflurano, N₂O al 1,5 % y O₂ al 0,5 %). Se realizó una incisión de 0,5-1,0 cm en la piel en el área inguinal. La arteria femoral y la vena se ligaron dos veces con hilo de seda 4-0 y se seccionaron transversalmente entre las ligaduras. La herida se cerró con hilo de seda 3-0 y se dejó que las ratas se recuperaran.

5

El día 8, semana 2 después de la cirugía, cada animal en los grupos 1M, 2M y 3M se inyectó s.c. tres veces por semana. Los animales en los grupos 4M y 5M se inyectaron s.c. una vez el día 8, véase la tabla 12.

Tabla 12 - Asignación de grupos

10

Grupo	Tratamiento	Volumen	Vía de administración
1M (n=17)	Control de vehículo	0,5 ml/kg	
2M (n=18)	Sulfato de dextrano, 30 mg/kg		s.c. repetido 3 veces por semana, comenzando en el día 8
3M (n=17)	Sulfato de dextrano, 30 mg/kg		
4M (n=17)	Sulfato de dextrano, 30 mg/kg		s.c. administrado una vez en el día 9
5M (n=17)	Sulfato de dextrano, 3 mg/kg		

15

20

25

Medición de flujo sanguíneo

Se midieron los flujos sanguíneos en las piernas de ambos lados con un láser Doppler sin contacto antes de la cirugía el día -1 y los días: 1, 7, 14, 21 y 28 después de la operación. Las mediciones de flujo sanguíneo se expresaron como la proporción del flujo en la extremidad isquémica con el de la extremidad normal.

30

Todos los grupos de animales tratados presentaron aumento del flujo sanguíneo en la extremidad operada en comparación con el control tratado con vehículo entre el día 1 y el día 28, véase la tabla 13 y la figura 21. Hubo diferencias estadísticamente significativas entre todos los grupos tratados con sulfato de dextrano en comparación con el control tratado con vehículo.

35

Tabla 13 - Cambio medio en el flujo sanguíneo

Grupo	Cambio medio en el flujo sanguíneo desde el día 0 hasta el día 28 (%)
1M	14,8
2M	47,7
3M	39,1
4M	44,0
5M	41,0

40

45

La figura 21 muestra la proporción del flujo sanguíneo entre la pierna lesionada con HLI contra la pierna no lesionada medida a través de un láser Doppler sin contacto. Los diferentes grupos se compararon utilizando ANOVA de dos vías para mediciones repetidas, seguido de prueba post-hoc de Bonferroni. La comparación de los grupos tratados con sulfato de dextrano 2M, 3M, 4M y 5M con el grupo de control 1M reveló diferencias estadísticamente significativas desde el día 14 hasta el día 28 (*P<0,05;**P<0,01;***P<0,001).

50

Gravedad isquémica

Se evaluó macroscópicamente la extremidad isquémica semanalmente desde el día 7 hasta el día 28 utilizando escalas morfológicas graduadas para el área necrótica (véase la tabla 4). En todos los grupos de animales tratados con sulfato de dextrano y vehículo, no se encontró ninguna necrosis de dedos o amputación de pies.

60

Evaluación in vivo de la función de las extremidades y el daño isquémico

Se realizó una evaluación semicuantitativa del uso inadecuado de la extremidad isquémica una vez por semana después de la cirugía utilizando la escala presentada en la tabla 7. Personal ciego al tratamiento realizó la puntuación.

Todos los grupos de animales tratados con sulfato de dextrano tuvieron una mejora funcional de las extremidades en comparación con el control tratado con vehículo entre el día 1 y el día 28, véase la tabla 14 y la figura 22.

10 Tabla 14 - Incidencia de ratas con puntuaciones de función de extremidades 0-3 el día 28

Grupo	Incidencia de puntuación de función de extremidades 0 (%)	de Incidencia de puntuación de función de extremidades 1 (%)	de Incidencia de puntuación de función de extremidades 2 (%)	de Incidencia de puntuación de función de extremidades 3 (%)
15 1M	59	35	6	0
2M	100	0	0	0
20 3M	88	12	0	0
4M	100	0	0	0
5M	94	6	0	0

25 Los diferentes grupos se compararon utilizando ANOVA de dos vías para mediciones repetidas, seguido de prueba post-hoc de Bonferroni. La comparación de los grupos tratados con sulfato de dextrano 2M, 3M, 4M y 5M con el grupo de control 1M reveló diferencias estadísticamente significativas desde el día 14 hasta el día 28 (*P<0,05;**P<0,01;***P<0,001).

30 Inmunohistoquímica y análisis de la densidad de capilares

Se tomaron cuatro secciones de muestras de músculo de las mismas áreas de seis animales de los grupos 1M, 2M, 3M, 4M, 5M y se tiñeron para los vasos sanguíneos utilizando anticuerpos contra SMA y el factor 8. El área de los vasos sanguíneos se evaluó utilizando análisis de imágenes. La densidad se expresó como el número medio de capilares por campo de vista. Los vasos totales representaron todos los vasos sanguíneos en el área medida. La cantidad de capilares positivo de SMA y factor 8 en la extremidad isquémica derecha era mayor en todos los grupos tratados con sulfato de dextrano 2M-5M en comparación con el grupo de control 1M el día 28 del estudio, véase la figura 23. La tinción positiva de SMA y el factor 8 se consideró como un indicio para la formación de capilares pequeños en ratas y, por ende, los resultados obtenidos respaldaron la mejora del flujo sanguíneo observada en los grupos de animales tratados con sulfato de dextrano. El análisis estadístico se realizó utilizando ANOVA de dos vías seguido de comparaciones múltiples de Bonferroni, */** indica p<0,05/0,01.

Análisis de angiografía

45 El número de intersecciones entre los vasos llenos de contraste se determinó mediante análisis de imágenes 28 días después de la inducción de isquemia de extremidad posterior. La angiografía reveló una cantidad significativamente grande de colaterales en la extremidad afectada en ratas tratadas con sulfato de dextrano en comparación con el grupo de control tratado con vehículo (p<0,01 y p<0,001 de acuerdo con ANOVA de una vía seguido de prueba post-hoc de Bonferroni), véase las figuras 24 y 25A-25D.

50 Angiogénesis inadecuada es una de las características de las enfermedades isquémicas. La diana más establecida para angiogénesis terapéutica ha sido VEGF y sus receptores. Sin embargo, los ensayos clínicos para aliviar la isquemia fueron decepcionantes, lo que indica la necesidad de nuevas dianas terapéuticas para tratar enfermedades isquémicas.

55 En el presente estudio, se examinó la mejora del flujo sanguíneo en el modelo de isquemia de extremidades posteriores de rata para evaluar la eficacia del sulfato de dextrano en dos regímenes de dosis y de tratamiento diferentes. La administración de sulfato de dextrano en las dosis de 30 y 3 mg/kg s.c. tres veces por semana o en dosis simple en el día 8 se restauró significativamente la perfusión sanguínea y mejoró la puntuación funcional de extremidades en comparación con el control tratado con vehículo del día 14 después de la cirugía. Ambos

regímenes de dosis y administración fueron eficientes. No se produjo ninguna amputación espontánea o necrosis de dedos en ninguno de los grupos de animales tratados o de control. El tratamiento con sulfato de dextrano no provocó ningún efecto adverso en los animales tratados. La puntuación de angiografía (medición de agrandamiento de la arteria colateral) fue significativamente mayor en todos los grupos de animales tratados con sulfato de dextrano en comparación con los grupos tratados con vehículo, sin diferencia estadística entre los diversos grupos tratados. La densidad de los capilares de SMA y factor 8 también aumentó después del tratamiento con sulfato de dextrano. En conjunto, los datos de este estudio confirmaron la eficacia terapéutica del sulfato de dextrano para el tratamiento de la enfermedad arterial periférica oclusiva en el modelo de isquemia de extremidades posteriores de rata.

10

REIVINDICACIONES

1. Sulfato de dextrano, o un derivado farmacéuticamente aceptable de este, que tiene un peso molecular promedio igual o inferior a 10 000 Da para uso en la inducción de angiogénesis en un tejido u órgano
5 isquémico en un sujeto.
2. Sulfato de dextrano, o un derivado farmacéuticamente aceptable de este, que tiene un peso molecular promedio igual o inferior a 10 000 Da para uso en el aumento del flujo sanguíneo en un sujeto que sufre
10 isquemia.
3. Sulfato de dextrano, o dicho derivado farmacéuticamente aceptable de este, para uso de acuerdo con la reivindicación 2, para uso en el aumento del flujo sanguíneo en un tejido u órgano isquémico de dicho sujeto.
4. Sulfato de dextrano, o un derivado farmacéuticamente aceptable de este, que tiene un peso
15 molecular promedio igual o inferior a 10 000 Da para uso en la vascularización del tejido isquémico en un sujeto.
5. Sulfato de dextrano, o dicho derivado farmacéuticamente aceptable de este, para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde dicho peso molecular promedio se encuentra dentro de un intervalo de entre 2 000 y 10 000 Da, preferentemente dentro de un intervalo de entre 3 000 y 10 000 Da, y más
20 preferentemente dentro de un intervalo de entre 3 500 y 9 500 Da, como dentro de un intervalo de entre 4 500 y 7 500 Da, o dentro de un intervalo de entre 4 500 y 5 500 Da.
6. Sulfato de dextrano, o dicho derivado farmacéuticamente aceptable de este, para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde dicho sulfato de dextrano, o dicho derivado farmacéuticamente
25 aceptable de este, tiene un contenido de azufre promedio en un intervalo de entre el 15 y el 20 %, preferentemente dicho contenido de azufre promedio es de aproximadamente el 17 %.
7. Sulfato de dextrano, o dicho derivado farmacéuticamente aceptable de este, para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde dicho sulfato de dextrano, o dicho derivado farmacéuticamente
30 aceptable de este, tiene un peso molecular promedio en número (M_n) según lo medido mediante espectroscopía de resonancia magnética nuclear (NMR) dentro de un intervalo de entre 1850 y 2000 Da.
8. Sulfato de dextrano, o dicho derivado farmacéuticamente aceptable de este, para uso de acuerdo con la reivindicación 7, donde dicho sulfato de dextrano, o dicho derivado farmacéuticamente aceptable de este, tiene
35 en promedio 5,1 unidades de glucosa y un número de sulfato promedio por unidad de glucosa de entre 2,6 y 2,7.
9. Sulfato de dextrano, o dicho derivado farmacéuticamente aceptable de este, para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, donde dicho sulfato de dextrano, o dicho derivado farmacéuticamente aceptable de este, se formula para ser administrado en una dosificación en un intervalo entre 0,05 y 50 mg/kg de
40 peso corporal de dicho sujeto, preferentemente entre 0,05 y 30 mg/kg de peso corporal de dicho sujeto, y más preferentemente entre 0,1 y 15 mg/kg o entre 0,1 y 10 mg/kg de peso corporal de dicho sujeto.
10. Sulfato de dextrano, o dicho derivado farmacéuticamente aceptable de este, para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, donde dicho sujeto es un sujeto humano que sufre una enfermedad,
45 trastorno o afección médica que provoca isquemia en el cuerpo de dicho sujeto humano.
11. Sulfato de dextrano, o dicho derivado farmacéuticamente aceptable de este, para uso de acuerdo con la reivindicación 10, donde dicha enfermedad, trastorno o afección médica se selecciona del grupo que consiste en cicatrización de heridas, isquemia periférica, preferentemente isquemia posterior al trasplante de un órgano, tejido
50 y/o células, enfermedad arterial periférica, isquemia de las extremidades, piernas inquietas, síndrome de Raynaud, enfermedad de células falciformes o tromboangeítis obliterante; isquemia coronaria, preferentemente insuficiencia cardíaca congestiva, infarto de miocardio o enfermedad arterial coronaria; una enfermedad isquémica en niños, preferentemente una enfermedad perinatal o neonatal, lesión cerebral hipóxica o isquémica neonatal, encefalopatía por asfixia, parálisis cerebral; isquemia en el sistema nervioso central, preferentemente lesión cerebral traumática,
55 arteritis temporal, hipoxia provocada por esclerosis múltiple, apoplejía, esclerosis lateral amiotrófica; enfermedades distróficas musculares; isquemia provocada por lesiones trombóticas, hemorrágicas o traumáticas.
12. Sulfato de dextrano, o dicho derivado farmacéuticamente aceptable de este, para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, donde dicho derivado farmacéuticamente aceptable de este es una sal de
60 sulfato de dextrano, preferentemente una sal de sodio de sulfato de dextrano.

