

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 755 053**

51 Int. Cl.:

**A61K 31/737** (2006.01)

**A61K 35/12** (2015.01)

**A61K 48/00** (2006.01)

**A61P 25/00** (2006.01)

**A61P 9/10** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.05.2016 PCT/EP2016/061905**

87 Fecha y número de publicación internacional: **01.12.2016 WO16189087**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.05.2016 E 16727364 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.09.2019 EP 3302573**

54 Título: **Composición para el tratamiento de lesiones cerebrales**

30 Prioridad:

**28.05.2015 EP 15305806**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**21.04.2020**

73 Titular/es:

**ORGANES TISSUS RÉGÉNÉRATION  
RÉPARATION REMPLACEMENT (25.0%)  
4 rue Française  
75001 Paris, FR;  
BARRITAU, DENIS (25.0%);  
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE  
SCIENTIFIQUE (25.0%) y  
L'UNIVERSITÉ DE CAEN BASSE-NORMANDIE  
(25.0%)**

72 Inventor/es:

**BARRITAU, DENIS;  
BERNAUDIN, MYRIAM;  
TOUZANI, OMAR;  
TOUTAIN, JÉRÔME y  
QUITTET, MARIE-SOPHIE**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

ES 2 755 053 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Composición para el tratamiento de lesiones cerebrales

## 5 Campo técnico

La presente invención se refiere a una composición farmacéutica para su aplicación como medicamento para el tratamiento de lesiones tisulares del sistema nervioso central debido a isquemia vascular cerebral, como se define en las reivindicaciones.

10 Se describe un kit farmacéutico para la prevención y/o tratamiento de lesiones tisulares del sistema nervioso central causadas por isquemia vascular cerebral.

15 La presente invención encuentra aplicación particularmente en los campos farmacéuticos, humano, y veterinario.

En la descripción a continuación, las referencias entre paréntesis ( ) se refieren al listado de referencias al final del texto.

## 20 Estado de la técnica

los accidentes cerebrovasculares (AVC) siguen siendo la principal causa de morbilidad y la tercera causa de muerte en el hombre en países industrializados. El precio a pagar por esta patología sigue siendo muy pesado: 10 a 12 % de todas las muertes después de los 65 años así como secuelas físicas, cognitivas o psicológicas en más de la mitad de las víctimas. Según la OMS, 15 millones de personas la padecen en todo el mundo cada año. Entre estas, 5 millones mueren y otros 5 millones quedan discapacitados de por vida. En Europa, el número de muertes por AVC se estima en aproximadamente 650000 cada año. En consecuencia, el impacto socioeconómico de los AVC es muy importante (5.300 millones de euros en 2007 en Francia (Chevreul *et al.*, 2013).

30 El AVC se define como la disminución del suministro sanguínea en una zona cerebral determinada. Hay dos tipos de AVC: el accidente hemorrágico, que corresponde a la pérdida de sangre del compartimento vascular hacia el compartimento celular como resultado de la ruptura del vaso sanguíneo, y el tipo isquémico del cual son víctimas el 80 % de los pacientes con AVC. Este último se debe a la disminución del flujo sanguíneo causada por una embolia correspondiente a un coágulo que se desprendería de la periferia y sería transportado a la arteria cerebral, o por una placa de aterosclerosis que finalmente ocluiría completamente el diámetro del vaso. La arteria más frecuentemente afectada por esta oclusión es la arteria Silviense o arteria cerebral media (MCA, Arteria Cerebral Media). Es una arteria que irriga una parte importante del hemisferio cerebral y cuya oclusión genera un deterioro sensoriomotor o cognitivo significativo (hemiplejía, hemiparesia, agnosia, déficits de memoria...) (Cramer, 2008; Jaillard *et al.*, 2009).

## 40 Tratamiento del AVC isquémico

La isquemia cerebral se puede definir como un desajuste entre el suministro de sangre y la demanda metabólica. Esto se debe a una disminución del flujo sanguíneo cerebral que puede ser transitoria o duradera. La lesión cerebral que acompaña a la isquemia focal generalmente consiste en un foco gravemente afectado y una zona periférica cuya viabilidad es precaria; esta zona, llamada penumbra, puede reclutarse por el proceso de necrosis a menos que se instituya una intervención terapéutica a tiempo (Touzani *et al.*, 2001). La penumbra isquémica representa por lo tanto el objetivo de cualquier intervención terapéutica durante la fase aguda de la isquemia cerebral.

50 A pesar del importante problema de salud pública que representa el AVC, el arsenal terapéutico para luchar contra este último es bajo. En la actualidad, solo la trombólisis por t-PA (activador tisular del plasminógeno) está aprobada por las autoridades sanitarias. Sin embargo, el uso del t-PA está limitado por su ventana terapéutica débil, es decir, de 3 a 4,5h después del inicio del AVC y las numerosas contraindicaciones asociadas con él, relacionadas con el riesgo de hemorragia cerebral (ausencia de tratamiento anticoagulante, ausencia de accidente isquémico (cerebral o cardíaco) en los últimos 3 meses, ausencia de hemorragia gastrointestinal o urinaria en los últimos 21 días, ausencia de sangrado, presión arterial < 185/110 mmHg sistólica/diastólica...). Según Lees y colaboradores (2010), la administración del rt-PA después de un retraso superior a 4h30 induce un riesgo de hemorragia cerebral significativamente mayor que en pacientes no tratados, y se asocia con un balance desfavorable de beneficio-riesgo (Lees *et al.*, 2010). De esta manera, se estima que solo del 3 al 5 % de los pacientes pueden usar este tratamiento (Adeoye *et al.*, 2011) y a pesar de la estricta selección de los pacientes, se estima que el 13 % de ellos desarrollará una hemorragia cerebral como resultado de la administración de rt-PA.

60 Por lo tanto existe una necesidad real de encontrar una nueva composición/medicamento que supere estos defectos, inconvenientes y obstáculos, en particular una composición que permita en particular tratar/detener un AVC que presente en particular una ventana de tratamiento ampliada y/o que disminuya/elimine los efectos secundarios debidos al tratamiento.

65 Además de la trombólisis con t-PA, Numerosas investigaciones en animales han demostrado la eficacia potencial de

varias estrategias terapéuticas destinadas a proteger las neuronas contra la isquemia (Kaur *et al.*, 2013). Entre estas estrategias, podemos mencionar el bloqueo de los canales de calcio, inhibición del estrés oxidativo, estimulación de los receptores GABA A, inhibición de los receptores NMDA y AMPA. Sin embargo, en clínica humana, no se ha encontrado el éxito de estas intervenciones terapéuticas (Kaur *et al.*, 2013).

5 Por lo tanto existe una necesidad real de encontrar una nueva composición/medicamento para tratar el accidente cerebrovascular y sus consecuencias en los tejidos.

10 Dados los fracasos dramáticos de varios ensayos clínicos que han probado intervenciones terapéuticas de neuroprotección después de un accidente cerebrovascular en humanos, muchos autores están avanzando hacia el desarrollo de estrategias de reparación cerebral aplicables durante la fase subaguda o crónica de la patología. Estas estrategias incluyen la provisión de factores neurotróficos o el trasplante de células madre para favorecer la recuperación funcional.

15 Células madre e isquemia cerebral

Se han probado varios tipos de células madre en animales sometidos a isquemia cerebral. Entre los cuales podemos mencionar las células madre embrionarias (ESC), células madre pluripotentes inducidas (iPSC), células madre neurales (CSN) y células madre mesenquimales (MSC) (para revisión, véase Hao *et al.*, 2014). Aunque las ESC y las iPSC han mostrado efectos beneficiosos en animales después de la isquemia, sus problemas de disponibilidad (para las ESC) y su capacidad para convertirse en tumores limitan, por el momento, su uso en humanos. En efecto, se ha demostrado que estas células causan la generación de tumores después de la inyección.

20 Las células madre neurales (NSC) se encuentran en el tejido fetal, tejido neonatal, en jóvenes pero también en adultos. Los nichos de células madre neuroblásticas en humanos y animales son la zona subventricular (SVZ) y la zona subgranular del giro dentado (Seri *et al.*, 2006). Estas células, aunque ya orientadas en su diferenciación se llaman cepas porque son capaces, en el contexto de protocolo de diferenciación particular, de diferenciarse en neuronas del hipocampo, neuronas corticales o motoneuronas o interneuronas. En la bibliografía existen numerosos estudios que han demostrado efectos beneficiosos del trasplante de las CSN después de la isquemia cerebral, por ejemplo, como se describe en el documento Hao y colaboradores, 2014. Por ejemplo, la administración de las CSN en la lesión cortical isquémica o en su periferia favorece la producción de neuroblastos en la SVZ. Una estimulación de la arborización dendrítica y el crecimiento axonal correlacionado con un aumento en la recuperación funcional se observa después de su administración a ratas (Andres *et al.*, 2011). Sin embargo, varias restricciones limitan el uso de estas células en clínica. En efecto, el aislamiento de estas células a partir de fetos es difícil por las limitaciones éticas. Otra fuente de CSN es la biopsia cerebral de la SVZ, que no se puede realizar más que en el caso de isquemia post-mortem limitando en gran medida la cantidad de recursos y haciendo imposible que el paciente use autoinjerto.

30 Otra vía explorada es el uso de otras células madre más accesibles, como las células madre mesenquimales (MSC). Estas células fueron identificadas por primera vez por Friedenstein y colaboradores en 1970, quienes las caracterizaron como adherentes al plástico y raras (Friedenstein *et al.*, 1970). Varias fuentes se han identificado y utilizado entre ellas mayoritariamente la médula ósea, pero también pulpa dental (Yalvac *et al.*, 2009; Yamagata *et al.*, 2013), folículo piloso (Wang *et al.*, 2013), placenta (In 't Anker *et al.*, 2004) o cordón umbilical (Erices *et al.*, 2000; Kranz *et al.*, 2010)

45 Como todas las células madre, las MSC pueden diferenciarse en células especializadas y autorrenovarse. Las MSC pueden diferenciarse, *in vitro* en varios tipos celulares y en un entorno y condiciones adecuados, son capaces de diferenciarse hacia un fenotipo no mesenquimatoso como el fenotipo neuronal o cardiomiocítico (Esneault *et al.*, 2008; Toma *et al.*, 2002). La facilidad de acceso y extracción de estas células de la médula ósea y su multiplicación rápida y fácil podrían permitir realizar injertos autólogos que pueden limitar el uso de tratamientos inmunosupresores que son difíciles de tolerar por los pacientes. Por otro lado, las células madre mesenquimales no expresan el complejo principal de histocompatibilidad (CMH) de tipo II (HLA-DR o HLA tipo II) y poco el MHC de o I (HLA-ABC o HLA tipo I) a nivel de la membrana. Asimismo, Di Nicola y colaboradores en 2002 demostraron la disminución de la proliferación de linfocitos T en condiciones de cocultivo con las MSC y de manera reversible y dependiente de la dosis (Di Nicola, 2002). Además de los linfocitos T, las MSC pueden exhibir acción antiinflamatoria sobre otras células inflamatorias como los Citolíticos Naturales, células dendríticas o macrófagos (Aggarwal y Pittenger, 2005; Eckert *et al.*, 2013). Los ensayos clínicos realizados en el contexto de patologías cardíacas, nerviosas o incluso inmunes en principio no han mostrado evidencia de efectos indeseables graves después de la administración de las MSC (Malgieri *et al.*, 2010).

