

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 767 070**

51 Int. Cl.:

A61K 35/30 (2015.01)

A61P 25/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.08.2017** E 17188180 (8)

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.10.2019** EP 3449931

54 Título: **Utilización de cerebrolisina**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
16.06.2020

73 Titular/es:

EVER NEURO PHARMA GMBH (100.0%)
Oberburgau 3
4866 Unterach am Attersee, AT

72 Inventor/es:

WINTER STEFAN y
MÖSSLER HERBERT

74 Agente/Representante:

CURELL SUÑOL, S.L.P.

ES 2 767 070 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

Utilización de cerebrolisina.

5 La presente invención se refiere al tratamiento de CADASIL.

CADASIL (para arteriopatía dominante autosómica cerebral con infartos subcorticales y leucoencefalopatía, o síndrome CADASIL) causa un tipo de síndrome lacunar acompañado de abstracción entre las características del cual se incluyen sucesos isquémicos subcorticales recurrentes y demencia vascular, y que está asociado a anormalidades difusas de la materia blanca en las imágenes neurológicas. CADASIL se hereda de manera autosómico dominante. Los individuos más afectados presentan un progenitor afectado; aparentemente las variantes patógenas *de novo* son raras. Cada hijo de una persona afectada presenta un riesgo de 50% de heredar la variante patógena y desarrollar signos de la enfermedad. Los ensayos prenatales de embarazo de riesgo incrementado y el diagnóstico genético preimplantacional resultan posibles en el caso de que se conozca la variante patógena presente en la familia; sin embargo, las peticiones de ensayo prenatal de trastornos típicamente de aparición en la edad adulta son poco comunes. El examen patológico revela múltiples pequeños infartos cerebrales profundos, leucoencefalopatía y angiopatía no amiloide no aterosclerótica que afecta principalmente a las arterias cerebrales pequeñas. En el análisis ultraestructural resultan patentes varias alteraciones de las células de músculo liso vascular. El gen mutante se ha localizado en el cromosoma 19 y se han identificado mutaciones del gen *Notch3* humano en pacientes de CADASIL que causan una grave alteración de este gen. De hecho, más de 95% de los individuos con CADASIL presentan variantes de sentido erróneo patógenas en *Notch3* (Rutten et al., en: Pagon et al. (editores), GeneReviews® (2000; actualizado en 2016); Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2017; Joutel et al., Nature 383:707-710, 1996). Mientras que más de 95% de las mutaciones de *Notch3* en los pacientes de CADASIL son mutaciones de sentido erróneo, otras son pequeñas delecciones dentro del marco o mutaciones de sitio de corte y empalme. Inesperadamente, todas las mutaciones patológicas conducen a un número impar de residuos de cisteína dentro de un EGFR dado. Se cree que los residuos de cisteína contribuyen a la integridad estructural de la proteína; de esta manera, la presencia o ausencia de residuos de cisteína adicionales posiblemente compromete el pliegue correcto de la proteína. Las mutaciones *de novo* son raras, aunque se ha informado de la existencia de casos individuales.

La característica distintiva patológica del CADASIL está constituida por gránulos electrodensos en el medio de las arteriolas y una tinción incrementada de Notch3 de la pared arterial, que puede evaluarse en una biopsia de piel. Actualmente no existe ningún tratamiento de eficacia probada para el CADASIL. Con frecuencia se utiliza el tratamiento antiplaquetario, aunque no ha demostrado eficacia en el CADASIL. La migraña debe tratarse tanto sintomática como profilácticamente, según la frecuencia de las manifestaciones. La incidencia simultánea de hipertensión, diabetes o hipercolesterolemia debe tratarse. La atención médica de apoyo (ayuda práctica, apoyo emocional y orientación psicológica) resulta apropiada para los individuos afectados y sus familiares. Sin embargo, existen recomendaciones de los agentes que se deben evitar, tales como la angiografía y los anticoagulantes, los cuales pueden provocar accidentes cerebrovasculares. Asimismo es conocido que el tabaquismo incrementa el riesgo de sucesos isquémicos. La terapia trombolítica (trombólisis intravenosa) está contraindicada debido al riesgo incrementado que se presume de hemorragia cerebral (Pagon et al., 2000; actualizado en 2016).