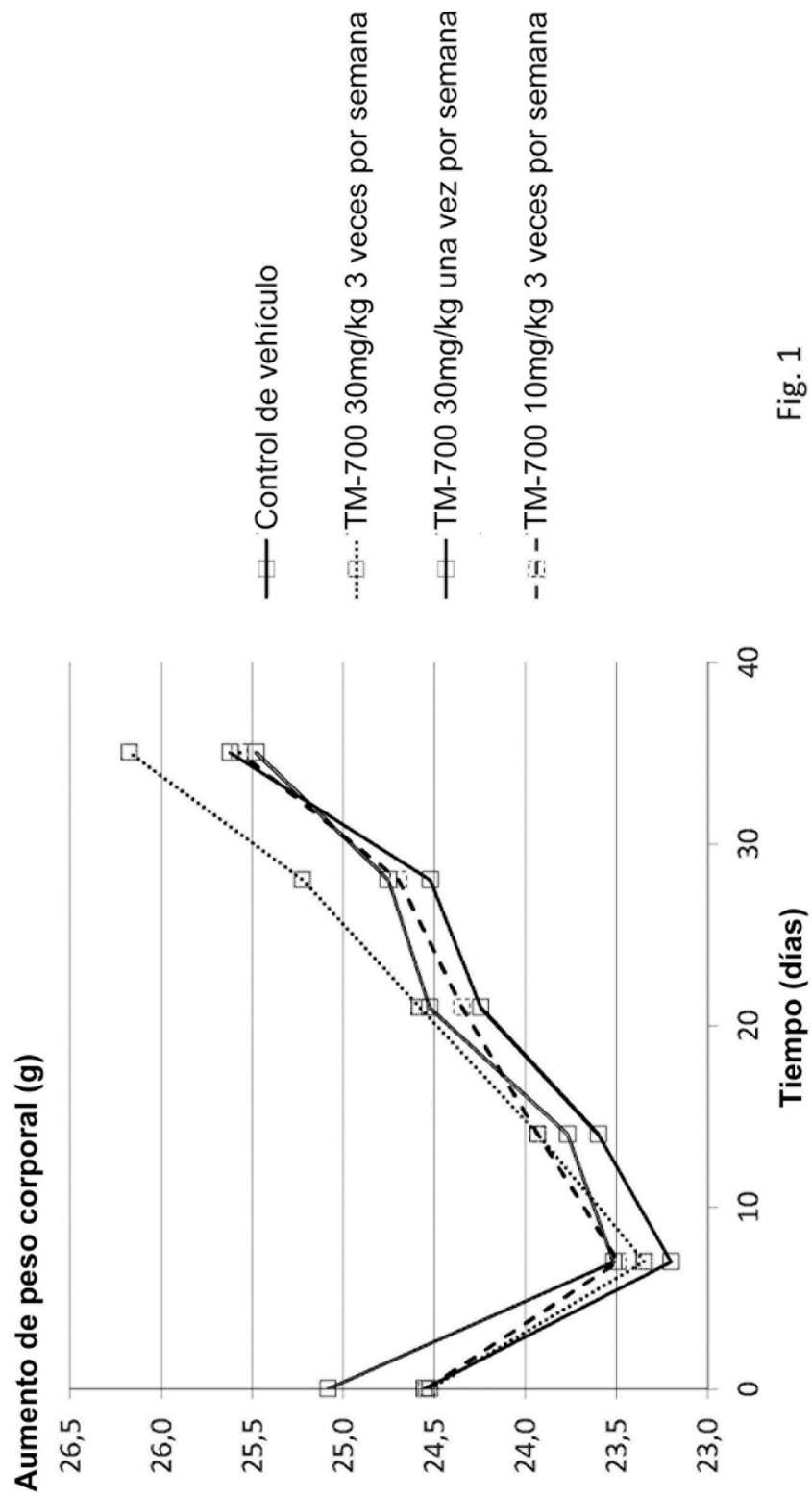


Fig. 1

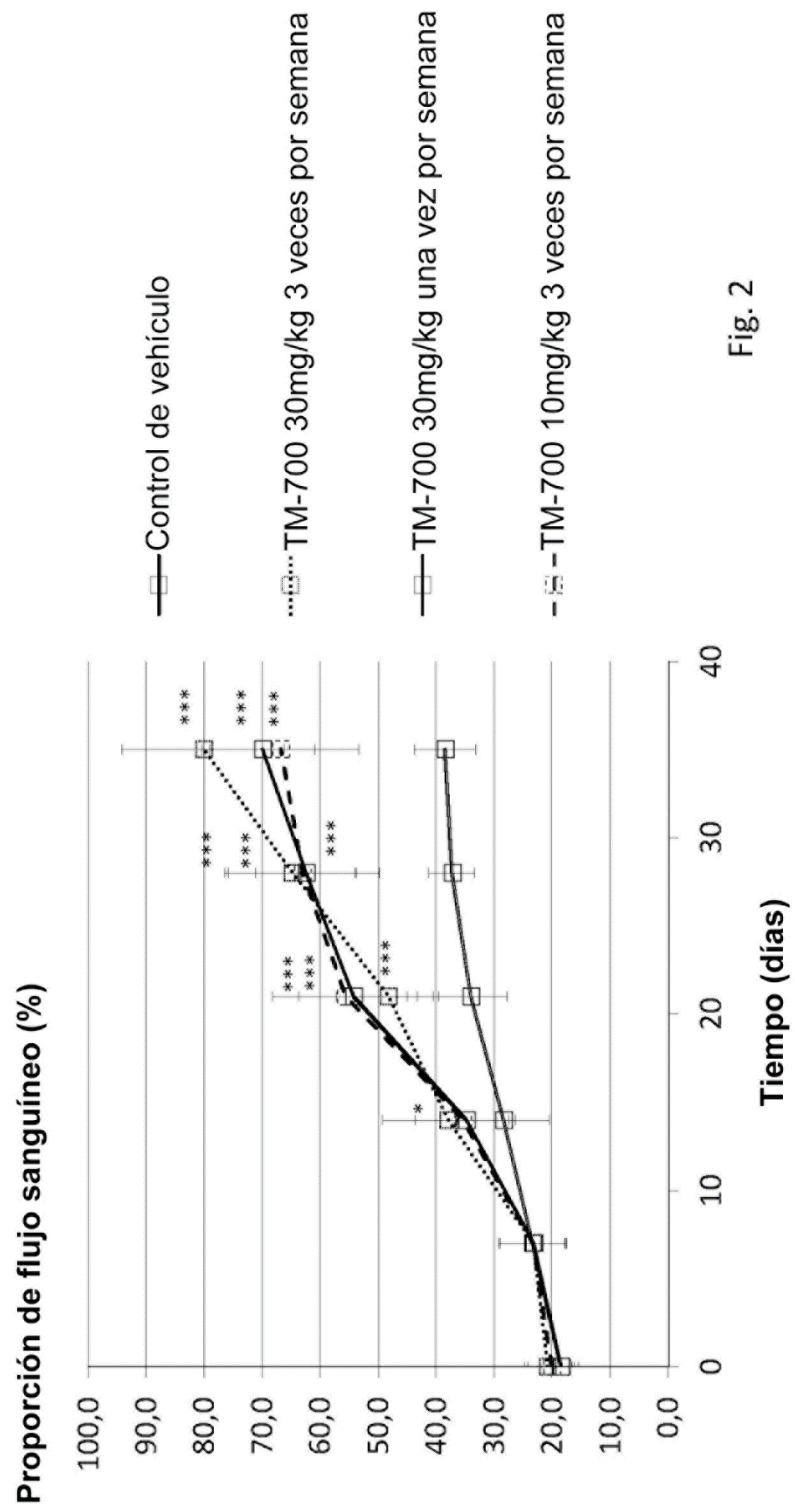
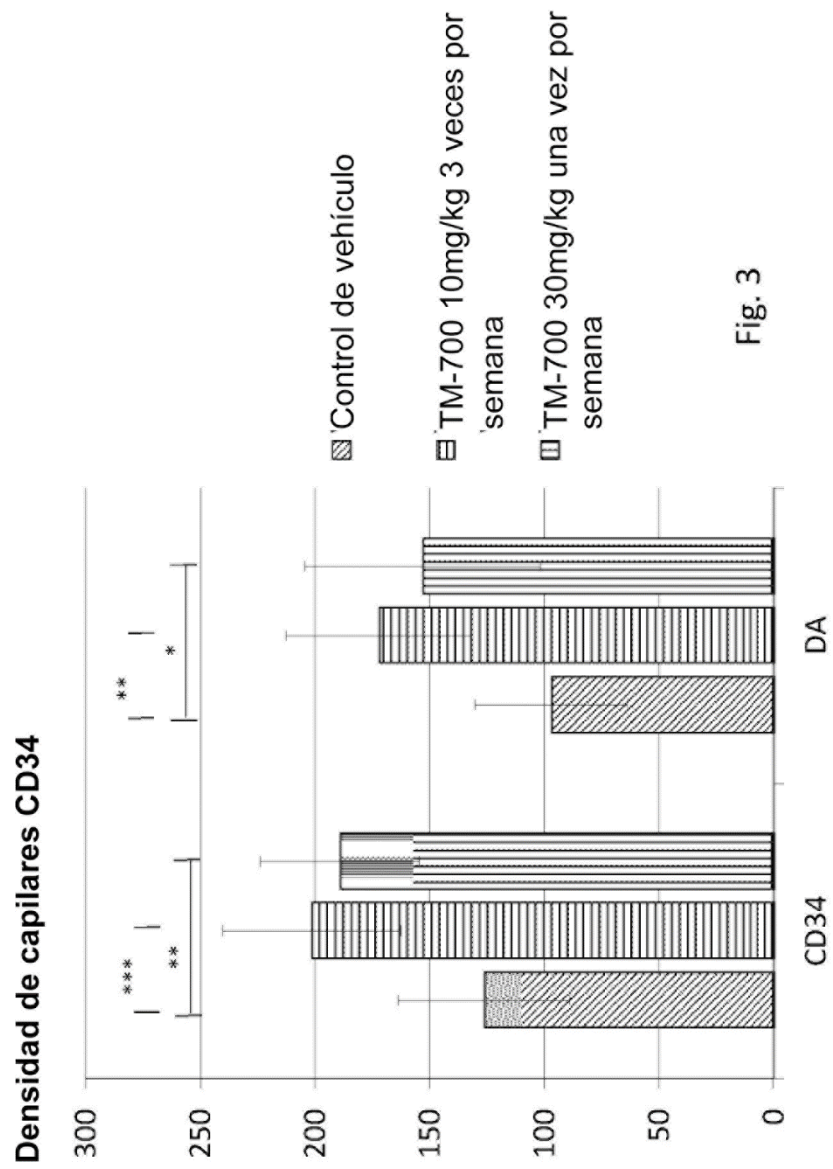