60 En la isquemia cerebral, un beneficio funcional post-isquémico obtenido después de la administración de las MSC fue demostrado por estudios preclínicos y algunos estudios clínicos como se resume en Hao *et al.*, 2014, y Kaladka y Muir, 2014.

65 Con respecto a estudios clínicos, Bang y colaboradores (2005) administraron las MSC por primera vez a pacientes con isquemia cerebral. Este primer estudio se realizó en pocos pacientes (5 frente a 25 controles) pero reveló una ausencia de desarrollo tumoral y una posible viabilidad de la administración autóloga de las MSC en pacientes con AVC. Los autores observaron una mejora de la recuperación funcional post-isquémica de los pacientes tratados 3 a 6

meses después del tratamiento. Estos resultados se confirmaron en 2010 mediante la administración IV de las MSC en 16 pacientes con AVC. En particular, se observó una disminución relativa de la mortalidad de los pacientes tratados. Se mostró un efecto beneficioso del tratamiento en la recuperación funcional durante un período de observación de 5 años utilizando mRS (Lee *et al.*, 2010). Después, otros estudios han reforzado el concepto de viabilidad y seguridad de esta nueva estrategia terapéutica (Bhasin *et al.*, 2011; Suárez-Monteaquedo *et al.*, 2009). Varios fenómenos explican la eficacia de las MSC, como su propiedad paracrina sobre los factores de crecimiento neurogénico o angiogénico (FGF2, NGFb, EGF, VEGF-A IGF1, BDNF).

El documento Marie-Sophie Quittet *et al.* "Effects of mesenchymal stem cell therapy in association with pharmacologically active microcarriers releasing VEGF, in an ischaemic stroke model in the rat" *acta biomaterialia*, vol 15, 31 de diciembre de 2014; p 77-88, enseña el uso de microvehículos farmacológicamente activos (PAM) que liberan VEGF y que transportan laminina unida a células en modelos de AVC en rata. Este documento también menciona que las células madre mesenquimales atenúan la pérdida neuronal y aceleran la aptitud funcional después de un accidente cerebrovascular.

El documento Lei Hao *et al.* "Stem cell based therapies for ischemic stroke", *Biomed. Res. Int.*, vol 7, no 10, enero 2014, página 3298-17, describe que las terapias celulares que usan células madre embrionarias, células madre inducibles pluripotentes, células madre neurales y células madre mesenquimales tienen efectos beneficiosos sobre el tratamiento del AVC. Este documento también enseña que estos efectos podrían deberse al reemplazo celular, neuroprotección, neurogénesis endógena, angiogénesis, y modulación de la respuesta inflamatoria e inmunitaria.

El documento FR 2781485 describe un biopolímero y su uso independientemente en numerosas condiciones en las cuales la SOD (Super Óxido Dismutasa) tiene un efecto beneficioso. Este documento también describe un efecto protector de un compuesto RGTA 1005 en una isquemia muscular. Este documento divulga biopolímeros para tratamiento o prevención del dolor cerebral, sistema nervioso central, lesiones tisulares, por ejemplo durante una isquemia muscular.

El documento Chevalier Fabien *et al.*: "Glycosaminoglycan mimetic improves enrichment and cell functions of human endothelial progenitor cell colonies" *Stem Cell research*, vol 12, no 3, p 703-715, 2014, describe que los miméticos GAG pueden potenciar los efectos *in vivo* de la terapia celular. Crean un microambiente favorable antes del trasplante celular y aumentan la reparación de células y tejidos, por ejemplo vascular.

Sin embargo, a pesar de los muchos beneficios que presentan, las MSC tienen una supervivencia muy limitada después de la administración en una zona isquémica. En efecto, el 99 % de las células mueren durante las primeras 24 horas y, según Toma y colaboradores (2002), solo el 0,5 % de las MSC implantadas en un entorno isquémico sobreviven 4 días después de la implantación. Varios fenómenos explican esta pérdida celular (Toma *et al.*, 2002). En efecto, inflamación, hipoxia, anoikis (falta de soporte) o los factores proapoptóticos presentes en el entorno circundante inducen la aparición de apoptosis. Además, la isquemia cerebral se caracteriza por una reducción del flujo sanguíneo cerebral, por lo tanto, las células injertadas carecen de sustratos energéticos esenciales para su supervivencia. Los neutrófilos y macrófagos reclutados en la zona isquémica van, además, a producir radicales oxigenados para los cuales, Song y colaboradores (Song, Cha, *et al.*, 2010) han destacado, en el caso de isquemia cardíaca, el efecto nocivo en la unión de las células madre mesenquimales. Sin embargo, la adhesión de las células a la matriz extracelular del medio circundante a través de las proteínas de integrinas induce una señal positiva dentro de la célula y una supresión de la apoptosis, mientras que el fenómeno opuesto ocurre en caso de falta de soporte (Song, Song, *et al.*, 2010). Además, después de una isquemia, la matriz extracelular es destruida por las metaloproteasas y la permanencia de esta última limita la reconstrucción de la MEC. De acuerdo con Toma y colaboradores, uno de los principales factores de muerte de las células injertadas sería la ausencia de soporte de crecimiento, induciendo anoikis. Este fenómeno se yuxtapone con la presencia de radicales libres que limitan aún más la incorporación del injerto en el tejido huésped. Asimismo, la regeneración tisular en el caso de isquemia depende en gran medida de la vascularización de la zona de cicatrización.

También existe una necesidad real de encontrar una nueva composición que supere defectos, inconvenientes y obstáculos de la técnica anterior, en particular una composición que permita en particular tratar/detener un AVC, para tratar las consecuencias/efectos de un AVC, reducir costes y mejorar el esquema terapéutico/posología del tratamiento de los AVC.

#### Descripción de la invención

La invención está definida por las reivindicaciones. Cualquier objeto que no se encuentre dentro del alcance de las reivindicaciones se proporciona únicamente con fines informativos. En la descripción cualquier referencia a los procesos de tratamiento se refiere a los compuestos, composiciones farmacéuticas y medicamentos de la presente invención para usar en un método de tratamiento terapéutico del cuerpo humano o animal. La presente invención tiene como objeto específicamente satisfacer estas necesidades proporcionando una composición farmacéutica para su aplicación como medicamento para el tratamiento de lesiones tisulares del sistema nervioso central debidas a una patología hipóxica cerebral, comprendiendo dicha composición

- un polímero biocompatible de fórmula general (II) siguiente



- 5 en donde: Z es ácido acético  
 A representa un monómero, que es glucosa  
 X representa un grupo  $-R_1COOR_2$ ,  
 Y representa un grupo  $-R_7SO_3R_8$

- 10 en los que:

R<sub>1</sub> es un metil,  
 R<sub>2</sub>, y R<sub>8</sub> representan un catión M<sup>+</sup> elegido del grupo de los metales alcalinos  
 R<sub>7</sub> representa un enlace,

- 15 "A" representa el número de monómeros, tal que la masa de dichos polímeros de fórmula (II) es superior a 2000 daltons,  
 "X" representa el grado de sustitución de los monómeros A por los grupos X, x está comprendido entre 20 y 150 %,  
 "Y" representa el grado de sustitución de los monómeros A por los grupos Y, y está comprendido entre 30 y 150 %, z representa el grado de sustitución de los monómeros A por grupos Z, z está comprendido de 0 a 50 %, preferentemente igual a 30 %, y

- una célula madre mesenquimatosas.

- 25 En la presente "lesiones tisulares del sistema nervioso central" significa cualquier lesión tisular que pueda aparecer en el sistema nervioso central. Puede ser, por ejemplo, una lesión tisular debido a un shock físico, por ejemplo relacionado con un traumatismo, lesión tisular debido a un shock isquémico, por ejemplo, debido a una disminución del flujo sanguíneo cerebral transitorio y/o duradero relacionado, por ejemplo, con una oclusión vascular, hemorragia vascular o incluso shock hipóxico.

- 30 En la presente "patología hipóxica cerebral" significa cualquier patología y/o suceso que pueda causar una disminución del suministro de oxígeno al cerebro.

- 35 Puede ser, por ejemplo, un derrame cerebral, paro cardíaco, hipotensión, una o más complicaciones relacionadas con la anestesia durante la intervención, asfixia, envenenamiento por monóxido de carbono, ahogamiento, una inhalación de monóxido de carbono o humo, lesiones cerebrales, estrangulamiento, ataque de asma, traumatismo, lesión tisular debida a shock isquémico, hipoxia perinatal...

- 40 En la presente, el monómero significa, por ejemplo, un monómero seleccionado del grupo que consiste en azúcares, ésteres, alcoholes, aminoácidos o nucleótidos.

En la presente, los monómeros A que constituyen los elementos básicos de los polímeros de fórmula I pueden ser idénticos o diferentes. Según la invención, A representa un monómero que es glucosa.

- 45 La combinación de monómeros puede permitir formar un esqueleto polimérico, por ejemplo, un esqueleto polimérico de naturaleza poliéster, alcohol polihídrico, polisacárido, del tipo de ácidos nucleicos o proteínas.

- 50 Entre los poliésteres, pueden ser, por ejemplo, copolímeros de biosíntesis o síntesis química, por ejemplo poliésteres alifáticos o de origen natural, por ejemplo polihidroxialconatos.

- 55 En la presente, los polisacáridos y sus derivados pueden ser de origen bacteriano, animal, fúngico y/o de origen vegetal. Pueden ser, por ejemplo, polisacáridos de cadena sencilla, por ejemplo poliglucosas, por ejemplo dextrano, celulosa, beta glucano, u otros monómeros, incluyendo unidades más complejas, por ejemplo xantanos, por ejemplo glucosa, manosa y ácido glucurónico o incluso glucuronanos y glucoglucuronano.

- En la presente, los polisacáridos de origen vegetal pueden ser de cadena sencilla, por ejemplo celulosa (glucosa), pectinas (ácido galacturónico), fucanos, almidón o más complejo como alginatos (ácido galurónico y manurónico).

- 60 En la presente, los polisacáridos de origen fúngico pueden ser, por ejemplo, esteroglucano.

- En la presente, los polisacáridos de origen animal pueden ser, por ejemplo, quitinas o quitosano (glucosamina).

- 65 El número de monómeros A definidos en la fórmula (II) por "a" es tal que la masa de dichos polímeros de fórmula (II) es superior a 2000 daltons (que corresponde a 10 monómeros de glucosa). El número de monómeros A definidos en la fórmula (II) por "a" puede ser tal que la masa de dichos polímeros de fórmula (II) sea inferior a aproximadamente 2000000 daltons (que corresponde a 10000 monómeros de glucosa). De forma ventajosa, la masa de dichos polímeros

de fórmula (II) puede ser de 2 a 100 kdaltons.

En la presente, en el grupo  $-R_1COOR_2$  que representa X,  $R_1$  es un grupo metilo, y  $R_2$  es un catión seleccionado del grupo de los metales alcalinos.

5 El grupo X es el grupo de fórmula  $-R_1COOR_2$  en la que  $R_1$  es un grupo metilo  $-CH_2-$  y  $R_2$  un catión seleccionado del grupo de metales alcalinos, preferentemente el grupo X es un grupo de fórmula  $-CH_2-COO-$ .