Debido a que no se dispone de un tratamiento eficaz para el CADASIL, los tratamientos están dirigidos a la búsqueda de posibles estrategias de modificación de la enfermedad a fin de mitigar las manifestaciones clínicas. Sin embargo, hasta el momento únicamente se ha informado de unos cuantos estudios muy preliminares.

En casos anecdóticos asimismo se ha utilizado valproato sódico para el tratamiento de la migraña. Se ha informado de que los inhibidores de acetilcolinesterasa no resultan eficaces sobre la variable principal de evaluación en el tratamiento del declive cognitivo (escala de evaluación de la demencia vascular tras 18 semanas), aunque se ha observado cierta mejora de la disfunción fronto-subcortical. Se han sometido a ensayo fármacos antiplaquetarios para la prevención primaria y secundaria de ictus, aunque con beneficios no demostrados y controvertidos. La acetazolamida ha sido sometida a ensayo para el incremento de la perfusión cerebral evaluada mediante imágenes de resonancia magnética (IRM) obtenidas por sonografía Doppler transcraneal y SPECT de perfusión cerebral con Tc-99m de dominio extracelular. Además, se ha utilizado como profilaxis para la migraña, destinada a reducir la frecuencia de los ataques de migraña. En el caso de la atorvastatina no se ha informado de ningún efecto sobre el flujo sanguíneo cerebral, analizado mediante Doppler transcraneal. La L-arginina ha mostrado vasoreactividad inducida, analizada mediante Doppler transcraneal. Los resultados finales para sapropterina (200 a 400 mg bid en 24 meses) fueron, para el criterio de valoración primario (diferencia media en el índice de hiperemia reactiva), no significativos para cualquier mejora de la vasoreactividad periférica. En un modelo de ratón, la combinación de factor de células madre y factor estimulante de colonias de granulocitos se ha informado de que restringe la progresión patológica del CADASIL (ambos en la revisión por Di Donato et al., en: BMC Medicine (2017) 15:41; DOI 10.1186/s12916-017-0778-8).

A partir de las pruebas de un curso más severo de la enfermedad en individuos con factores de riesgo vascular, particularmente tabaquismo e hipertensión, se considera que el control de los factores de riesgo vascular es una parte importante del control del CADASIL. En referencia a la utilización de fármacos antiplaquetarios, tales como

la aspirina o el clopidogrel, la mayoría de neurólogos aplica las directrices utilizadas para ictus esporádicos en el tratamiento de los pacientes de CADASIL. Sin embargo, no se ha determinado la pertinencia de este enfoque. De hecho, la génesis trombótica de los sucesos isquémicos en esta enfermedad todavía no ha sido demostrada. Por otra parte, muchos informes subrayan la presencia de microhemorragias (microsangrados) en un porcentaje considerable de pacientes de CADASIL. Por estos motivos, sigue sin haberse clarificado cuál es el nivel de seguridad de los fármacos antiplaquetarios en esta enfermedad. De manera similar, no queda claro cuál es el beneficio de la trombólisis, aunque se ha sugerido que resulta beneficioso en el ictus lacunar esporádico.

En un ensayo multicéntrico en 168 pacientes con donepezilo, no pudo observarse ninguna mejora en el criterio de valoración primario de la escala de evaluación de demencia vascular - subescala cognitiva. Sin embargo, se observaron mejoras en varias medidas de función ejecutiva, aunque no está clara cuál es la relevancia clínica de estos resultados. Las complicaciones del CADASIL, tales como la depresión y la migraña, aparentemente responden a tratamientos similares a los utilizados en la enfermedad esporádica (Dí Donato et al., 2017).

En ausencia de datos específicos para el CADASIL, la mayoría de neurólogos utilizan aspirina en la prevención secundaria tras ictus isquémicos en pacientes de más edad, por ejemplo, de más de 40 años, aunque no hay pruebas en favor o en contra de su utilización. No se ha determinado si esta estrategia resulta apropiada en el CADASIL y requerirá investigación adicional, dado el posible riesgo hemorrágico incrementado. Los pacientes que requieren someterse a tratamiento anticoagulación para una indicación clara, tal como fibrilación auricular de alto riesgo, deben monitorizarse cuidadosamente dado el riesgo informado de hemorragia intracerebral.

Por lo tanto, resulta evidente que se requieren nuevas interacciones terapéuticas racionales para los pacientes de CADASIL para tratar los síntomas de la enfermedad y la progresión de la misma, especialmente intervenciones terapéuticas que reduzcan la mortalidad o incrementen la tasa de supervivencia, respectivamente.