Fig. 2



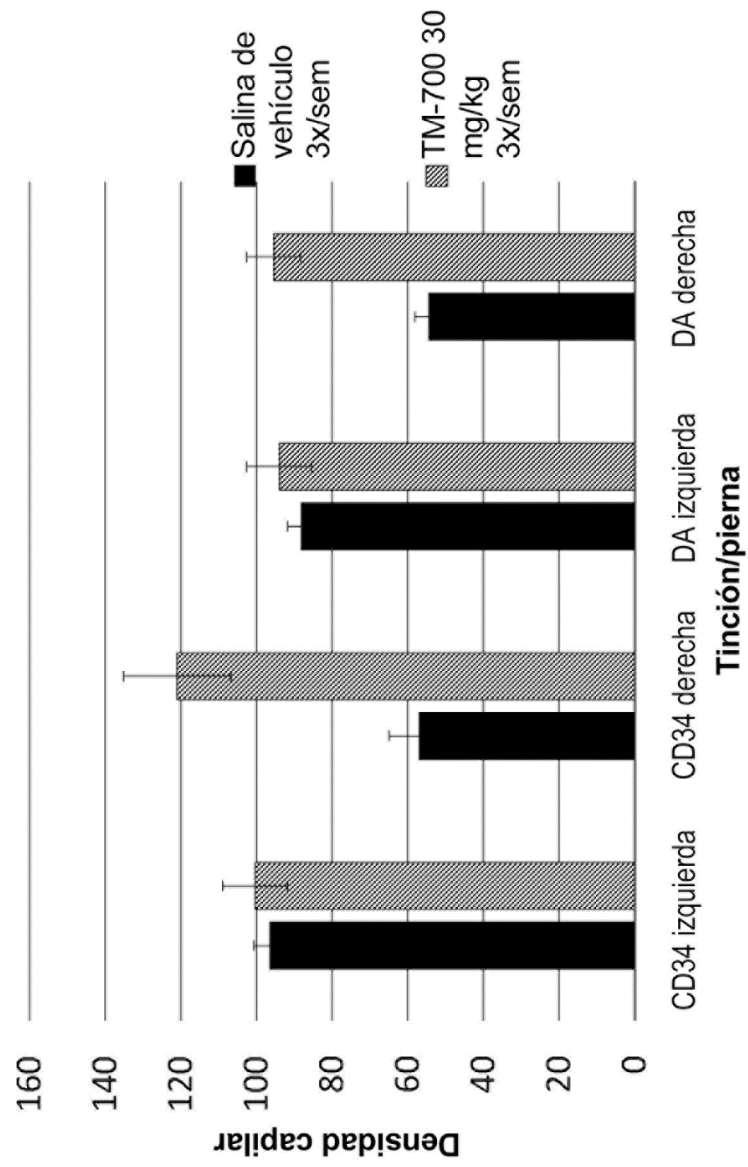
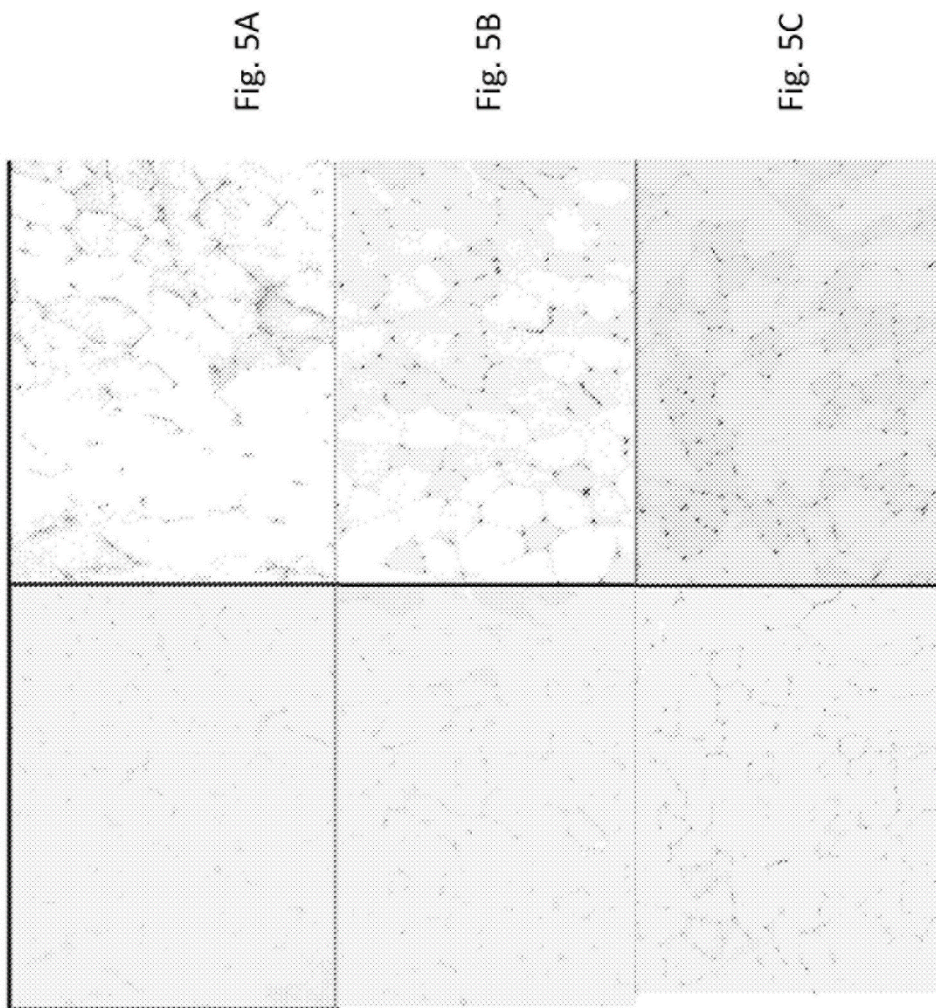


Fig. 4



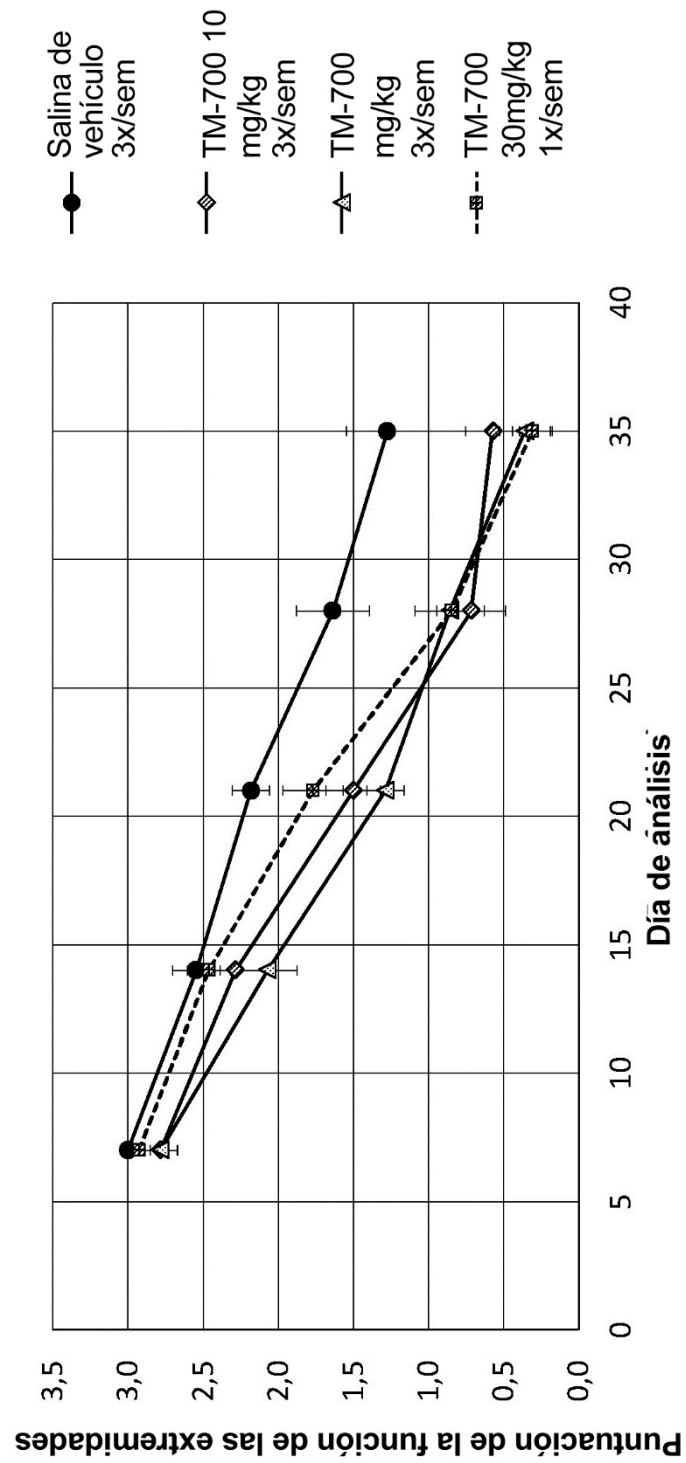
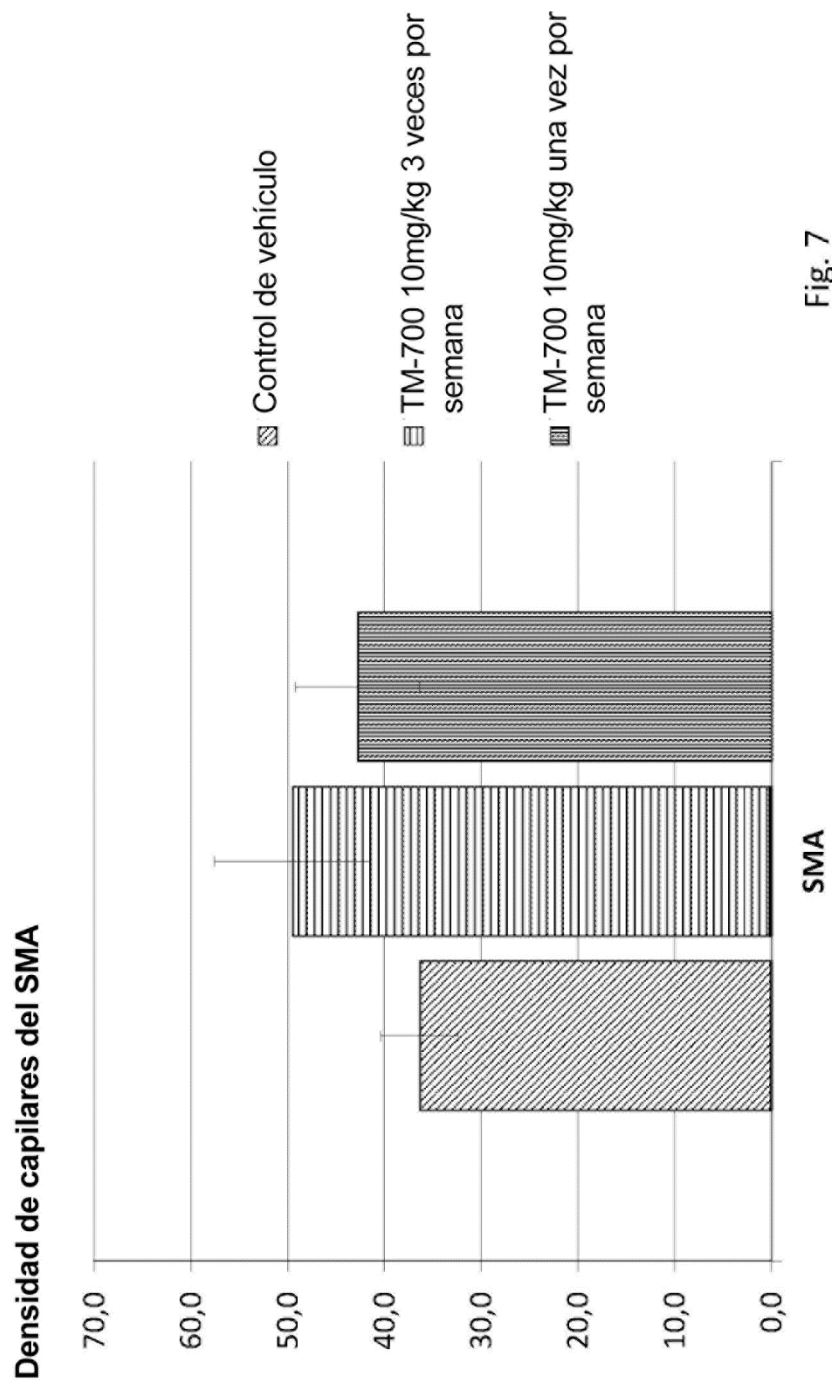