10 El grupo Y es el grupo de fórmula  $R_7SO_3R_8$  en la que  $R_7$  es un enlace y  $R_8$  es un metal alcalino seleccionado preferentemente del grupo que consiste en sodio, potasio, rubidio y cesio, Preferentemente, el grupo Y es un grupo  $-SO_3-Na^+$

15 El grado de sustitución del conjunto de monómeros A por los grupos Y definidos en la fórmula general (I) por "y" es del 30 al 150 %, y preferentemente del orden del 100 %.

20 En la presente, en la definición de los grados de sustitución anteriores, por un grado de sustitución "x" del 100 % se entiende, el hecho de que cada monómero A del polímero de la invención contiene estadísticamente un grupo X. Además, por un grado de sustitución "y" del 100 % se entiende, el hecho de que cada monómero del polímero de la invención contiene estadísticamente un grupo Y. Los grados de sustitución superiores al 100 % reflejan el hecho de que cada monómero lleva estadísticamente más de un grupo del tipo considerado; a la inversa, los grados de sustitución por debajo del 100 % reflejan el hecho de que cada monómero lleva estadísticamente menos que un grupo del tipo considerado.

25 Los polímeros comprenden grupos químicos funcionales, designados Z, diferentes de X e Y.

En la presente, se describen grupos Z que pueden ser iguales o diferentes, y pueden seleccionarse independientemente del grupo que consiste en aminoácidos, ácidos grasos, alcoholes grasos, ceramidas, o derivados de los mismos, o secuencias de nucleótidos para direccionamiento.

30 Los grupos Z también pueden representar agentes activos idénticos o diferentes. Pueden ser, por ejemplo, agentes terapéuticos, agentes de diagnóstico, un antiinflamatorio, un antimicrobiano, un antibiótico, un factor de crecimiento, de una enzima se describen.

35 En la presente se describe, el grupo Z que puede ser un ácido graso saturado o insaturado. Puede ser, por ejemplo, un ácido graso elegido del grupo que comprende ácido acético, ácido caprílico, ácido cáprico, ácido láurico, ácido mirístico, ácido palmítico, ácido esteárico, ácido araquídico, ácido behénico, ácido lignocérico, ácido cerótico, ácido miristoleico, ácido palmitoleico, ácido sapiénico, ácido oleico, ácido elaídico, ácido trans-vaccénico, ácido linoleico, ácido linolelaídico, ácido  $\alpha$ -linolénico, ácido  $\gamma$ -linolénico, ácido dihomo- $\gamma$ -linolénico, ácido araquidónico, ácido eicosapentaenoico, ácido clupanodónico o ácido docosahexaenoico. Según la invención, el ácido graso es el ácido acético.

40 En la presente se describe, el grupo Z que puede ser un aminoácido de la serie L o D elegido del grupo que comprende alanina, asparagina, una cadena aromática por ejemplo tirosina, fenilalanina, triptófano, tiroxina o histidina.

45 Ventajosamente, los grupos Z pueden dar a los polímeros propiedades biológicas o fisicoquímicas adicionales. Por ejemplo, los grupos Z pueden aumentar la solubilidad o la lipofilia de dicho polímero, por ejemplo permitiendo una mejor difusión o penetración tisular, Por ejemplo, el aumento de la anfifilia puede facilitar el cruce de la barrera hematoencefálica.

50 Los polímeros en los que Z está presente tienen la siguiente Fórmula II:



55 en la que, A, X, Y, a, x, y son como se definieron anteriormente y z representa el grado de sustitución por grupos Z.

En la presente el grado de sustitución con grupos Z representados por "z" es de 0 a 50 %, preferentemente igual al 30 %.

60 Los grupos X, Y y Z pueden estar unidos independientemente al monómero A y/o unidos independientemente uno al otro. Cuando al menos uno de los grupos X, Y y Z está fijado independientemente a un grupo X, Y y Z diferente del primero, uno de dichos grupos X, Y o Z está unido al monómero A.

De esta manera, los grupos Z pueden estar unidos covalentemente directamente a los monómeros A o unidos covalentemente a los grupos X y/o Y.

65 En la presente, la composición puede comprender una concentración de 0,01 microgramos a 100 mg en peso de

polímero biocompatible con respecto al peso total de la composición. Por ejemplo, la composición puede comprender de 10 microgramos a 10 miligramos en peso con respecto al peso total de la composición.

5 En la presente, la concentración del polímero biocompatible en la composición y/o posología de administración de la composición puede ser una función de la vía de administración prevista para la composición según la invención.

Por ejemplo, para administración intracraneal, puede ser una administración única de 1 a 5 ml, o por minibomba, por ejemplo durante varios días. Por ejemplo, la composición puede comprender una concentración de 0,001 a 1 mg.ml<sup>-1</sup> de polímero biocompatible.

10 En la presente por "célula eucariota" se entiende cualquier célula eucariota conocida por los expertos en la materia. Puede ser, por ejemplo, una célula de mamífero eucariota, por ejemplo una célula eucariota animal o humana. Puede ser, por ejemplo, cualquier célula eucariota sea cual sea su etapa de diferenciación, por ejemplo, una célula seleccionada del grupo que comprende células eucariotas adultas o embrionarias, células madre embrionarias, células madre adultas. Pueden ser, por ejemplo, células eucariotas de sangre del cordón umbilical, de células de médula ósea, células de tejido adiposo, células mesenquimales.

20 También puede ser una célula madre pluri o totipotente, o células involucradas en vías de diferenciación, por ejemplo células madre mesenquimales. También puede ser una célula madre pluri o totipotente con la excepción de las células madre embrionarias. Según la invención, la célula es una célula madre mesenquimatosa.

Puede ser, por ejemplo, una célula heteróloga, homóloga o autóloga de un individuo. Preferentemente, las células son células autólogas.

25 Ventajosamente, cuando las células son autólogas, en la composición según la invención, puede preferirse la presente invención por razones reglamentarias, de seguridad, viabilidad, de eficacia y económicas.

30 Ventajosamente, cuando las células son autólogas, se aíslan preferentemente del individuo y se usan en la composición según la invención y/o se usan en un tratamiento dentro de las 24 horas después del muestreo y aislamiento sin adiciones adicionales. Ventajosamente, Esta administración única hace posible superar y cumplir con los requisitos/restricciones reglamentarios.

En la presente la cantidad de células incluidas en la composición puede ser de 1 a 5.10<sup>7</sup> células.

35 En la presente, "composición farmacéutica" significa cualquier forma de composición farmacéutica conocida por los expertos en la materia. En la presente, la composición farmacéutica puede ser, por ejemplo, una solución inyectable. Puede ser, por ejemplo, una solución inyectable, por ejemplo para una inyección local o sistémica, por ejemplo en solución salina fisiológica, en solución inyectable de glucosa, en presencia de excipientes, por ejemplo Dextranos, por ejemplo a concentraciones conocidas por los expertos en la materia, por ejemplo de microgramos a varios miligramos por ml. La composición farmacéutica puede ser, por ejemplo, un medicamento para administración oral seleccionado del grupo que consiste en una formulación líquida, una forma de dosificación efervescente oral, un polvo oral, un sistema multipartícula, una forma galénica bucodispersable.

45 Por ejemplo, cuando la composición farmacéutica es para administración oral, puede estar en forma de una formulación líquida elegida del grupo que comprende una solución, un jarabe, una suspensión, una emulsión. Cuando la composición farmacéutica está en forma de una forma de dosificación efervescente oral, puede estar en una forma seleccionada del grupo que consiste en comprimidos, gránulos, polvos. Cuando la composición farmacéutica está en forma de un polvo oral o un sistema multiparticulado, puede estar en una forma seleccionada del grupo que comprende perlas, gránulos, mini-comprimidos y microgránulos. Cuando la composición farmacéutica está en forma de una forma de dosificación bucodispersable, puede estar en una forma elegida del grupo que comprende comprimidos bucodispersables, obleas liofilizadas, películas delgadas, un comprimido masticable, un comprimido, una cápsula o goma masticable médica.

50 Según la presente invención, la composición farmacéutica puede ser una composición farmacéutica para administración oral, por ejemplo oral y/o sublingual, por ejemplo, elegida del grupo que comprende comprimidos orales o sublinguales, pastillas, gotas, una solución para pulverizaciones.

60 Según la presente invención, la composición farmacéutica puede ser una composición farmacéutica para administración tópica, transdérmica, por ejemplo elegida del grupo que comprende pomadas, cremas, geles, lociones, parches y espumas.

Según la presente invención, la composición farmacéutica puede ser una composición farmacéutica para administración nasal, por ejemplo elegida del grupo que comprende gotas nasales, pulverización nasal, polvo nasal.

65 Según la presente invención, la composición farmacéutica puede ser una composición farmacéutica para administración parenteral, por ejemplo subcutánea, intramuscular, intravenosa, intratecal.

En la presente, la composición puede formularse y/o adaptarse según su administración. Por ejemplo, para administración intravenosa o intramuscular, la composición puede administrarse para suministrar una dosis de polímero biocompatible de 0,1 a 5 mg por kilogramo de peso corporal, o para administración oral, la composición puede administrarse, por ejemplo, en 2 a 5 dosis iguales por día para un total diario, por ejemplo de 15 a 500 mg de polímero biocompatible, o para administración intracraneal, la composición puede comprender una concentración de 0,001 a 1 mg.ml<sup>-1</sup> de polímero biocompatible, o para administración sublingual, la composición puede comprender una concentración de 1 a 100 mg/ml de polímero biocompatible, o por vía aérea, la composición puede administrarse para administrar una dosis de 0,1 a 5 mg de polímero biocompatible por kilogramo de peso corporal de dicho polímero.

La composición de la presente invención también puede comprender al menos otro principio activo, particularmente otro ingrediente terapéuticamente activo, por ejemplo para uso simultáneo, separado o extendido en el tiempo según la formulación farmacéutica utilizada. Este otro ingrediente puede ser, por ejemplo, un principio activo utilizado, por ejemplo, en el tratamiento de enfermedades oportunistas que pueden desarrollarse en un paciente con lesión tisular del sistema nervioso central. También pueden ser productos farmacéuticos conocidos por los expertos en la materia, por ejemplo antibióticos, antiinflamatorios, anticoagulantes, factores de crecimiento, extractos plaquetarios, neuroprotectores o incluso antidepresivos, antiolesteroles como estatinas, etc.

En la presente, la administración del polímero biocompatible y la célula puede ser simultánea, sucesiva o concomitantes.

Según la invención, al menos una de las administraciones puede realizarse por vía oral o por inyección. Las dos administraciones pueden realizarse de la misma manera o de manera diferente. Por ejemplo, al menos una de las administraciones puede realizarse por vía oral o por inyección. Por ejemplo, la administración del polímero biocompatible y las células puede realizarse mediante inyección, la administración del polímero biocompatible puede ser por vía oral y las células pueden ser por inyección sistémica o inyección local. La administración también puede ser una función del sitio de la lesión.

Según la invención, el uso de células eucariotas, en particular su administración puede realizarse dentro de un período de 5 minutos a 3 meses, por ejemplo de 5 minutos a 1 semana, preferentemente de 5 minutos a 24 horas después de la primera administración de dicho polímero biocompatible.