Por lo tanto, la presente invención proporciona cerebrolisina para la utilización en la reducción de la mortalidad en pacientes de CADASIL (arteriopatía dominante autosómica cerebral con infartos subcorticales y leucoencefalopatía).

La cerebrolisina, una preparación peptídica producida mediante una degradación enzimática estandarizada de proteínas cerebrales, que comprende péptidos de bajo peso molecular (<10 kDa) y aminoácidos libres.

La cerebrolisina es una mezcla peptídica con propiedades de tipo neurotrófico que mejora los déficits conductuales y cognitivos en modelos preclínicos y pacientes con demencia, y mejora la función motora, el rendimiento cognitivo y las actividades cotidianas en pacientes de ictus, además de en pacientes de lesión cerebral traumática (LCT). El modo de acción de la cerebrolisina es pleiotrópico, con propiedades que van desde las neuroprotectoras, tales como la reducción de la excitotoxicidad y formación de radicales libres, hasta una recuperación potenciada mediante incremento de la neuroplasticidad y la neurogénesis.

La cerebrolisina se utiliza para el ictus y la demencia vascular. Se informa de un efecto beneficioso sobre la función cognitiva en personas con demencia vascular, posiblemente mediante un menor depósito de beta-amiloide. La cerebrolisina está autorizada para el tratamiento del ictus en muchos países europeos y asiáticos.

Con la presente invención inesperadamente se ha observado que la cerebrolisina presenta un impacto significativo sobre la reducción de la mortalidad y, por lo tanto, de mejora la supervivencia de los pacientes de CADASIL. Aunque no se ha observado ningún efecto sobre la vacuolización de la materia blanca, una característica distintiva del CADASIL (lo que provoca que la presente invención resulte todavía más inesperada), se ha demostrado una reducción altamente estadísticamente significativa de la tasa de mortalidad con el tratamiento de cerebrolisina en un modelo de ratón de CADASIL del estado de la técnica.

Dicho efecto era completamente inesperado, específicamente en vista del hecho de que, en una publicación anterior se había informado de que no existía ningún efecto protector *in vitro* de la cerebrolisina frente a la apoptosis inducida por estrés oxidativo en células procedentes de pacientes de CADASIL (Formichi et al., *Neurol. Sci.* 34:553-556, 34, 2013; doi: 10.1007/s10072-012-1174-y).

En dicho estudio, Formichi et al. utilizaron linfocitos de sangre periférica (PBL) procedentes de 15 pacientes de CADASIL (intervalo de edades de 34 a 70 años) y 2-desoxi-D-ribosa (dRib), un azúcar altamente reductor, como estímulo proapoptótico paradigmático. Se analizó la apoptosis mediante citometría de flujo y microscopía de fluorescencia. La administración de cerebrolisina en PBL de pacientes de CADASIL cultivadas bajo condiciones estándares no presentó ningún efecto sobre el porcentaje de células apoptóticas. La administración de Cere en PBL cultivadas con dRib causó una reducción significativa de la apoptosis tras 48 h de cultivo en únicamente 5 pacientes, mientras que, en los 10 pacientes restantes, el tratamiento de cerebrolisina no estaba asociado a ninguna diferencia significativa en el porcentaje de apoptosis. Este resultado demuestra un efecto protector de la cerebrolisina frente a la apoptosis inducida por estrés oxidativo sólo en 30% de los pacientes de CADASIL. Por lo tanto, se concluyó que el gen *Notch3* probablemente no influye sobre las propiedades antiapoptóticas de la cerebrolisina *in vitro*. Lo anterior asimismo podría explicar el resultado obtenido durante el curso de la presente

invención, de que la cerebrolisina no presenta ningún efecto sobre la vacuolización. En cualquier caso, por lo tanto, resultó completamente inesperado que la cerebrolisina pudiese presentar un efecto sobre el parámetro primario de mortalidad.

5 A pesar de los resultados obtenidos por Formichi et al., y a pesar del hecho de que los pacientes de CADASIL presentan una mutación en el gen *Notch3*, la cerebrolisina puede aplicarse eficazmente en el tratamiento de todos los pacientes de CADASIL a fin de obtener los efectos según la presente invención.