Fig. 6



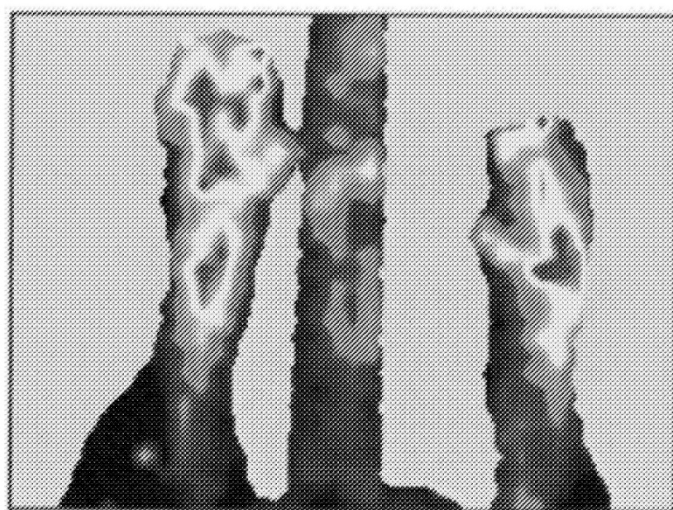


Imagen 1

Tratamiento
frente a control

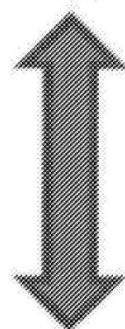


Fig. 8

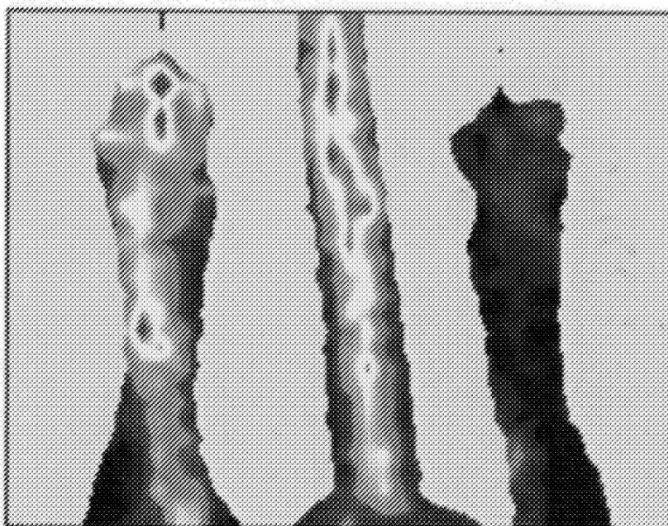


Imagen 1

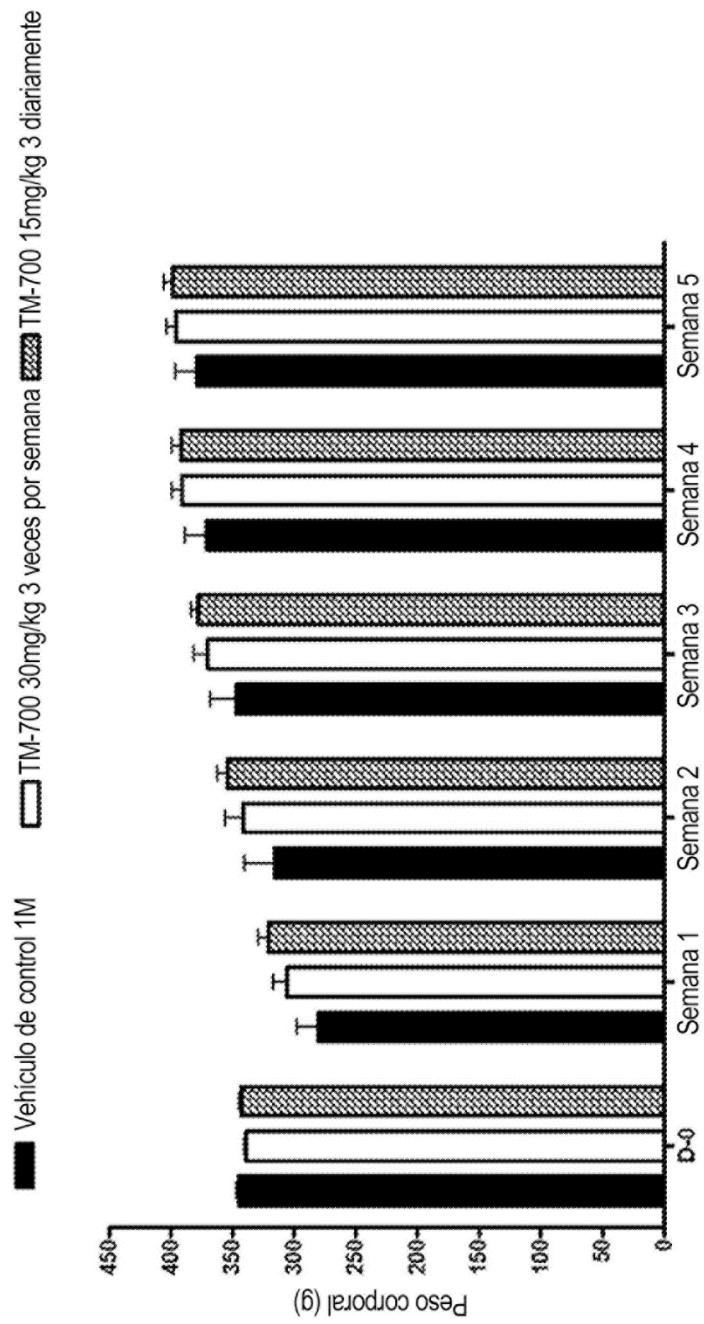


Fig. 9