Según la invención, la composición puede, por ejemplo, administrarse diariamente, dos veces al día y semanalmente. Puede ser, por ejemplo, una administración una vez al día, dos veces al día o más.

Según la invención, la composición puede, por ejemplo, administrarse durante un período de 1 día a 3 meses, por ejemplo 2 meses. Por ejemplo, la composición puede administrarse durante un período de 3 meses con una frecuencia de administración cada 15 días.

Según la invención, el biopolímero puede, por ejemplo, administrarse durante un período de 1 día a 3 meses, por ejemplo 2 meses, con, por ejemplo, una frecuencia de 1 vez por día, y la célula eucariota administrada durante una duración idéntica o diferente, por ejemplo una duración de 1 día a 3 meses, con una frecuencia semanal

Según la invención, cuando la administración de los polímeros y las células son sucesivas, la dosificación para cada administración puede ser una administración de los polímeros seguida de la administración de las células. Por ejemplo, las células pueden administrarse de 1 minuto a 24 horas después de la administración de los polímeros, de 30 minutos a 12 horas después de la administración de los polímeros, de 45 minutos a 6 horas después de la administración de los polímeros, 1 hora después de la administración de los polímeros.

La presente invención también describe un método para tratar un paciente con isquemia cerebral que comprende en cualquier orden las siguientes etapas:

- i. administrar al menos un polímero biocompatible, y
- ii. administrar al menos una célula eucariota,

en el que, las administraciones son concomitantes, sucesivas o alternativas.

El polímero biocompatible es como se definió anteriormente.

La célula eucariota es como se definió anteriormente.

El paciente puede ser cualquier mamífero. Puede ser, por ejemplo, un animal o un ser humano.

La célula eucariota administrada puede ser una célula heteróloga u homóloga de dicho paciente.

El modo y/o vía de administración del polímero biocompatible puede ser como se definió anteriormente.



El modo y/o vía de administración de la célula puede ser como se definió anteriormente.

La frecuencia de administración del polímero biocompatible puede ser como se definió anteriormente.

5

La frecuencia de administración de la célula eucariota puede ser como se definió anteriormente.

Cuando la administración de los polímeros biocompatibles y las células son sucesivas, la dosificación para cada administración puede ser una administración de los polímeros biocompatibles seguida de la administración de las células. Por ejemplo, las células pueden administrarse de 1 minuto a 48 horas después de la administración de los polímeros biocompatibles, de 30 minutos a 12 horas después de la administración de los polímeros, de 45 minutos a 6 horas después de la administración de los polímeros, 1 hora después de la administración de los polímeros.

10

Ventajosamente, La célula eucariota es una célula madre mesenquimatososa adulta.

15

En otras palabras, aunque en la presente descripción se hace referencia a una composición, se entenderá que cada uno de los compuestos de la composición se puede administrar simultáneamente con los otros compuestos (por ejemplo, en una composición única o en dos composiciones, comprendiendo cada una de estas composiciones uno o más de los componentes mencionados anteriormente, el modo de administración de cada uno de los compuestos o composiciones puede ser el mismo o diferente), o independientemente uno del otro, por ejemplo sucesivamente, por ejemplo, administración independiente de un polímero biocompatible y, administración independiente de una célula eucariota, estas administraciones se realizan en el mismo paciente, simultánea o sucesiva o alternativamente, en un orden que es el mencionado anteriormente u otro orden. Estas diferentes administraciones se pueden realizar, independientemente una de la otra o de manera relacionada (composición o coadministración), por un modo de administración idéntico o diferente (inyección, ingestión, aplicación tópica, etc.), una o más veces al día, durante uno o más días sucesivos o no.

20

25

La presente invención también proporciona un kit farmacéutico para la prevención y/o tratamiento del daño tisular del sistema nervioso central debido a isquemia vascular cerebral que comprende:

30

- i. un polímero biocompatible, y
- ii. al menos una célula eucariota.

El polímero biocompatible es como se definió anteriormente.

35

La célula eucariota es como se definió anteriormente.

La presente invención también describe el uso de una composición farmacéutica que comprende

40

- i. un polímero biocompatible, y
- ii. al menos una célula eucariota

para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de lesiones tisulares del sistema nervioso central debido a isquemia vascular cerebral.

45

El polímero biocompatible es como se definió anteriormente.

La célula eucariota es como se definió anteriormente.

50

En este uso, por fármaco se entiende una composición farmacéutica como se definió anteriormente.

Los inventores han demostrado de manera sorprendente e inesperada que la composición según la invención, permite ventajosamente una disminución significativa de las lesiones isquémicas.

55

Asimismo, Los inventores también han demostrado que la composición según la invención permite ventajosamente una recuperación funcional post-isquémica temprana y duradera.

Los inventores también han demostrado que la composición según la invención permite ventajosamente una mejora temprana de las funciones neurológicas, funcionamiento sensoriomotor después de la administración de la composición según la invención.

60

Además, los inventores también han demostrado que la composición según la invención permite ventajosamente limitar/reducir el volumen de infarto debido, por ejemplo, a una lesión tisular relacionada, por ejemplo, con un accidente cerebrovascular.

65

Asimismo, los inventores también han demostrado que la composición según la invención permite ventajosamente

proteger y/o estimular la regeneración del tejido cerebral que presenta lesiones vinculadas, por ejemplo, a un accidente cerebrovascular y/o tratamiento por radioterapia.

5 A los expertos en la materia todavía pueden aparecerles otras ventajas al leer los ejemplos a continuación, ilustrados por las figuras adjuntas, dadas con fines ilustrativos.

Breve descripción de las figuras

- 10 - La figura 1 representa un diagrama del protocolo experimental destinado a estudiar los efectos de un polímero biocompatible sobre los daños cerebrales y los déficits neurológicos. En esta figura MCAo significa oclusión de la arteria cerebral media ("middle cerebral artery occlusion"), LP significa ensayo de colocación de las patas ("limb placing test"); NS significa puntuación neurológica ("neurological score"); OF significa campo abierto ("open field"); MRI significa formación de imágenes por resonancia magnética ("magnetic resonance imaging").
- 15 - La figura 2 representa fotografías del sistema nervioso central (cerebro) (figura 2 A) que representa un infarto (zona entre puntos) sin aplicación (1) o después de aplicación (2) de un polímero biocompatible después de dos días (D2) o catorce días (D14) del suceso isquémico inductor de la lesión. La figura 2B representa un diagrama que muestra el volumen de la lesión (ordenadas) en función del día (abscisas) sin (barras blancas) o con la aplicación de un polímero biocompatible (barras negras).
- 20 - La figura 3 representa un diagrama (figura 3 A) que representa los resultados del ensayo de colocación de las patas (\*ANOVA con medición repetida  $p < 0,05$ ) en función del tiempo después de la administración (triángulos rellenos) o no (triángulos vacíos) de un polímero biocompatible. La Figura 3B muestra un gráfico de barras de los resultados de lateralización evaluados usando el ensayo del rincón (\*comparación de la media con el valor de referencia  $0 p < 0,05$ ) más o menos tres días después de la administración (barras llenas) o no (barras vacías) de un polímero biocompatible. La figura 3C muestra un gráfico de barras de la evaluación de recuperación sensoriomotora fina utilizando el ensayo de retirada del adhesivo (\* $p < 0,05$ , factor ANOVA 1) después de 2 o 4 semanas después de la administración (barras llenas) o no (barras vacías) de un polímero biocompatible, representando la ordenada el tiempo en segundos.
- 25 - La figura 4 representa un diagrama del protocolo experimental destinado a estudiar los efectos de una coadministración de un polímero biocompatible y de células madre adultas (células madre mesenquimales) a través de un estudio de resonancia magnética asociado con ensayos de comportamiento, concretamente el ensayo BWT ("beam walking test") del haz; ensayo LP ("limb placing test") de colocación de las patas; NS ("puntuación neurológica") puntuación neurológica y ensayo PA ("passive avoidance") de evitación pasiva.
- 30 - La figura 5 representa fotografías del sistema nervioso central (cerebro) (figura 5 A) que representa un infarto (zona entre puntos) sin aplicación (1) o después de la aplicación (2) de un polímero biocompatible, después de la aplicación de células madre mesenquimales (3) y después de la aplicación de un polímero biocompatible y células madre mesenquimales (4) a los dos días (D2) o catorce días (D14) del suceso isquémico inductor de lesión. La figura 5B representa un diagrama que muestra el volumen de la lesión (ordenadas) en función del día (abscisas) sin (barras blancas) con aplicación de un polímero biocompatible (barras negras), con aplicación de células madre mesenquimales (barras rayadas horizontalmente) o después de aplicación de un polímero biocompatible y células madre mesenquimales (barras rayadas diagonalmente)
- 35 - La figura 6 representa un diagrama (figura 6 A) que representa los resultados del ensayo de colocación de las patas (\*ANOVA con medición repetida  $p < 0,05$ ) en función del tiempo después de la administración (cuadrados rellenos) o no (triángulos vacíos) de un polímero biocompatible, después de la administración de células madre mesenquimales (círculos rellenos) y un polímero biocompatible y células madre mesenquimales (cuadrados sombreados). La figura 6 B muestra un gráfico de barras de los resultados de lateralización evaluados mediante el ensayo del rincón (\*comparación de la media con el valor de referencia  $0 p < 0,05$ ) más o menos tres días después de la administración (barras rellenas) o no (barras vacías) de un polímero biocompatible, administración de células madre mesenquimales y administración de células madre mesenquimales y un polímero biocompatible. La figura 6 C muestra un gráfico de barras de evaluación de recuperación sensoriomotora fina utilizando el ensayo de retirada del adhesivo (\* $p < 0,05$ , factor ANOVA 1) después de 2 o 4 semanas después de la administración (barras llenas) o no (barras vacías) de un polímero biocompatible, con la aplicación de células madre mesenquimales (barras rayadas horizontalmente) o después de la aplicación de un polímero biocompatible y células madre mesenquimales (barras rayadas diagonalmente), representando la ordenada el tiempo en segundos.
- 40 - La figura 7 representa fotografías de microscopía óptica de la vascularización en la zona isquémica 35 días después de la oclusión de la arteria cerebral media en los grupos vehículo/vehículo (A), vehículo/células madre mesenquimales (B), polímero biocompatible/vehículo (C) y un polímero biocompatible/células madre mesenquimales (D). La escala es de 500  $\mu\text{m}$ .

**Ejemplos**

60 Ejemplo 1: Evaluación del efecto de un polímero biocompatible según la invención sobre el daño cerebral y los déficits funcionales debidos a la isquemia cerebral

65 En este ejemplo, el polímero biocompatible fue el polímero comercializado por la compañía OTR3 con la referencia comercial OTR 4131 descrito en Frescaline G. *et al.*, Tissue Eng Part A. julio 2013; 19(13-14): 1641-53. doi: 10.1089/ten.TEA.2012.0377 disponible en el mercado.

Las ratas eran ratas macho de la cepa Sprague Dawley.

5 Para definir los efectos del polímero biocompatible OTR 4131 sobre el daño cerebral y los déficits funcionales, el protocolo experimental ilustrado en la figura 1 se realizó en ratas sometidas a isquemia cerebral transitoria por oclusión de la arteria cerebral media.