10 El CADASIL habitualmente se diagnostica genéticamente, preferentemente mediante secuenciación del gen *Notch3* completo. Las variantes patógenas truncadas heterocigóticas del exón 33 de NOTCH3 (codificante de los dominios PEST de la parte intracelular de la proteína) se han descrito en el síndrome meníngeo lateral (síndrome de Lehman). Se cree que estas variantes patógenas actúan mediante una ganancia de la función de señalización de Notch3 y son diferentes de las variantes patógenas de NOTCH3 en el CADASIL. Se ha descrito una variante patógena del exón 25 de Notch3 (c. 4556T>C, p.Leu1519Pro) en la miofibromatosis infantil dominante autosómica.

15 Las imágenes de resonancia magnética (IRM) cerebrales de los pacientes de CADASIL muestran hipointensidades en imágenes ponderadas en T1 e hiperintensidades en imágenes ponderadas en T2, habitualmente lesiones de materia blanca confluyente múltiple de diversos tamaños, son características. Estas lesiones se concentran en torno a los ganglios basales, materia blanca periventricular y el puente troncoencefálico, y son similares a las observadas en la enfermedad de Binswanger. Estas lesiones de la materia blanca asimismo se observan en individuos asintomáticos con el gen mutado. Aunque no se utilizan las IRM para diagnosticar el CADASIL, puede mostrar la progresión de los cambios en la materia blanca incluso décadas antes de la aparición de síntomas.

20 Los cambios en la materia blanca en los pacientes de CADASIL con frecuencia implican el lóbulo anterior temporal, la cápsula externa y el giro frontal superior. Los cambios en el polo temporal anterior se ha demostrado que presentan una elevada sensibilidad y especificidad para la enfermedad (aproximadamente 90% de ambos) y resultan útiles en el diagnóstico. En poblaciones asiáticas, la afectación del lóbulo temporal anterior es menos común. Los cambios en la cápsula externa asimismo presentan una elevada sensibilidad (aproximadamente 90%) pero una especificidad más baja (aproximadamente 50%). De hecho, un análisis sistemático reciente ha demostrado una participación similar de la cápsula externa en CADASIL y en la enfermedad de vasos pequeños (SVD) esporádica. Las anomalías en la señal en el cuerpo calloso raramente presentes en la SVD esporádica, se describen en el CADASIL; tales anomalías asimismo son una característica de la esclerosis múltiple, lo que es un motivo para el diagnóstico incorrecto del CADASIL como esclerosis múltiple. Los microsangrados cerebrales, que se muestran mediante imágenes de eco de gradiente con lesiones hipointensas en forma de puntos, ocurren en una proporción variable de casos (30% a 70%) y habitualmente se incrementan con la edad y factores de riesgo tales como la presión sanguínea elevada, y asimismo se han descrito hemorragias intracerebrales en algunos pacientes, especialmente los de origen asiático (di Donato et al., 2017).

25 El CADASIL es ICD-10-CM código diagnóstico clasificado como I67.8 ("Otras enfermedades cerebrovasculares específicas") y se ha definido como una enfermedad subcortical, aunque estudios recientes con IRM 7-Tesla de campo alto, que permite obtener imágenes de redisolución más elevada, han detectado una participación primaria del córtex, incluyendo la demostración de microinfartos corticales y alteraciones corticales difusas tempranas en zonas frontales y parietales, con frecuencia siguiendo un patrón simétrico en ambos hemisferios. Estos cambios no están relacionados con el adelgazamiento cortical o con lesiones subcorticales y se ha planteado la hipótesis de que son secundarios a densidad vascular venosa o edema intramielina. Asimismo se ha informado de datos similares en modelos experimentales. Además, los cambios subcorticales podrían inducir cambios corticales secundarios. En un estudio longitudinal, se realizó un seguimiento de las lagunas incidentes por adelgazamiento cortical específicamente en regiones cerebrales conectadas. Otro desarrollo reciente es la utilización de imágenes con tensor de difusión para caracterizar los daños en tejidos. El cambio típico en la métrica de difusión observada en pacientes de CADASIL es una reducción de la anisotropía fraccional (una medida de la direccionalidad de la difusión) y un incremento del coeficiente aparente de difusión o difusividad media (una medida de la extensión de la difusión). Se ha propuesto el análisis de histogramas como una herramienta sensible para medir los cambios relacionados con CADASIL en secciones transversales además de longitudinalmente (revisión del diagnóstico y el diagnóstico diferencial en di Donato et al., 2017, y en Rutten et al., 2000, actualizado en 2016).