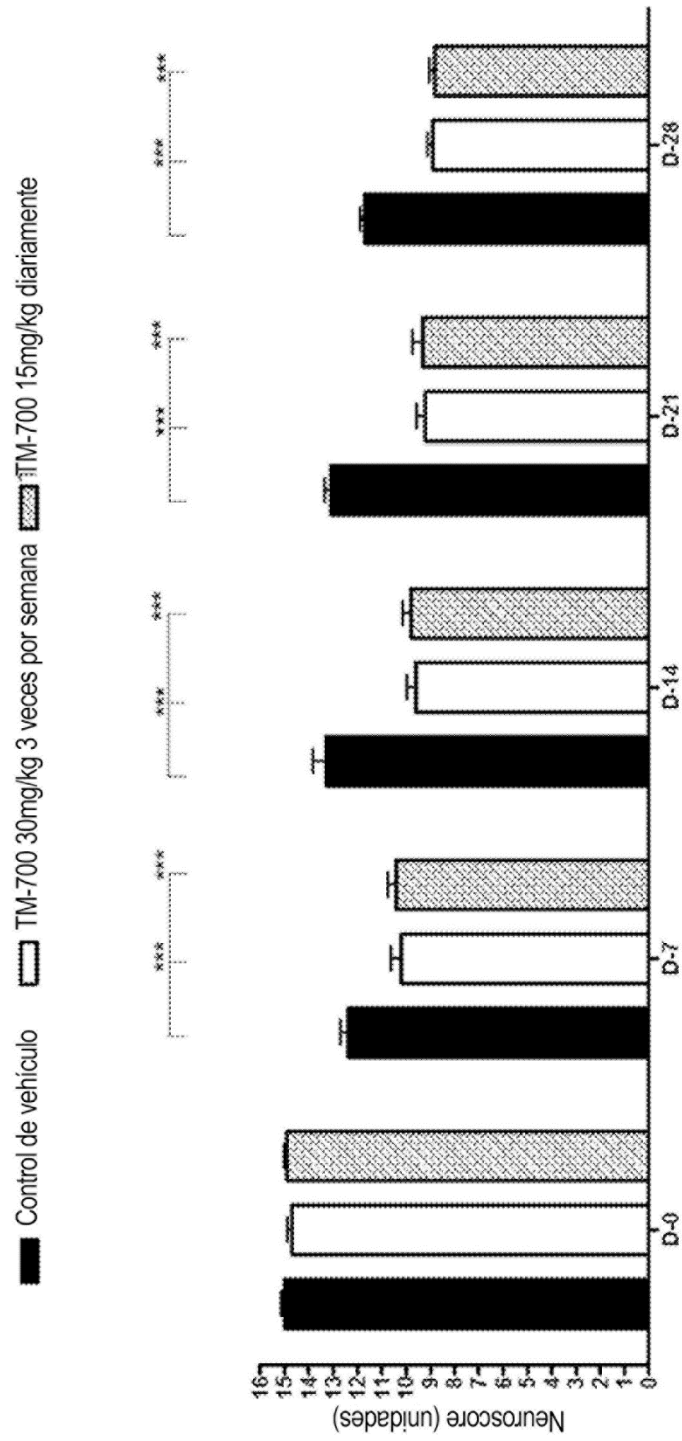


Fig. 10

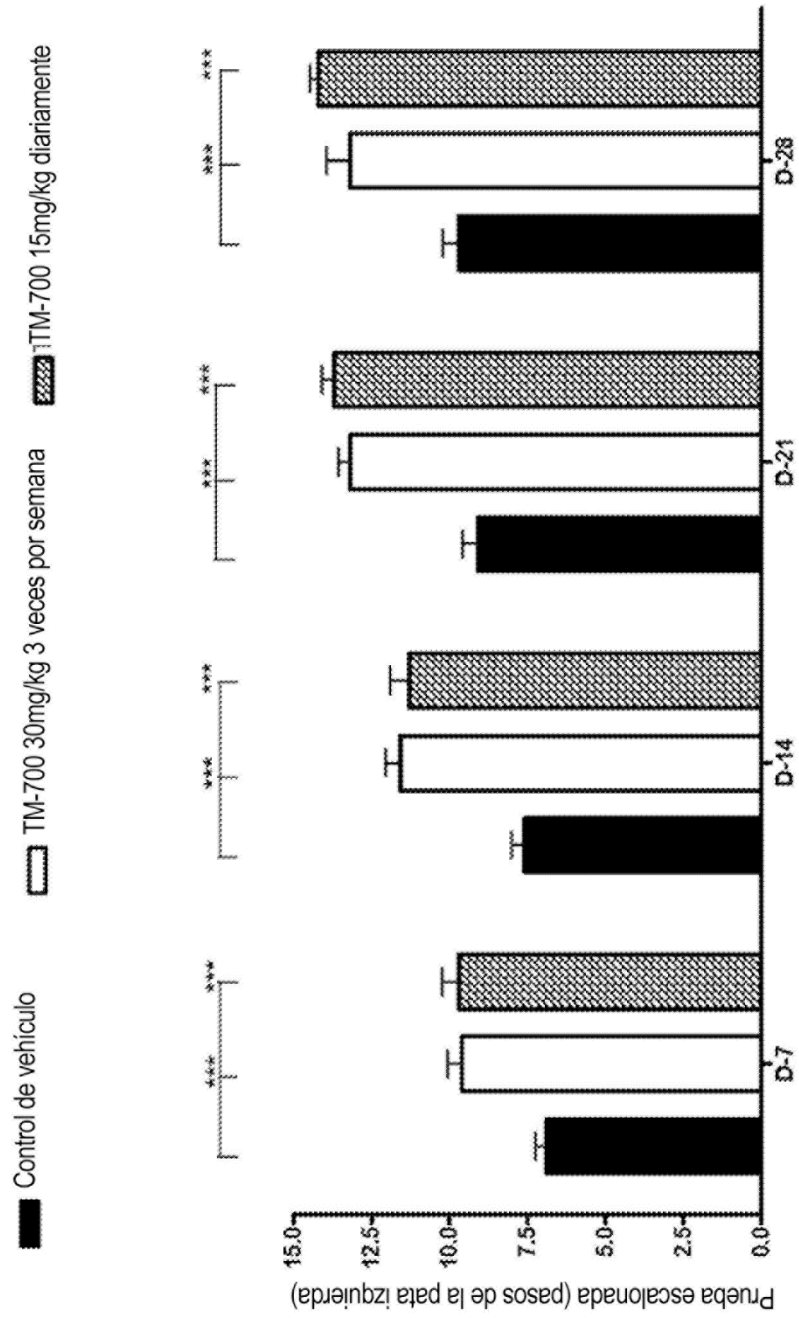


Fig. 11

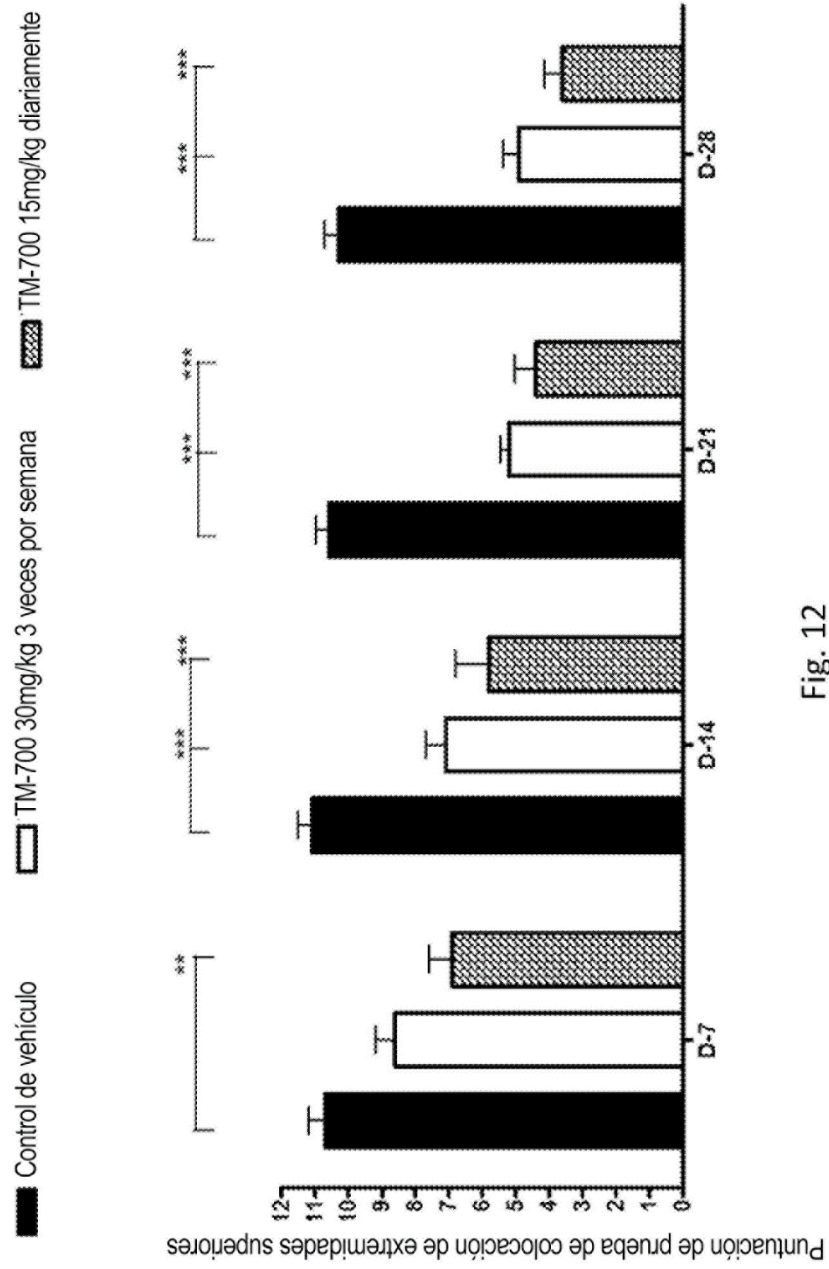


Fig. 12

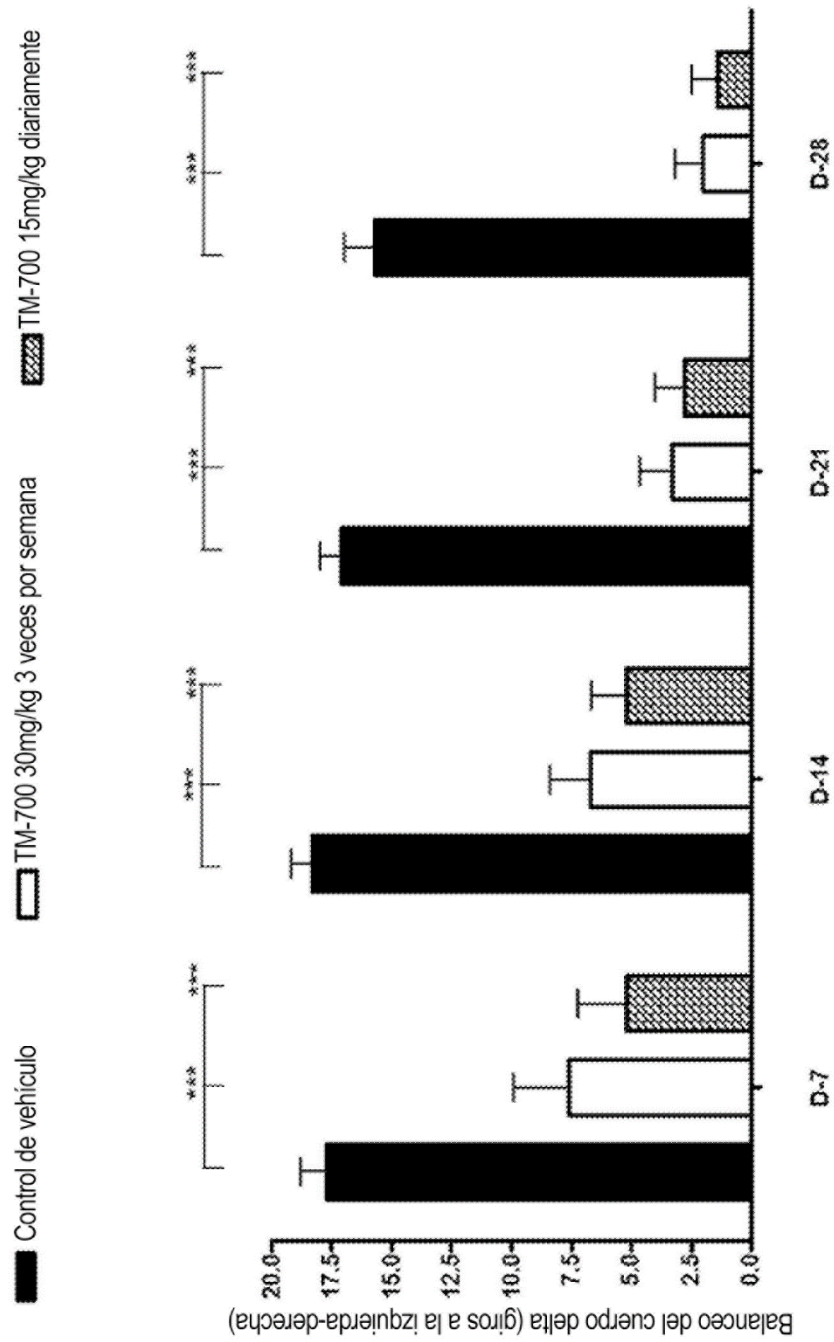


Fig. 13

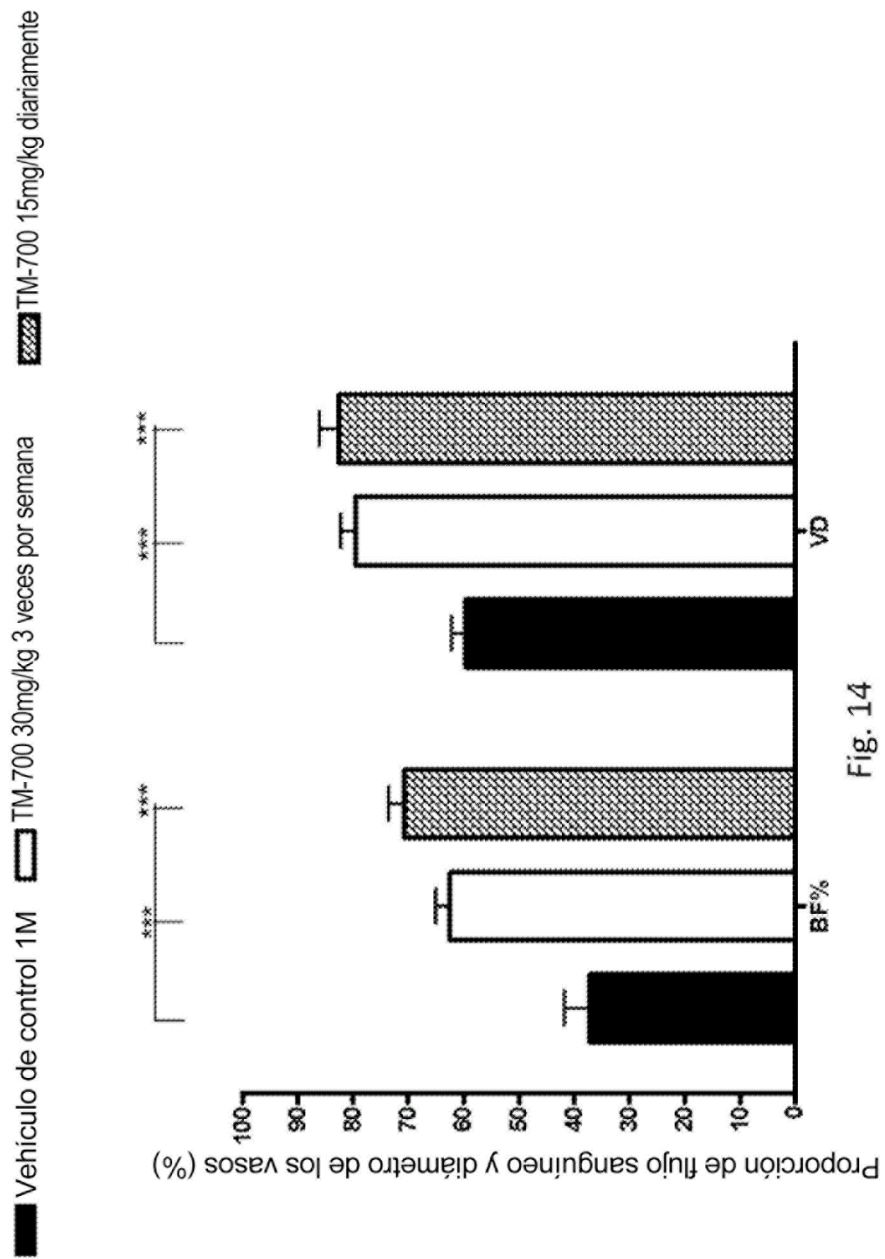


Fig. 14

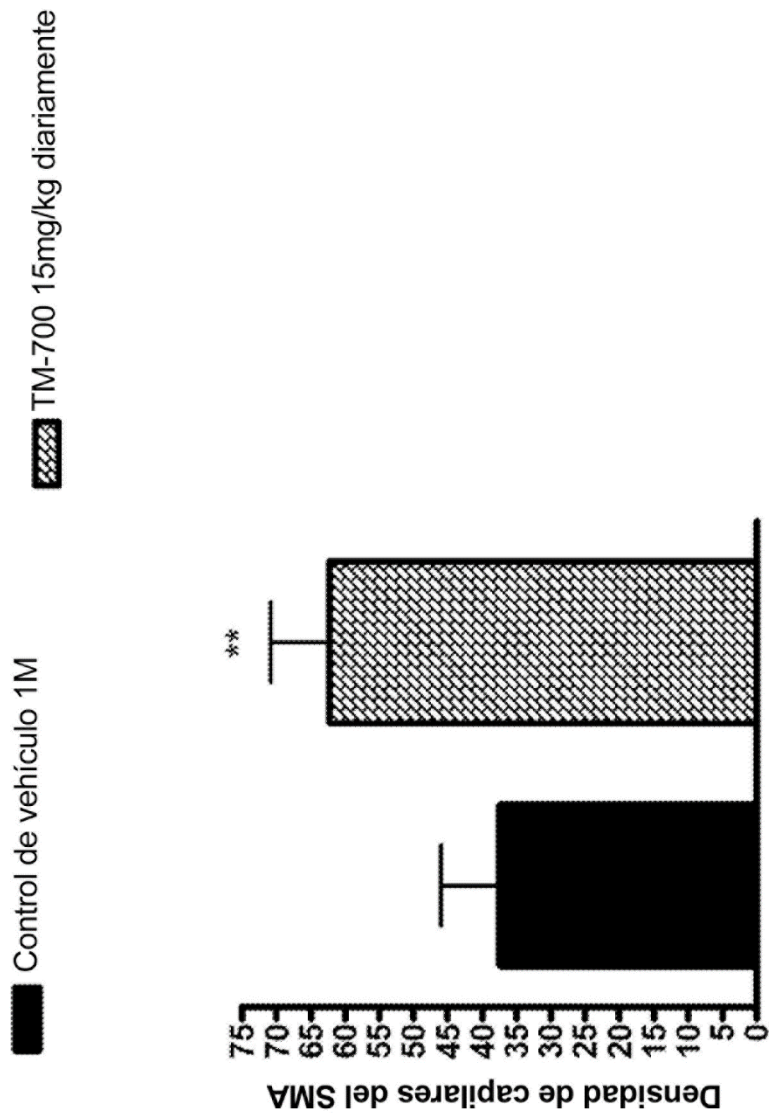