10 En particular, el animal se anestesió por inhalación de isoflurano al 5 % en una mezcla de O<sub>2</sub>/N<sub>2</sub>O en proporciones respectivas de 1/3 durante 3 minutos, luego se mantuvo con 2-2,5 % de isoflurano administrado con una máscara en el momento de la cirugía. La rata se colocó en decúbito dorsal. Se hizo una incisión en el cuello. Las arterias carótidas comunes, carótida externa y carótida interna se aislaron y luego se introdujo un filamento oclusivo en la carótida externa y se avanzó hacia la parte proximal de la arteria cerebral media. Una hora después, el filamento se retiró para permitir la reperfusión, por ejemplo como se describe en Letourneur *et al.*, 2011 "Impact of genetic and renovascular chronic arterial hypertension on the acute spatiotemporal evolution of the ischemic penumbra: a sequential study with MRI in the rat" *J Cereb Blood Flow Metab.* Feb de 2011; 31(2):504-13 o Quittet *et al.*, "Effects of mesenchymal stem cell therapy, in association with pharmacologically active microcarriers releasing VEGF, in an ischaemic stroke model in the rat." *Acta Biomater.* mar 2015; 15:77-88.

20 Una hora después de la inducción de isquemia, se administraron 1,5 mg/kg de OTR 4131 por vía intravenosa, y luego el animal se despertó

25 Para evaluar los efectos del tratamiento sobre el volumen isquémico, un estudio de resonancia magnética (resonancia magnética (7T, PharmaScan, Bruker BioSpin, Ettlingen, Alemania)) se realizó a las 48h y 14 días después de la inducción de isquemia cerebral. Para ello, el animal fue anestesiado por inhalación de isoflurano al 5 % en una mezcla de O<sub>2</sub>/N<sub>2</sub>O 1/3 durante 3 minutos, luego se mantuvo anestesiado con isoflurano al 2-2,5 %. Se utilizó una secuencia anatómica T2 según un modo de adquisición rápida RARE 8 por eco de giro rápido (adquisición rápida RARE con ecos reenocados) con un tiempo de repetición de 5000 milisegundos, un tiempo de eco de 16,25 milisegundos, un promedio (NEX número de experimentos) = 2, una matriz de 256 x 256 píxeles y un tamaño de imagen o FOV (field of view) de 3,84 x 3,84 cm, una resolución nominal de 0,15 x 0,15 x 0,75 mm<sup>3</sup>. Se realizaron veinte secciones contiguas por animal con un tiempo de adquisición total de 4 minutos.

35 La figura 2A muestra imágenes de resonancia magnética obtenidas después de 2 o 14 días después de la isquemia cerebral transitoria. Como se muestra en esta figura, se observó una disminución en el infarto después de una inyección 1 hora después del inicio de la isquemia del polímero biocompatible (zona rodeada en línea discontinua) en comparación con la rata que no recibió un polímero biocompatible. Se observa una disminución significativa del volumen de infarto en D2 y D14 cuando el tratamiento se administra 1h después de la oclusión (Figura 2).

40 Este experimento también se realizó cambiando el tiempo de inyección: inyección a las 2h30 o 6h después de la inducción de isquemia cerebral y mostró una falta de resultados significativos (resultados no proporcionados). En otras palabras, una sola inyección del polímero biocompatible 2h30 o 6h después de la inducción de la isquemia no tiene ningún efecto en el infarto causado por la isquemia.

45 También se ha realizado una evaluación del efecto del polímero biocompatible en la recuperación funcional. Para ello, se realizó una batería de ensayos sensoriomotores y cognitivos según el método descrito en Quittet *et al.*, "Effects of mesenchymal stem cell therapy, in association with pharmacologically active microcarriers releasing VEGF, in an ischaemic stroke model in the rat." *Acta Biomater.* Mar 2015; 15:77-88 o Freret *et al.*, 2006 "Long-term functional outcome following transient middle cerebral artery occlusion in the rat: correlation between brain damage and behavioral impairment." *Behav Neurosci.* Dic 2006; 120(6):1285-98.

50 Los resultados obtenidos se muestran en la figura 3. Como se demuestra en esta figura la inyección del polímero biocompatible 1 h después de la inducción de isquemia permite una mejora de la recuperación funcional, por ejemplo, como se demostró en el ensayo de colocación de las patas, que evalúa los rendimientos sensoriales (medición repetida ANOVA  $p < 0,05$ ) (figura 3A triángulo relleno) con respecto a la rata que no recibió inyección, pero también en el ensayo del rincón que evalúa la lateralización de los animales mediante la comparación del promedio con el valor de referencia  $p > 0,05$  (Figura 3B barras rellenas) en comparación con la rata que no recibió inyección.

60 Asimismo, Posteriormente se realizó una evaluación fina de los rendimientos sensitivo-motores gracias a ensayo de retirada del adhesivo. Los resultados obtenidos se ilustran en la figura 3C. Como se muestra en esta figura, los animales a los que se administró un polímero biocompatible 1h después de la oclusión (barras rellenas) tienden a detectar la presencia del adhesivo en el lado controllesional afectado por la isquemia más rápidamente que otros grupos que no han recibido un polímero biocompatible en la semana 2 (factor ANOVA 1  $p = 0,1$ ). La repetición del ensayo en la semana 4 mostró una continuación de la tendencia con respecto a la detección del adhesivo en el lado de control (factor ANOVA 1  $p = 0,1$ ). En este último, una retirada significativamente más rápida del adhesivo en el lado controllesional para los animales tratados con el polímero biocompatible mostró una mejora más rápida del rendimiento sensitivo-motor inducido por el polímero biocompatible.

65

Ejemplo 2: Evaluación del efecto de la administración conjunta de un polímero biocompatible y una célula madre mesenquimatosas sobre los daños cerebrales y los déficits funcionales debidos a un shock isquémico

En este ejemplo, las ratas y el polímero biocompatible eran idénticos a los del ejemplo 1

5 Se extrajeron células madre mesenquimales de las hembras y la tibia de ratas Sprague Dawley según el método descrito en Quittet *et al.* "Effects of mesenchymal stem cell therapy, in association with pharmacologically active microcarriers releasing VEGF, in an ischaemic stroke model in the rat" Acta Biomater. Mar 2015; 15:77-88.

10 Para definir los efectos de la administración conjunta de polímero biocompatible OTR 4131 y células madre mesenquimales sobre el daño cerebral y los déficits funcionales, el protocolo experimental ilustrado en la figura 4 se realizó en ratas sometidas a isquemia cerebral transitoria por oclusión de la arteria cerebral media según el enfoque intraluminal como se describe en el ejemplo 1 anterior.

15 Se realizó una evaluación de los efectos de la administración conjunta sobre el volumen del infarto, pero también sobre la recuperación funcional post isquémica.

20 Para evaluar los efectos del tratamiento sobre el volumen isquémico, se realizó un estudio MRI (imágenes por resonancia magnética) a las 48h y 14 días después de la inducción de isquemia cerebral como se describe en el ejemplo 1 anterior.

25 El análisis de MRI después de 48 horas reveló una disminución en el volumen de infarto en comparación con el grupo de control para animales tratados con RGTA y coadministración de RGTA-MSc (factor ANOVA 1,  $p < 0,05$ ) como se muestra en la figura 5A (zona entre puntos). En particular, se ha demostrado claramente que la administración conjunta permite ventajosamente una disminución en el volumen de la lesión a las 48 horas en comparación con el sujeto que no ha recibido una inyección, pero también sorprendentemente permite que después de 14 días se reduzca significativamente el volumen de la lesión, en particular con los animales tratados con el polímero biocompatible solo, las MSC solas (Figura 5 A y B). De esta manera, este experimento demuestra claramente que la composición según la invención y/o la administración del polímero biocompatible y la célula hace posible obtener un nuevo efecto técnico no observado en su ausencia y/o durante su única administración.

También se realizó una evaluación del efecto de la coadministración del polímero biocompatible y las células madre en la recuperación funcional. Para ello, se realizó una batería de ensayos sensoriomotores y cognitivos.

35 Los resultados obtenidos se muestran en la figura 6. Como se muestra en esta figura, los efectos del tratamiento en los rendimientos sensoriomotores y cognitivos, la evaluación de la recuperación sensorial temprana mediante el ensayo de colocación de las patas (figura 6 A) mostró una mejor recuperación para los animales de las células madre mesenquimatosas poliméricas biocompatibles (cuadrados sombreados) en comparación con los otros tres grupos (ANOVA de medida repetida  $p < 0,05$ ).

40 En relación a, la lateralización que se evaluó usando el ensayo del rincón, también se destacó una potenciación de la recuperación funcional demostrada por el índice de lateralización no diferente del valor de referencia establecido en 0 (valor de no lateralización) solo para los animales del grupo de células madre mesenquimatosas poliméricas biocompatibles (figura 6B). Finalmente, con respecto al ensayo de retirada del adhesivo, se demostró que este último se aceleró tan pronto como la segunda semana posterior a la oclusión en el lado controlado isquémico solo para animales en el grupo de células madre mesenquimatosas poliméricas biocompatibles (factor ANOVA 1  $p < 0,05$ ) (Figura 6C rayas sombreadas).

50 Estos resultados demuestran claramente que la combinación del polímero biocompatible y las células eucariotas, en particular, las células madre mesenquimales (MSC) permiten obtener y tratar lesiones tisulares del sistema nervioso central. En particular, también permite una recuperación sorprendentemente funcional mucho más alta que la de los animales no tratados, pero también mucho más alta que la de los animales tratados solo con el polímero biocompatible o las MSC solas.

55 También se realizó una evaluación *ex vivo*. Para ello, las secciones del cerebro se enjuagaron 3 veces durante 5 minutos en PBS 0,1 M y luego se incubaron en una mezcla de PBS 0,1 M/BSA al 3 % (albúmina de suero bovino Sigma®) / triton al 0,1 % (Sigma®) durante al menos 1 hora para saturar los sitios de unión no específicos. Las secciones se colocaron posteriormente en contacto con el anticuerpo primario (RECA-1; AbDSerotec, diluido a 1:100 en PBS 0,1 M/BSA al 1%/triton al 0,1 % durante la noche a 4 °C con agitación suave. Las secciones se enjuagaron posteriormente 3 veces con PBS 0,1 M y se incubaron durante 2 horas con el anticuerpo secundario diluido en una solución de PBS 0,1 M/BSA al 1%/triton al 0,1 %. Las secciones se enjuagaron 3 veces en PBS antes de montarse entre el portaobjetos y el cubreobjetos. Las fotos fueron adquiridas usando un microscopio recto equipado con una cámara y el software MétaVue. Las imágenes obtenidas así se analizaron utilizando el software ImageJ (<http://imagej.nih.gov/ij/>).

65 De esta manera, La vasculatura del tejido isquémico se evaluó por inmunofluorescencia usando tinción de células

endoteliales con RECA-1 (Rat Endothelial Cell Antibody-1). El marcado permitía, si fuera el caso necesario, identificar y resaltar la arquitectura vascular del tejido representado por las líneas blancas en las áreas sombreadas.