30 Aunque todavía se considera infradiagnosticado, el diagnóstico de CADASIL ha mejorado significativamente en los últimos 20 años y actualmente es mucho más exacto.

35 La cerebrolisina es una preparación farmacéutica de neuropéptidos generados proteolíticamente que se derivan a partir de proteínas cerebrales purificadas. La cerebrolisina se encuentra disponible en el mercado, con frecuencia en forma de producto estandarizado. La cerebrolisina comprende 15% a 30% de péptidos de bajo peso molecular (<10 kDa) y 70% a 85% de aminoácidos libres, tales como alanina, ácido aspártico, arginina, ácido glutámico, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, triptófano, cisteína y valina. La disolución preferentemente es estéril y está lista para la inyección o infusión (es decir, satisface todos los estándares y requisitos de las preparaciones farmacéuticas que deben administrarse en pacientes humanos). Se dan a conocer preparaciones de cerebrolisina en el documento nº EP 0 452 299 A1 CN y Gromova et al.,

(Difficult Patient 8:25-31, 2010).

Las concentraciones de cerebrolisina preferentes que deben utilizarse según la presente invención contienen 50 a 1000 mg, preferentemente 100 a 500 mg, especialmente 150 a 250 mg, de concentrado de cerebrolisina por ml en disolución acuosa. Tal como ya se ha indicado anteriormente, la cerebrolisina contiene aproximadamente 85% de aminoácidos libres y 15% de péptidos de bajo peso molecular (<10 kDa), respecto al contenido de nitrógeno total.

El concentrado de cerebrolisina presenta un contenido estandarizado de aminoácidos específicos. En el concentrado (la concentración del cual puede modificarse, en caso necesario, en la administración), la cerebrolisina presenta el contenido de aminoácidos siguiente (en mg/ml de concentrado de cerebrolisina): alanina: 2.40 a 3.60, especialmente 3.10 a 3.50; ácido aspártico: 2.40 a 3.60, especialmente 2.20 a 3.50; valina: 1.60 a 2.40, especialmente 2.10 a 2.40; histidina: 1.04 a 1.56, especialmente 1.10 a 1.50; glicina: 1.20 a 1.80, especialmente 1.60 a 1.90; ácido glutámico: 3.20 a 4.80, especialmente 3.30 a 4.60; isoleucina: 1.60 a 2.40, especialmente 2.20 a 2.40; leucina: 4.80 a 7.20, especialmente 5.70 a 6.30; lisina: 4.80 a 7.20, especialmente 5.80 a 7.20; metionina: 0.35 a 0.65, especialmente 0.40 a 0.70; prolina: 1.60 a 2.40, especialmente 2.00 a 2.40; serina: 0.21 a 0.39, especialmente 0.23 a 0.36; treonina: 0.21 a 0.39, especialmente 0.26 a 0.35; triptófano: 0.35 a 0.65, especialmente 0.40 a 0.70; fenilalanina: 1.60 a 2.40, especialmente 1.60 a 2.40. Resulta evidente que, tras la dilución de dicho concentrado, la cantidad absoluta de un aminoácido específico por ml se reduce; sin embargo, la proporción relativa de cada aminoácido con respecto a otros y con respecto a los péptidos de bajo peso molecular (de 10,000 o menos), siendo dicha proporción relativa un elemento esencial para los efectos terapéuticos obtenidos con la presente invención) sigue siendo la misma tras la dilución.

Se da a conocer un método para producir cerebrolisina en el documento nº EP 0 452 299 A1 y se obtiene a partir de la hidrólisis enzimática de fracción de proteína cerebral porcina. Cada ml de dicho producto contiene 3.00 mg de alanina, 3.00 mg de ácido asparagínico, 0.06 g de cistina, 4.30 mg de ácido glutamínico, 1.50 mg de glicina, 1.30 mg de histidina, 2.00 mg de isoleucina, 6.00 mg de leucina, 0.50 mg de metionina, 2.00 mg de fenilalanina, 2.00 mg de prolina, 0.30 g de serina, 0.30 g de treonina, 0.50 g de triptófano y 2.00 mg de tirosina como aminoácidos, así como péptidos que presentan un peso molecular de 10.000 o inferior. La mezcla de péptidos y aminoácidos en las preparaciones dadas a conocer en el documento nº ep 0 452 299 A1 contenía (producto de cerebrolisina típico) aproximadamente 15% de péptidos con un peso molecular de 10,000 o inferior y aproximadamente 85% de aminoácidos libres.