Fig. 15

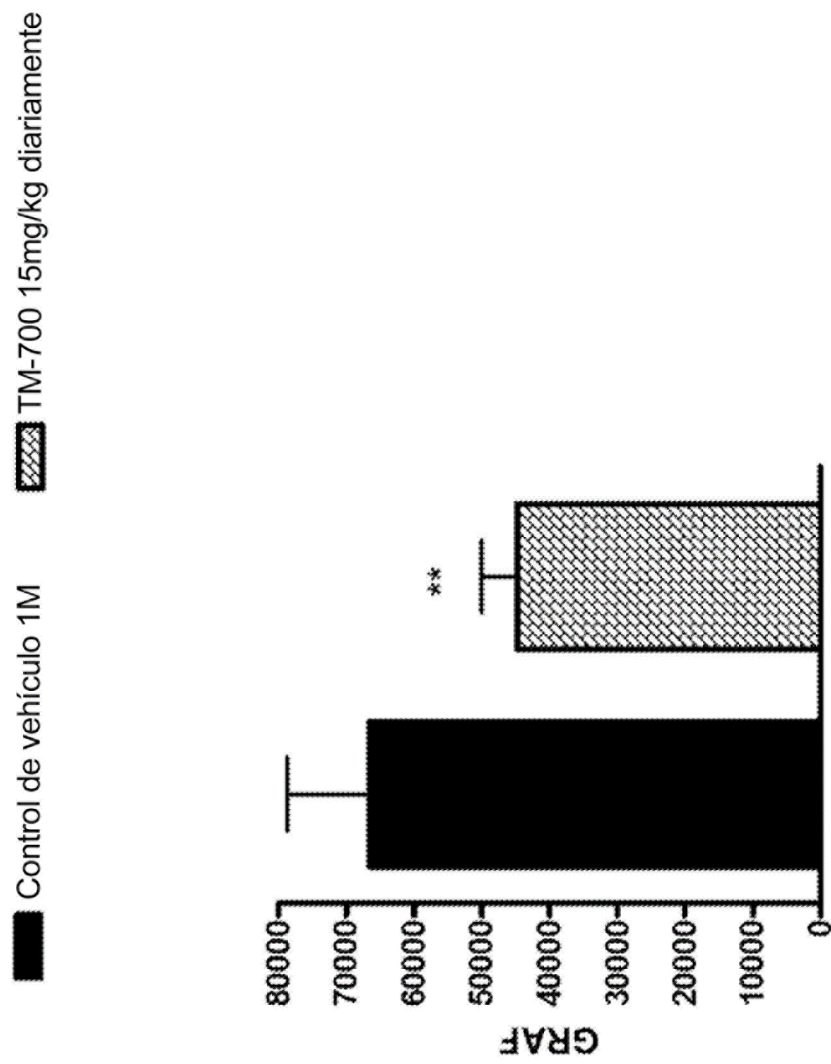


Fig. 16

SMA x10

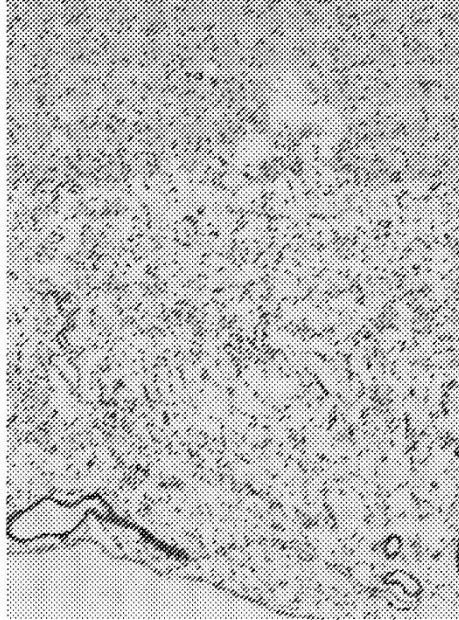


Fig. 17B

SMA x10



Fig. 17A

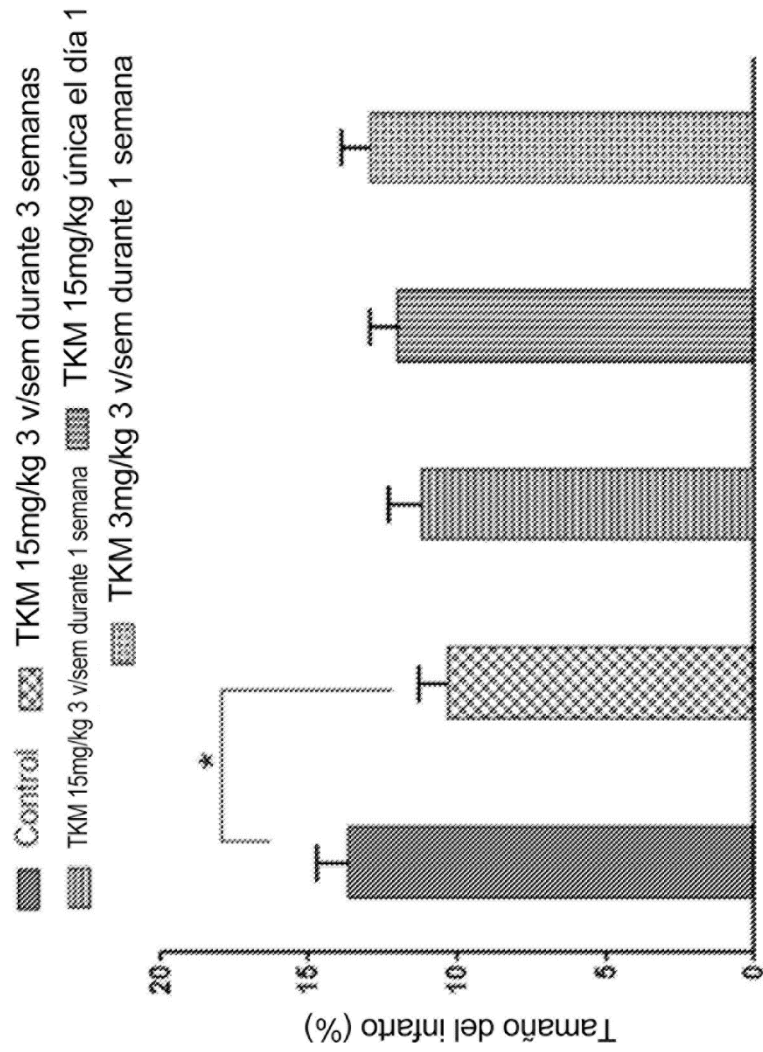


Fig. 18

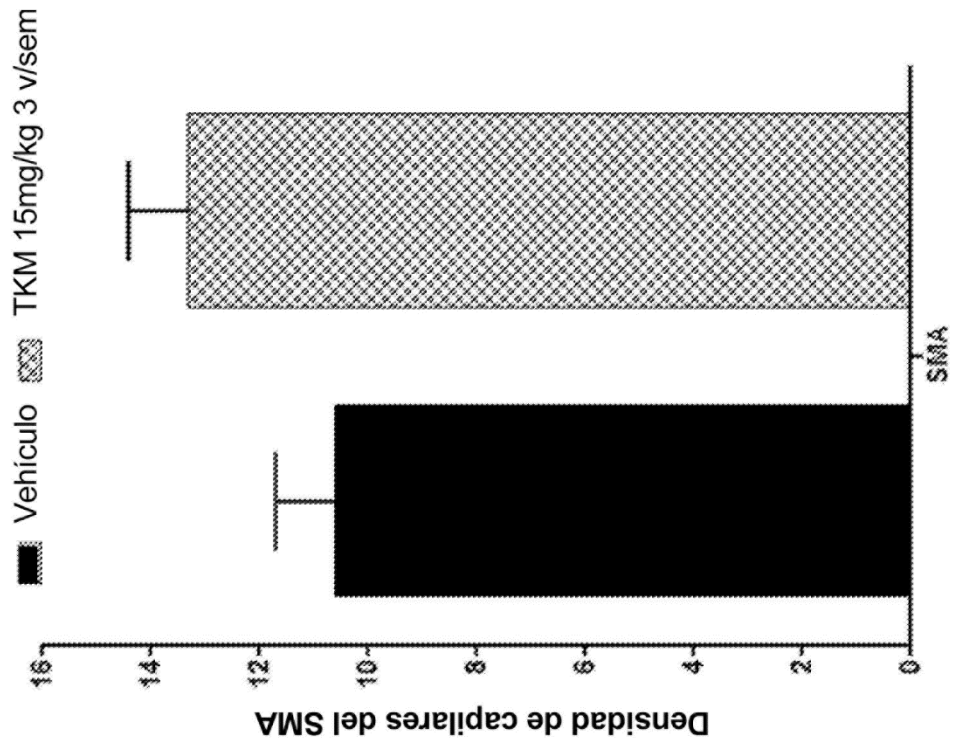


Fig. 19