5 Como se demuestra en la figura 7 que representa las fotografías obtenidas por microscopía electrónica, el marcado revela que en ausencia de polímero biocompatible o la combinación de polímero biocompatible y células madre mesenquimales no se observó preservación de la arquitectura de la vascularización en la zona de infarto (figura 7A y C). Solo en presencia de un polímero biocompatible (figura 7 B) o la combinación del polímero biocompatible y las células madre mesenquimatosas (figura 7 D) se pudo observar una preservación de la estructura vascular. Asimismo, la figura 7D demuestra claramente que la combinación del polímero biocompatible y las células madre mesenquimatosas permite obtener un efecto sorprendente e inesperado sobre esta preservación de la estructura vascular.

15 Este ejemplo demuestra claramente que la composición según la invención permite ventajosamente tratar lesiones tisulares del sistema nervioso central debido a la isquemia vascular cerebral. Asimismo, este ejemplo demuestra claramente que la composición según la invención también hace posible tratar cualquier déficit funcional debido a las lesiones tisulares del sistema nervioso central. Asimismo, este ejemplo demuestra claramente que la composición según la invención permite ventajosamente reducir el tiempo de recuperación y/o permitir la recuperación de cualquier déficit funcional debido a una lesión tisular.

20 Este ejemplo demuestra claramente que la composición según la invención tiene efectos beneficiosos significativos en la isquemia tanto en términos de protección tisular, por ejemplo limitando el volumen de infarto, pero también en términos de recuperación funcional como se ilustró anteriormente. Además de estos efectos beneficiosos, también hay una mejora en la conservación de la arquitectura del sistema vascular en la zona de infarto.

25 Listados de referencias

1. Adeoye, O., Hornung, R., Khatri, P., y Kleindorfer, D. (2011). Recombinant tissue-type plasminogen activator use for ischemic stroke in the United States: a doubling of treatment rates over the course of 5 years. *Stroke*; a Journal of Cerebral Circulation, 42(7), 1952-5.
2. Aggarwal, S., y Pittenger, M. F. (2005). Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood*, 105(4), 1815-22.
3. Altman, J., y Das, G. D. (1965). Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *The Journal of Comparative Neurology*, 124(3), 319-35.
4. Andres, R. H., Horie, N., Slikker, W., Keren-Gill, H., Zhan, K., Sun, G., Steinberg, G. K. (2011). Human neural stem cells enhance structural plasticity and axonal transport in the ischaemic brain. *Brain*, 134(6), 1777-1789.
5. Bang, O. Y., Lee, J. S., Lee, P. H., y Lee, G. (2005). Autologous mesenchymal stem cell transplantation in stroke patients. *Annals of Neurology*, 57(6), 874-82.
6. Barritault, D., Garcia-Filipe, S., y Zakine, G. (2010). Basement of matrix therapy in regenerative medicine by RGTA(®): From fundamental to plastic surgery. *Annales de Chirurgie Plastique et Esthetique*, 55(5), 413-420.
7. Bhasin, A., Srivastava, M., Kumaran, S., Mohanty, S., Bhatia, R., Bose, S., Airan, B. (2011). Autologous mesenchymal stem cells in chronic stroke. *Cerebrovascular Diseases Extra*, 1(1), 93-104.
8. Cramer, S. C. (2008). Repairing the human brain after stroke: I. Mechanisms of spontaneous recovery. *Annals of Neurology*, 63(3), 272-287.
9. Crisan, M., Yap, S., Casteilla, L., Chen, C. W., Corselli, M., Park, T. S., Peault, B. (2008). A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs. *Cell Stem Cell*, 3, 301-313.
10. Da Silva Meirelles, L., Chagastelles, P. C., y Nardi, N. B. (2006). Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *Journal of Cell Science*, 119, 2204-2213.
11. Desgranges, P., Barbaud, C., Caruelle, J. P., Barritault, D., y Gautron, J. (1999). A substituted dextran enhances muscle fiber survival and régénération in ischemic and denervated rat EDL muscle. *The FASEB Journal*, 13(6), 761-766.
12. Di Nicola, M. (2002). Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood*, 99(10), 3838-3843.
13. Eckert, M. a, Vu, Q., Xie, K., Yu, J., Liao, W., Cramer, S. C., y Zhao, W. (2013). Evidence for high translational potential of mesenchymal stromal cell therapy to improve recovery from ischemic stroke. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 33(9), 1322-34.
14. Erices, A., Conget, P., y Minguell, J. J. (2000). Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood. *British Journal of Haematology*, 109(1), 235-42.
15. Esneault, E., Pacary, E., Eddi, D., Freret, T., Tixier, E., Toutain, J Bernaudin, M. (2008). Combined therapeutic strategy using erythropoietin and mesenchymal stem cells potentiates neurogenesis after transient focal cerebral ischemia in rats. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 28(9), 1552-63.
16. Friedenstein, A., Chailakhjan, R., y Lalykina, K. (1970). The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea. *Cell Proliferation*, 3(4), 393-403.
17. Gage, F. H. (2002). Neurogenesis in the adult brain. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 22(3), 612-3.
18. En 't Anker, P. S., Scherjon, S. a, Kleijburg-van der Keur, C., de Groot-Swings, G. M. J. S., Claas, F. H. J., Fibbe, W. E., y Kanhai, H. H. H. (2004). Isolation of mesenchymal stem cells of fetal or maternal origin from human

placenta. *Stem Cells*, 22(7), 1338-45.

19. Jaillard, A., Naegele, B., Trabucco-Miguel, S., LeBas, J. F., y Hommel, M. (2009). Hidden dysfunctioning in subacute stroke. *Stroke*, 40(7), 2473-9.

5 20. Kranz, a, Wagner, D. C., Kamprad, M., Scholz, M., Schmidt, U. R., Nitzsche, F., Boltze, J. (2010). Transplantation of placenta-derived mesenchymal stromal cells upon experimental stroke in rats. *Brain Research*, 1315, 128-136.

21. Lee, J. S., Hong, J. M., Moon, G. J., Lee, P. H., Ahn, Y. H., y Bang, O. Y. (2010). A long-term follow-up study of intravenous autologous mesenchymal stem cell transplantation in patients with ischemic stroke. *Stem Cells*, 28(6), 1099-1106.

10 22. Lees, K. R., Bluhmki, E., von Kummer, R., Brott, T. G., Toni, D., Grotta, J. C., Hacke, W. (2010). Time to treatment with intravenous alteplase and outcome in stroke: an updated pooled analysis of ECASS, ATLANTIS, NINDS, and EPITHET trials. *The Lancet*, 375(9727), 1695-1703.

23. Malgieri, A., Kantzari, E., Patrizi, M. P., y Gambardella, S. (2010). Bone marrow and umbilical cord blood human mesenchymal stem cells: State of the art. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, 3(4), 248-69.

15 24. Paul, G., y Anisimov, S. V. (2013). The secretome of mesenchymal stem cells: Potential implications for neuroregeneration. *Biochimie*, 95(12), 2246-2256.

25. Rouet, V., Hamma-Kourbali, Y., Petit, E., Panagopoulou, P., Katsoris, P., Barritault, D., Courty, J. (2005). A synthetic glycosaminoglycan mimetic binds vascular endothelial growth factor and modulates angiogenesis. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(38), 32792-32800.

20 26. Seri, B., Herrera, D. G., Gritti, a, Ferron, S., Collado, L., Vescovi, a, ... Alvarez-Buylla, A. (2006). Composition and organization of the SCZ: a large germinal layer containing neural stem cells in the adult mammalian brain. *Cerebral Cortex*, 16 Supl 1, i103-i111.

27. Song, H., Cha, M.-J., Song, B.-W., Kim, I.-K., Chang, W., Lim, S Hwang, K.-C. (2010). Reactive oxygen species inhibit adhesion of mesenchymal stem cells implanted into ischemic myocardium via interference of focal adhesion complex. *Stem Cells*, 28(3), 555-63.

28. Song, H., Song, B.-W., Cha, M.-J., Choi, I.-G., y Hwang, K.-C. (2010). Modification of mesenchymal stem cells for cardiac regeneration. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 10(3), 309-19.

29. Suárez-Monteagudo, C., Hernández-Ramírez, P., Alvarez-González, L., García-Maeso, I., de la Cuétara-Bernal, K., Castillo-Díaz, L., ... Bergado, J. (2009). Autologous bone marrow stem cell neurotransplantation in stroke patients. An open study. *Restorative Neurology* 27(3), 151-161.

30. Toma, C., Pittenger, M. F., Cahill, K. S., Byrne, B. J., y Kessler, P. D. (2002). Human mesenchymal stem cells differentiate to a cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart. *Circulation*, 105(1), 93-98.

31. Wang, Y., Liu, J., Tan, X., Li, G., Gao, Y., Liu, X., Li, Y. (2013). Induced pluripotent stem cells from human hair follicle mesenchymal stem cells. *Stem Cell Reviews*, 9(4), 451-60.

35 32. Yalvac, M. E., Rizvanov, A. a, Kilic, E., Sahin, F., Mukhamedyarov, M. a, Islamov, R. R., y Palotás, A. (2009). Potential role of dental stem cells in the cellular therapy of cerebral ischemia. *CurrentPharmaceutical Design*, 15(33), 3908-16.

33. Yamagata, M., Yamamoto, A., Kako, E., Kaneko, N., Matsubara, K., Sakai, K., Ueda, M. (2013). Human dental pulp-derived stem cells protect against hypoxic-ischemic brain injury in neonatal mice. *Stroke; a Journal of Cerebral Circulation*, 44(2), 551-4.

40 34. Yamauchi, H., Desgranges, P., Lecerf, L., Papy-Garcia, D., Tournaire, M. C., Moczar, M., Barritault, D. (2000). New agents for the treatment of infarcted myocardium. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 14(14), 2133-4.

## REIVINDICACIONES

1. Composición farmacéutica para su aplicación como medicamento para el tratamiento de lesiones tisulares del sistema nervioso central debidas a una patología hipóxica cerebral, comprendiendo dicha composición

5 - un polímero biocompatible de fórmula general (II) siguiente



10 en donde:

A representa un monómero que es glucosa,  
 X representa un grupo  $R_1COOR_2$ ,  
 Y representa un grupo  $-R_7SO_3R_8$  Z es ácido acético  
 en los que:

15  $R_1$  es un metilo,  
 $R_2$  y  $R_8$  representan independientemente un catión  $M^+$  seleccionado del grupo de metales alcalinos, y  
 $R_7$  representa un enlace,  
 20 a representa el número de monómeros de modo que la masa de dichos polímeros de fórmula (II) es superior a 2000 daltons,  
 x representa el grado de sustitución de los monómeros A por grupos X, x está comprendido entre 20 y 150 %,  
 y representa el grado de sustitución de los monómeros A por los grupos Y, y está comprendido entre 30 y  
 25 150 %,  
 z representa el grado de sustitución de los monómeros A por grupos Z, z está comprendido de 0 a 50 %, preferentemente igual a 30 %, y

30 - una célula madre mesenquimatosa.