La dosis aplicada puede preferentemente encontrarse en el intervalo de 100 a 10,000 mg (0.5 a 50 ml de concentrado de cerebrolisina). Preferentemente, el paciente de CADASIL se trata con una dosis en el intervalo de 0.1 a 100 ml, preferentemente 1 a 50 ml de cerebrolisina, correspondiente a 21.5 a 21,520 mg de concentrado de cerebrolisina (un concentrado de cerebrolisina preferente contiene 215.2 mg/ml). En caso de aplicarse intramuscularmente, la dosis habitualmente es inferior que por vía intravenosa (por ejemplo, preferentemente 0.5 a 5 ml y preferentemente de 0.5 a 10 ml por vía intravenosa). Preferentemente, el paciente de CADASIL por lo tanto se trata con una dosis administrada por vía intramuscular de 0.1 a 10 ml, preferentemente de 0.5 a 5 ml, correspondientes a 21.5 mg a 2152 mg de concentrado de cerebrolisina. La cerebrolisina asimismo puede infundirse continuamente (habitualmente a volúmenes superiores a 10 ml) y el concentrado de cerebrolisina puede, por lo tanto, por ejemplo, diluirse con disolución de cloruro sódico al 0.9% (9 mg de NaCl), disolución de Ringer (Na^+ 153.98 mmoles/l, Ca^{2+} 2.74 mmoles/l, K^+ 4.02 mmoles/l, Cl^- 163.48 mmoles/l), 5% de glucosa. Las duraciones de la infusión de típicamente 5 min a 4 h, preferentemente de 10 min a 2 h, especialmente de 15 a 60 min, pueden llevarse a cabo (preferentemente cada día), por ejemplo, durante 1 a 100 d, preferentemente de 5 a 50 d, preferentemente de 10 a 30 d (habitualmente la administración se lleva a cabo sólo en días de trabajo, no en fines de semana, por lo que habitualmente se aplica un ciclo de tratamiento en 3-5 x 5 días consecutivos de administración). Según una forma de realización preferida, el paciente de CADASIL se trata con una dosis administrada por vía intravenosa de 0.1 a 100 ml, preferentemente de 1 a 50 ml, correspondientes a 215.2 a 21,520 mg de concentrado de cerebrolisina.

Los ciclos de tratamiento pueden repetirse tras un periodo libre de tratamiento de 1 a 6 meses o de 1 a 3 meses, preferentemente de 2 a 3 meses.

La presente invención se ilustra adicionalmente mediante los ejemplos y figuras, a continuación, aunque sin encontrarse limitada a los mismos.

La figura 1 representa la tasa de mortalidad calculada de los ratones tratados con disolución salina versus el grupo de cerebrolisina (35% vs. 0%).

La figura 2 representa una sección sagital de cerebro teñida con Luxol Fast Blue y Nissl de un ratón con CADASIL a 0.5 mm lateralmente de la línea media. El cuerpo celular es azul oscuro; la materia blanca es predominantemente de color turquesa. La línea discontinua comprende la región observada: el cuerpo caloso anterior.

La figura 3 representa el cuerpo caloso anterior en un ratón sano joven (A) y en un ratón con CADASIL de 18

meses de edad (B). No se produce vacuolización en el cuerpo callo medio anterior de ratones C57BL/6 de seis meses de edad (A) y vacuolización pronunciada en ratones con CADASIL (B). En contraste con las vacuolas, que son redondas, los vasos son visibles como estructuras alargadas (ver el cuadro interior).

5 La figura 4 representa el número de vacuolas en el cuerpo calloso anterior de ratones transgénicos con CADASIL de 18 meses de edad tratados entre los meses 12 y 18 con tres ciclos de vehículo (izquierda) o cerebrolisina (derecha). En ambos grupos, se observó la patología esperada, es decir, la vacuolización de la materia blanca (ninguna diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos ($p=0.12$, prueba t de Student)).