Fig. 20B

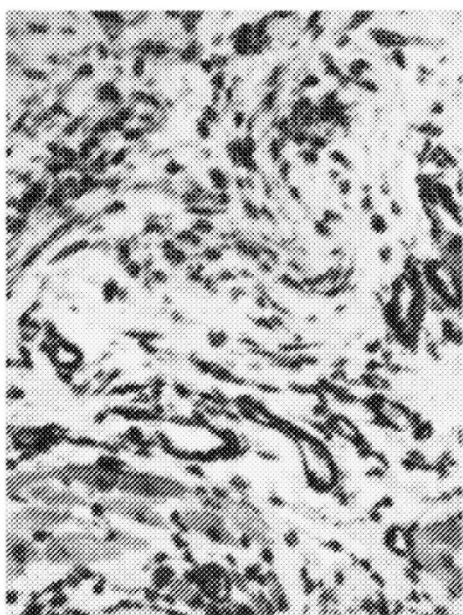


Fig. 20A

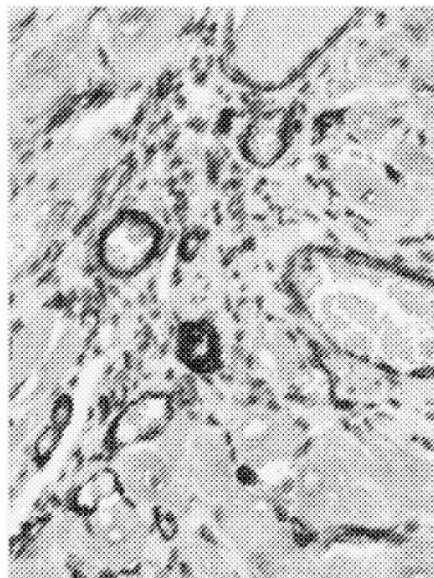


Fig. 20C

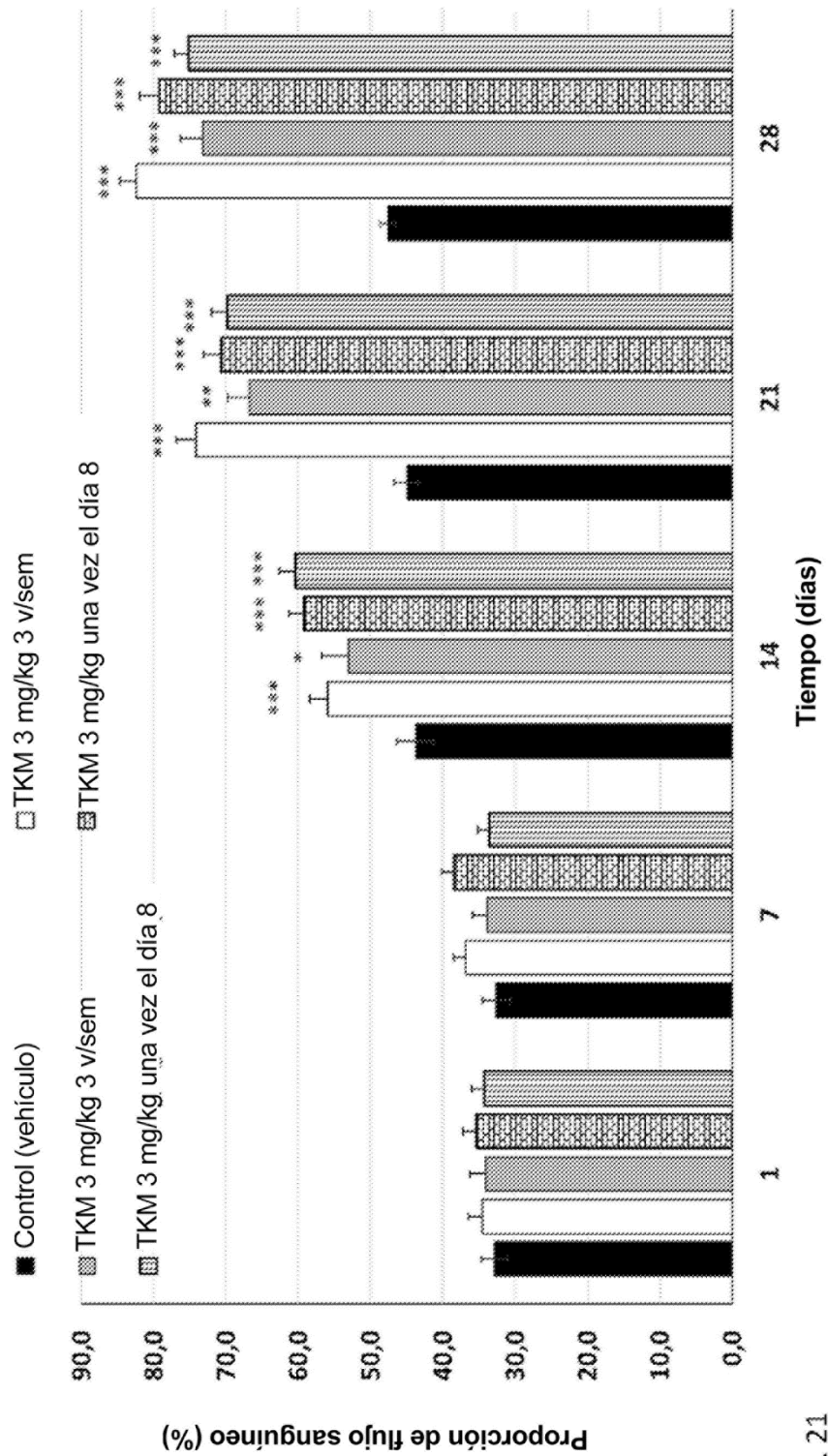


Fig. 21

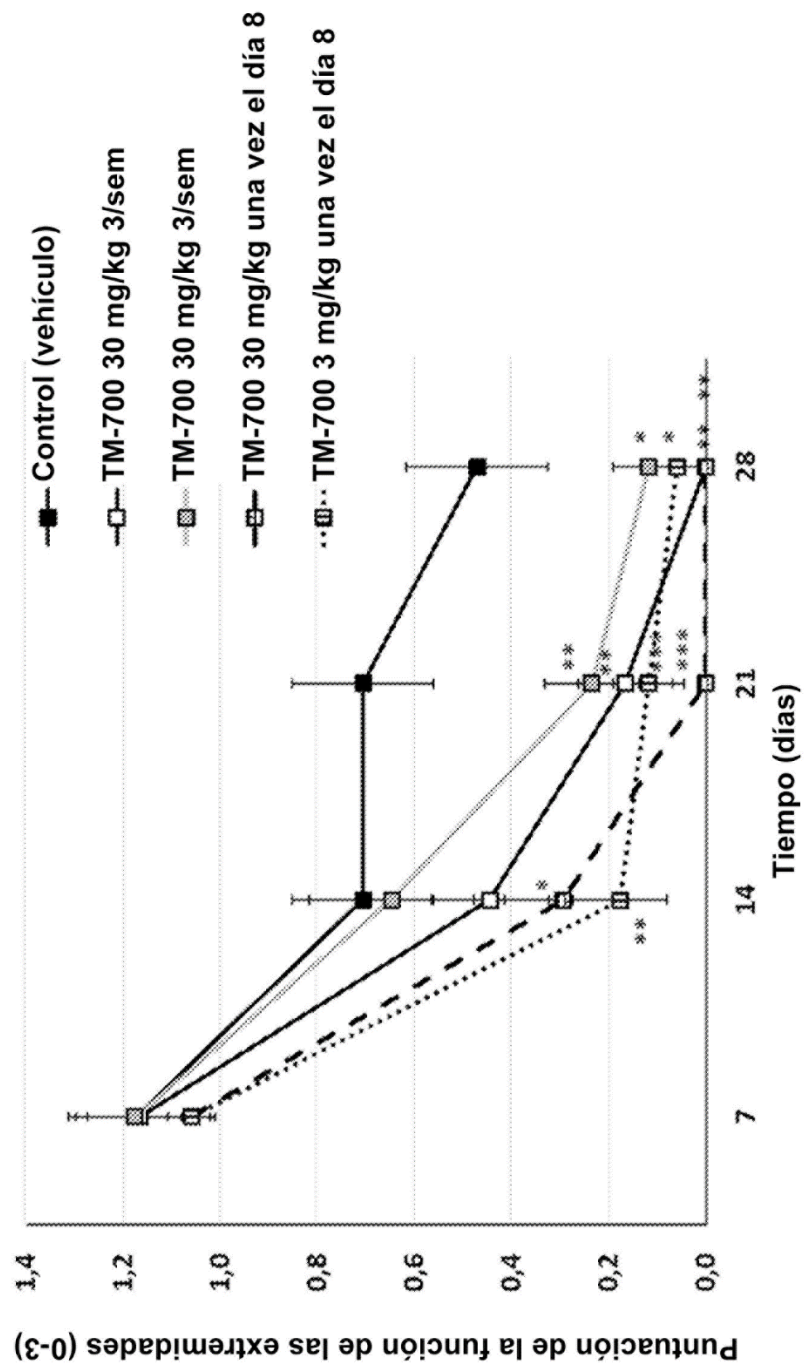
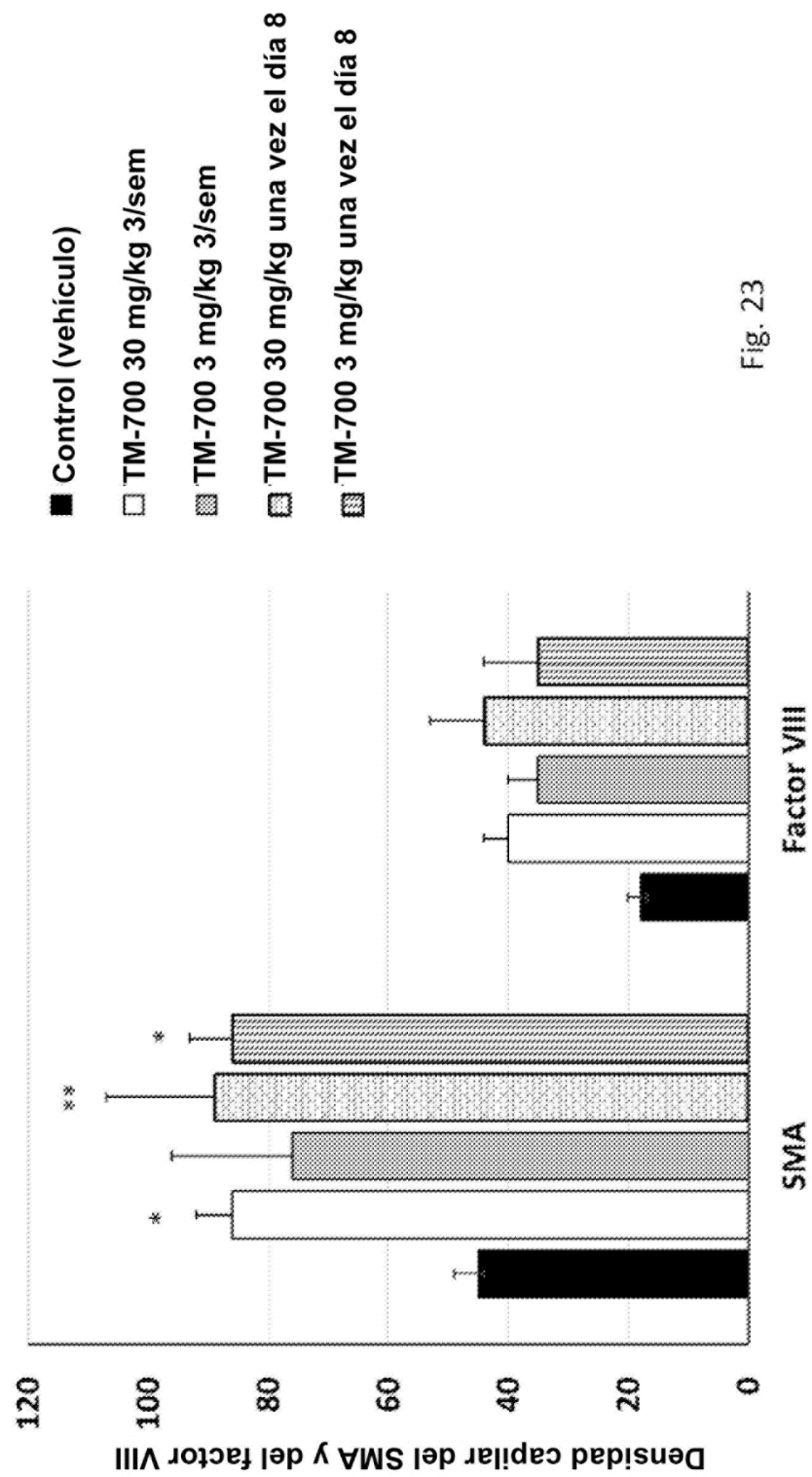


Fig. 22