2. Una composición para su aplicación según la reivindicación 1 en la que dicho polímero biocompatible se administra en el tratamiento de lesiones tisulares del sistema nervioso central debidas a una isquemia vascular cerebral por:

35 - por vía intravenosa o por vía intramuscular a una dosis comprendida de 0,1 a 5 mg/kg de peso corporal, o  
 - por vía oral en 2 a 5 dosis iguales al día para un total diario de 15 a 500 mg,  
 - por vía intracraneal a una dosis comprendida de 0,001 a 1 mg.ml<sup>-1</sup>  
 - por vía sublingual en ayunas de una solución acuosa concentrada de 1 a 100 mg/ml,  
 - por vía aérea por aspersión de una solución que comprende de 0,1 a 5 mg/kg de peso corporal de dicho polímero,

40 y en donde dicha célula madre mesenquimatosa se usa en el tratamiento por inyección en un plazo de 5 minutos a 1 mes después de la primera administración de dicho polímero biocompatible.

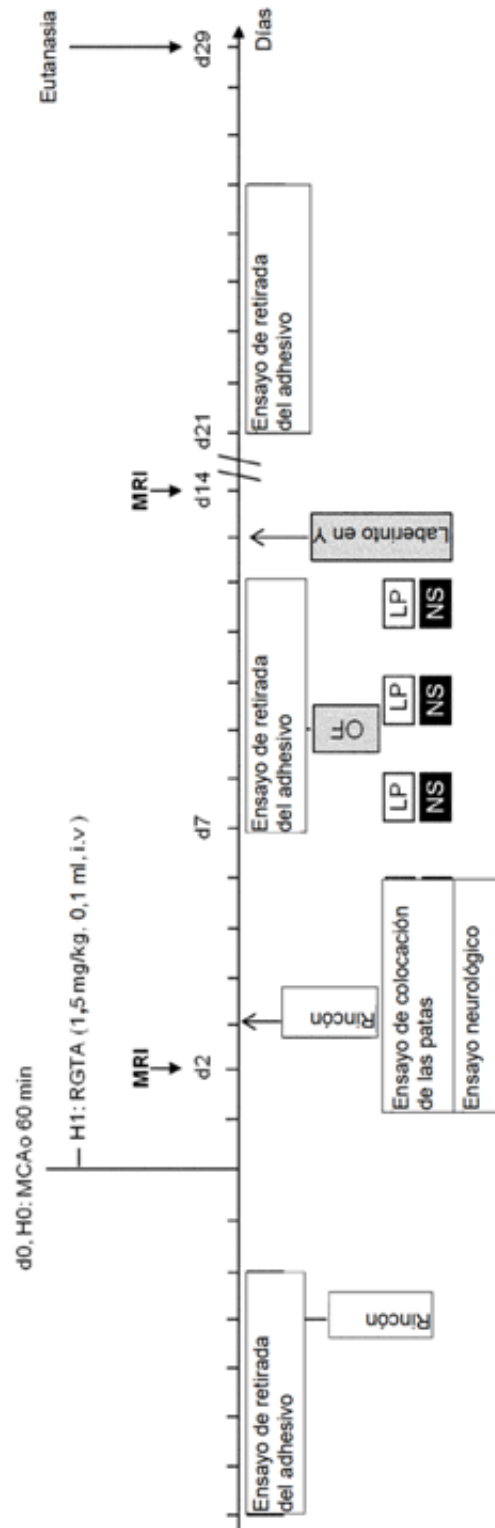


Figura 1



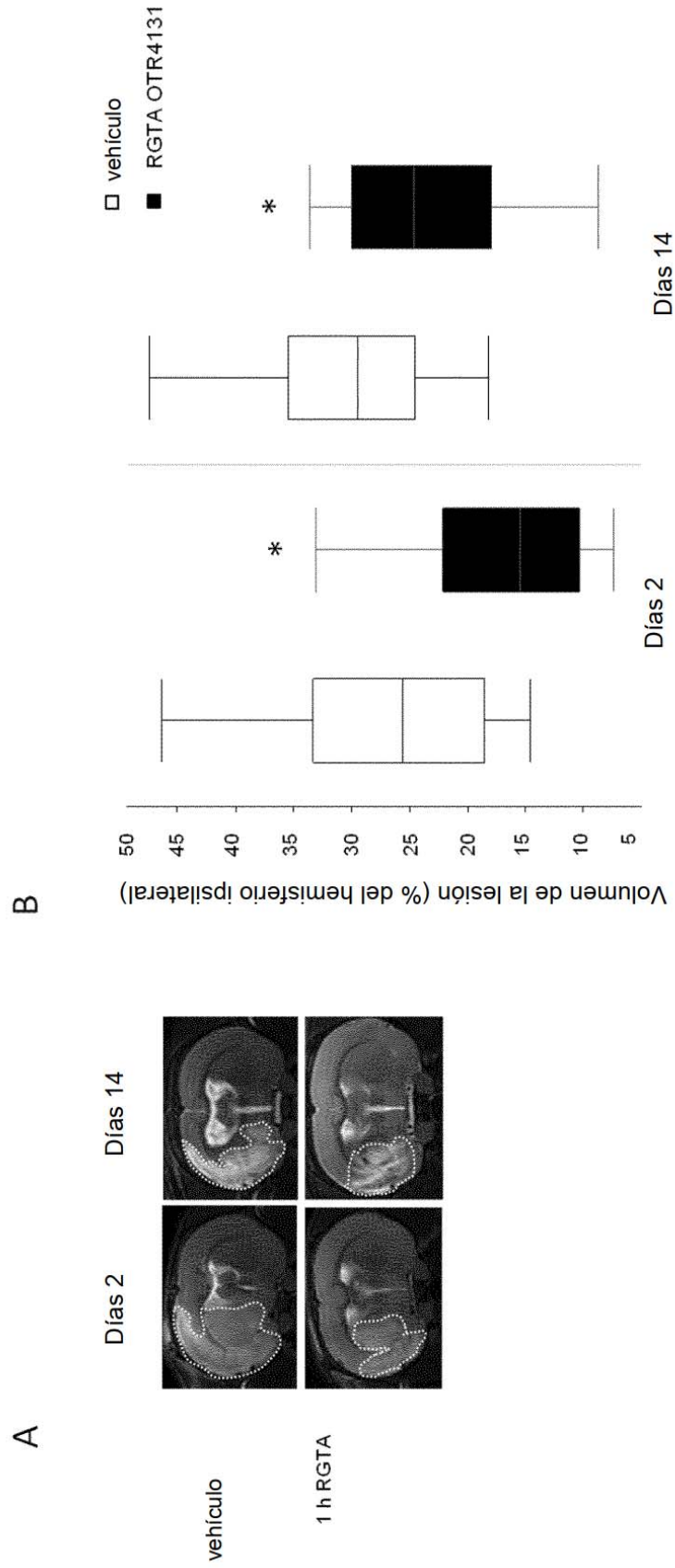


Figura 2

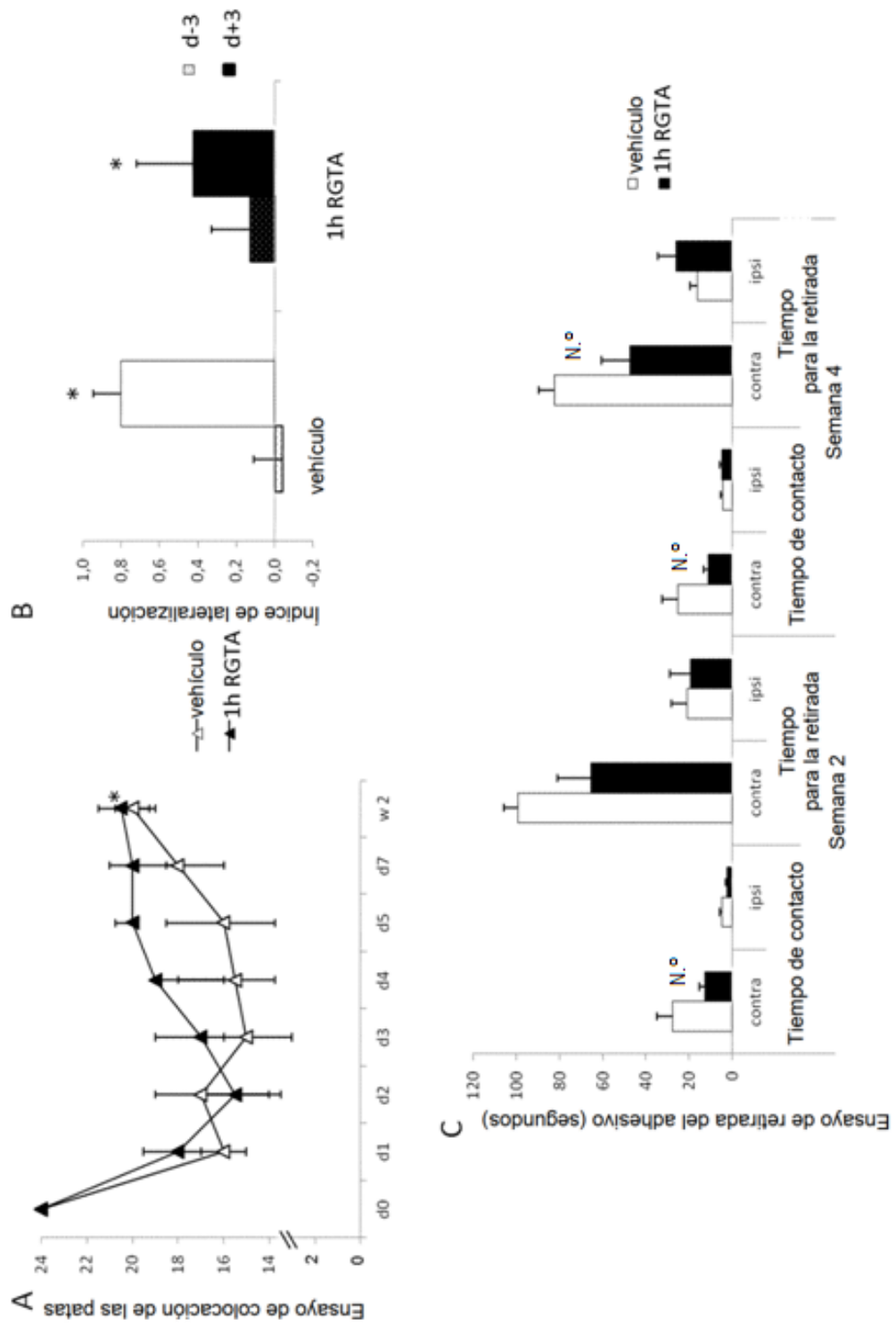


Figura 3

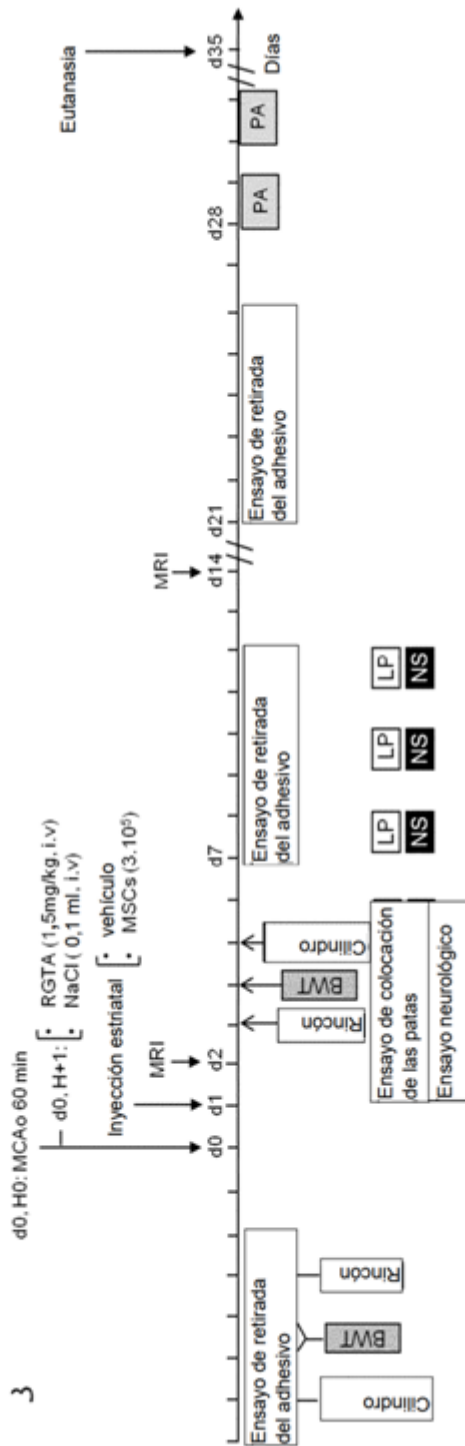


Figura 4

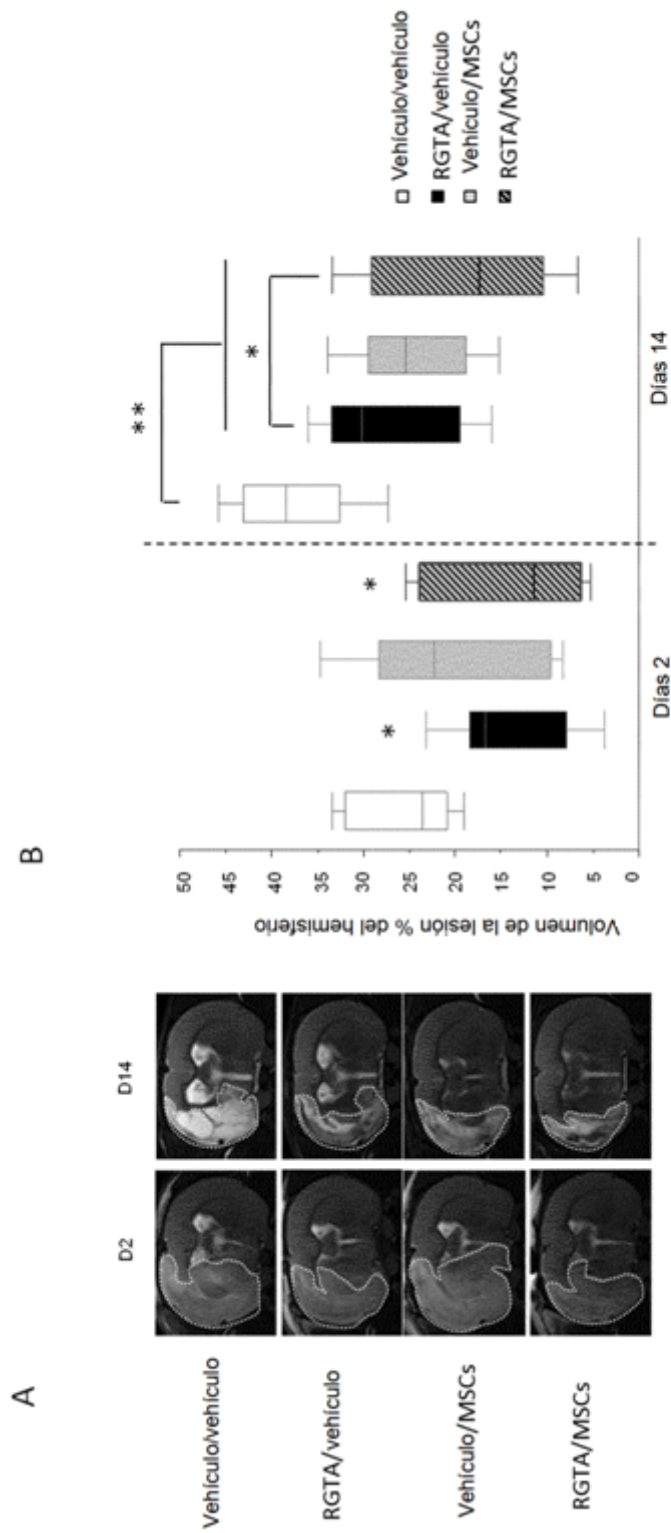


Figura 5

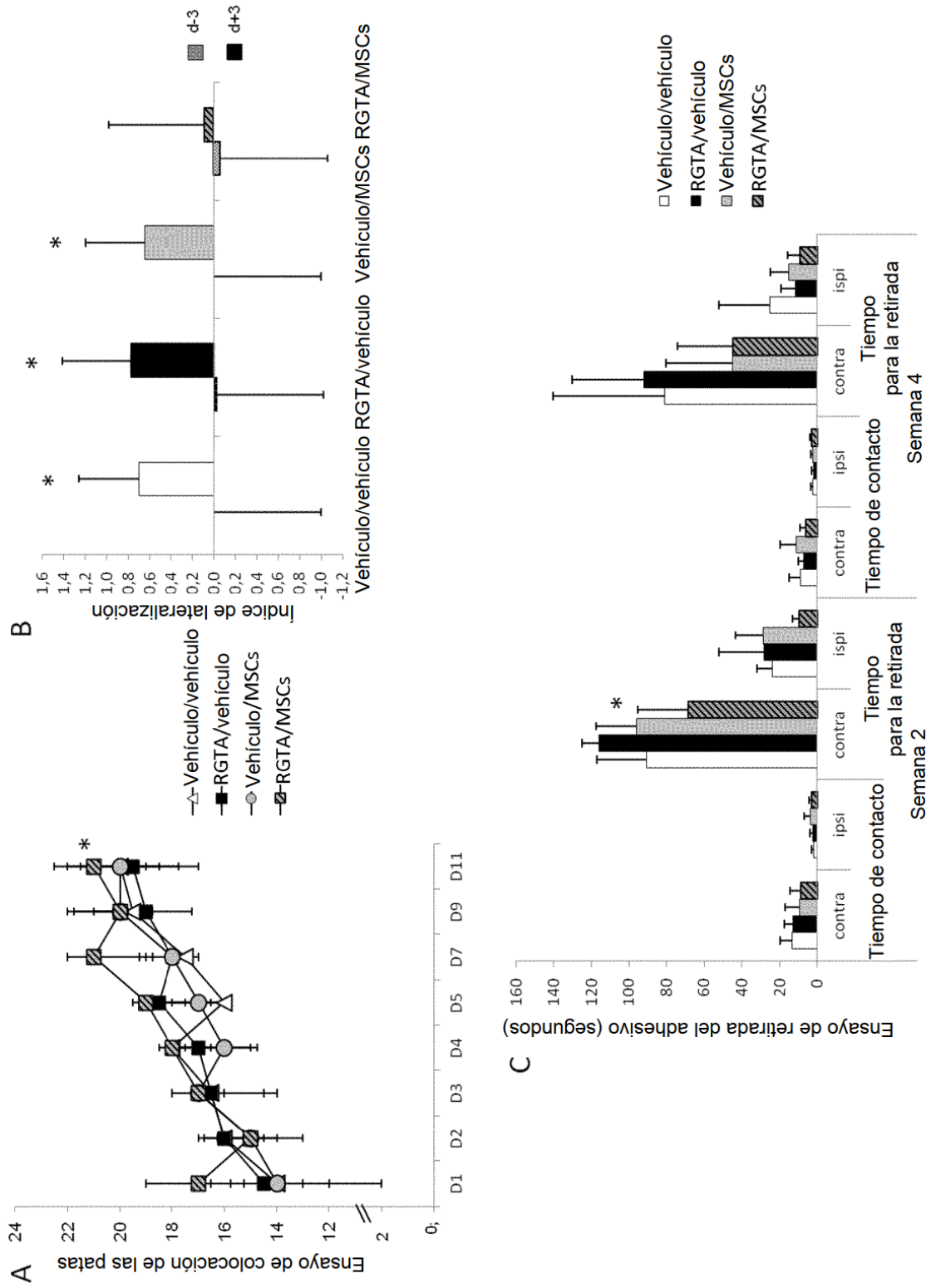


Figura 6

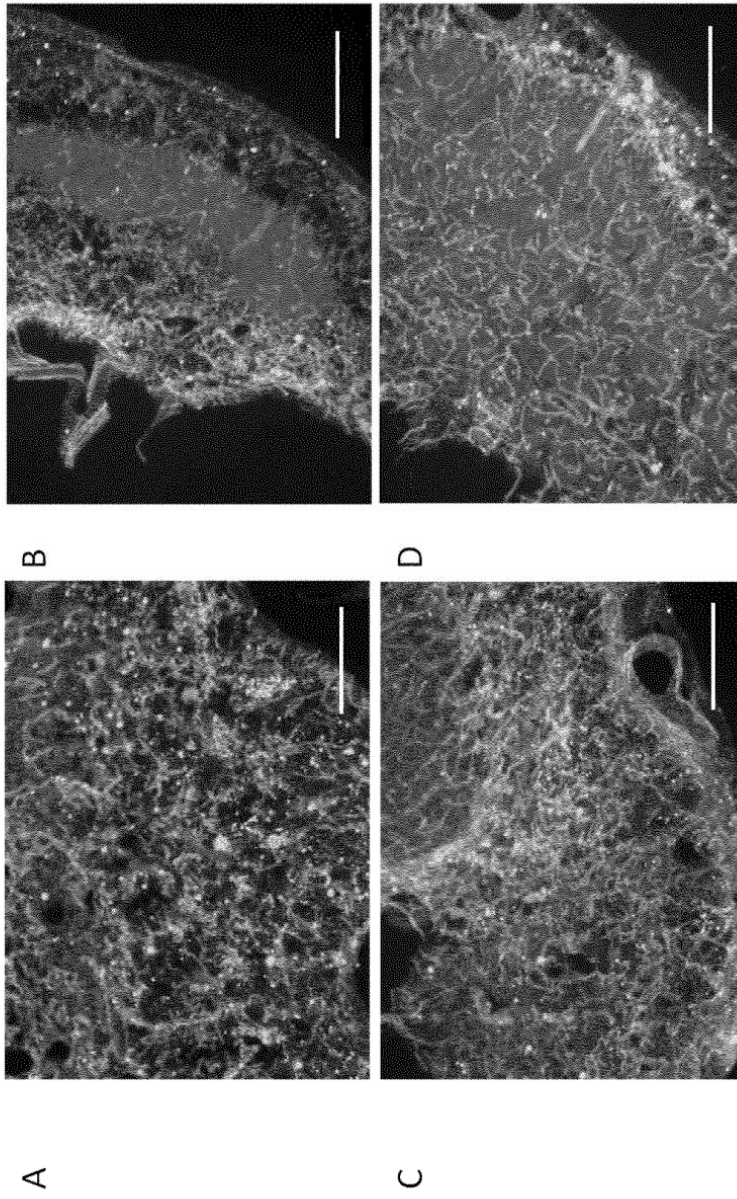


Figura 7