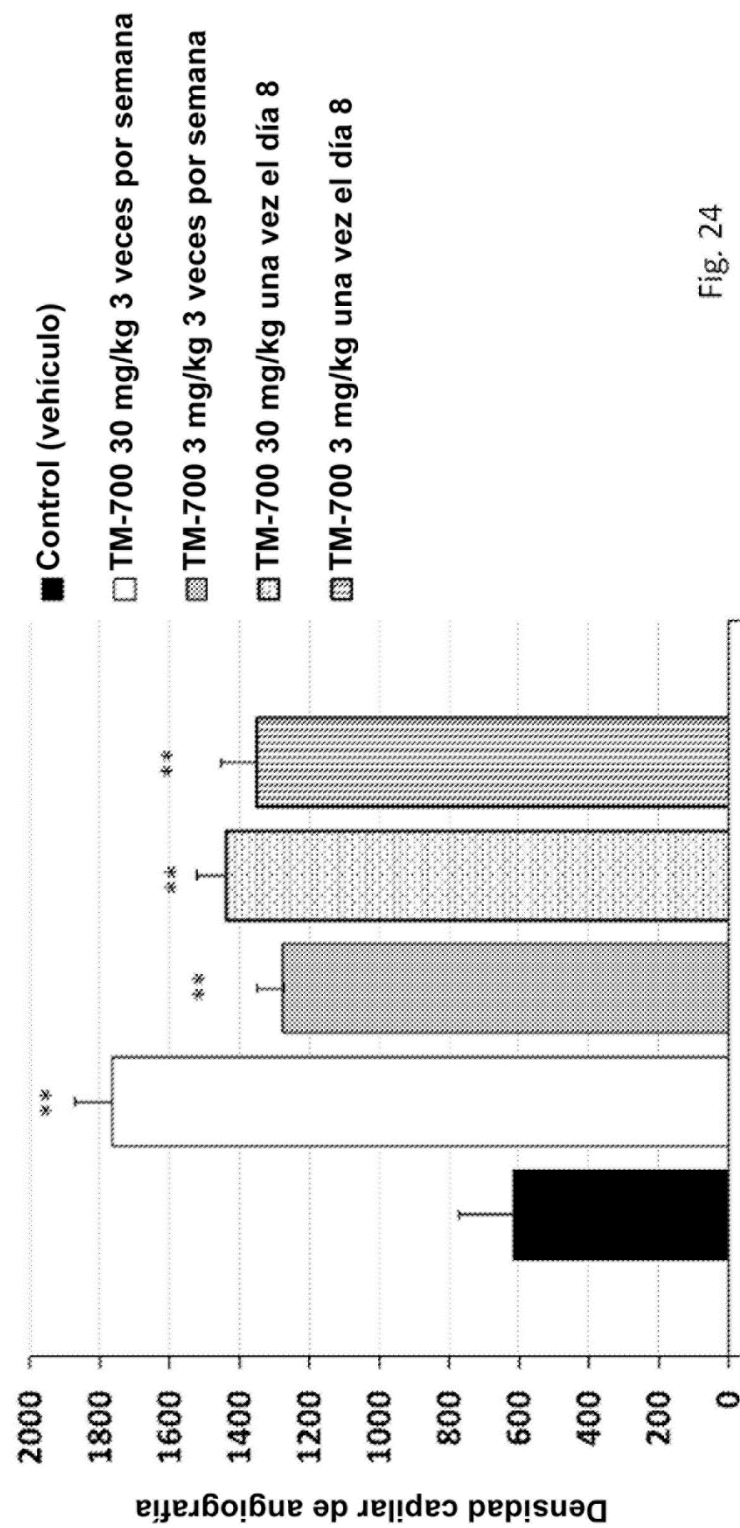


Fig. 24

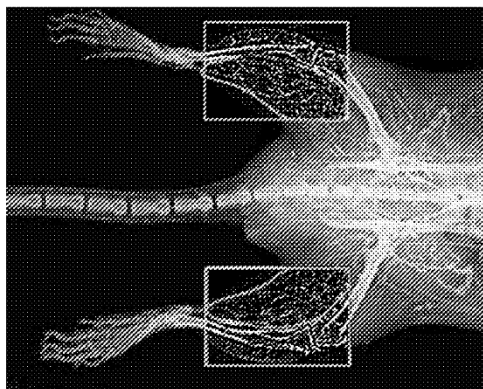


Fig. 25D

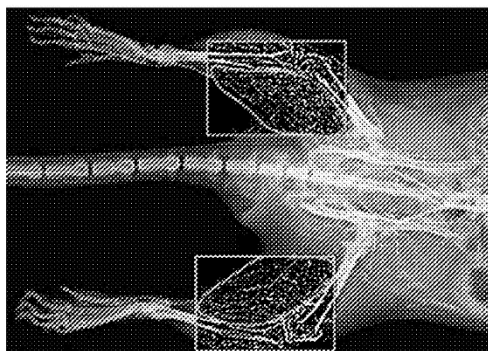


Fig. 25C

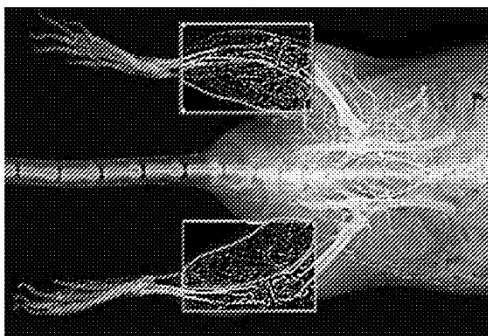


Fig. 25B

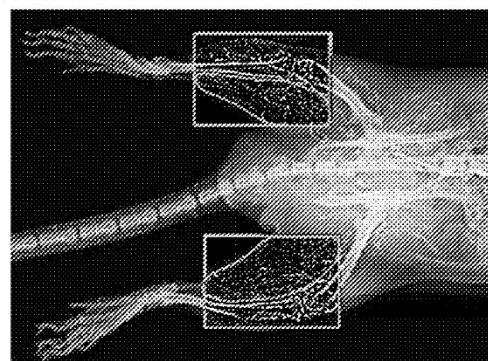


Fig. 25A