10

Ejemplos

Efecto terapéutico de la cerebrolisina en un modelo murino de CADASIL

15 Materiales y métodos:

Modelo de ratón con CADASIL: Mutación NOTCH3^{R169C} (línea 88)

20 El estudio de prueba de concepto para examinar el efecto terapéutico de cerebrolisina en CADASIL se llevó a cabo en un modelo de ratón con CADASIL transgénico establecido, que expresa la mutación NOTCH3^{R169C} (línea 88). Esta sustitución específica de arginina por cisteína en el residuo 169 en el exón 4 se ha descrito en pacientes de CADASIL y aparentemente es una mutación frecuente (Joutel et al., 1997). Dicha cepa transgénica de ratón se ha caracterizado anteriormente en detalle y muestra varios aspectos bioquímicos del CADASIL y, de esta manera, se considera un modelo animal genético adecuado de la enfermedad (Ghosh et al., 2015; Joutel et al., 2010). Joutel y colaboradores (Joutel et al., 2010) han demostrado que la expresión *in vivo* del transgén mutado en el ratón reproducía el patrón endógeno de expresión de NOTCH3 y las características patológicas principales del CADASIL, incluyendo los agregados típicos de NOTCH3^{DEC}, depósitos de material osmiófilo granular (MOG) en vasos cerebrales, daños progresivos en la materia blanca y flujo sanguíneo cerebral reducido. Los ratones mutantes mostraban respuestas miógenas atenuadas y un calibre reducido de las arterias cerebrales, así como una autorregulación cerebrovascular alterada, hiperemia funcional y una reducción sustancial de la densidad capilar de la materia blanca. Una caracterización reciente del modelo NOTCH3^{R169C} ha revelado el importante papel de los pericitos en la disfunción de vasos cerebrales y en la fuga de la barrera hematoencefálica (BHE). Los autores demostraron que, a mayor edad, se agregaba NOTCH3 mutado en torno a los pericitos y células musculares lisas. La acumulación de NOTCH3 causaba apoptosis, conduciendo a una reducción significativa del número de pericitos y cobertura de capilares por procesos de pericitos. Estos cambios estaban asociados a un desprendimiento de proyecciones astrocíticas de los microvasos cerebrales, la abertura de la BHE y disfunción microvascular, medida por fuga de proteínas plasmáticas, reducción de la expresión de proteínas de la unión adherente endotelial y reactividad microvascular reducida con el dióxido de carbono.

40 Ejecución experimental:

Con el fin de evaluar el efecto de la cerebrolisina en este modelo de ratón de CADASIL, se criaron 28 animales y se dejó que envejeciesen hasta más de 12 meses, antes de iniciar tres ciclos de tratamiento. En los ratones mutados se administraron 2.5 ml/kg de cerebrolisina diluida en disolución salina al 0.9% o disolución salina sola. 45 El tratamiento se aplicó de una manera aleatorizada y completamente ciega en ciclos de 3 semanas de 5 inyecciones IP semanales (3x15 inyecciones por ratón por tratamiento en total). Los animales se trataron a una edad de 12, 14 y 16 meses, respectivamente, y se sacrificaron para el análisis a los 18 meses de edad. Se seleccionó el régimen de este tratamiento basándose en los datos obtenidos en estudios experimentales que sometían a ensayo el efecto terapéutico de la cerebrolisina en diferentes trastornos neurodegenerativos. La justificación de un procedimiento de envejecimiento de 12 meses anterior al inicio del tratamiento parte de la observación de que los ratones de este modelo empiezan a manifestar características de enfermedad típicas de CADASIL aproximadamente a esta edad (Joutel et al., 2010).

55 Además, considerando el aspecto de traducción, se seleccionó un enfoque de intervención terapéutico y no preventivo para representar una situación clínica realista, en la que la terapia se iniciaría una vez la patología ha avanzado a un estadio que permite el diagnóstico. Se seleccionó la mortalidad como parámetro primario, representando una medida de resultado robusta y clínicamente válida. Además, se cuantificó el grado de las lesiones de la materia blanca específicas de CADASIL mediante análisis histológico utilizando tinción con Luxol Fast Blue. Con este fin, los animales se perfundieron y se incluyeron los cerebros en parafina. De cada animal se examinaron dos zonas de recuento en tres secciones sagitales en el cuerpo calloso medio anterior.

60

Resultados

65 El tratamiento de cerebrolisina evitó por completo la mortalidad de los ratones transgénicos de CADASIL. Durante el periodo de observación de 12 a 18 meses (correspondientes a la edad del animal), 5 de cada 14 ratones en el grupo de control murieron (36%); sin embargo, no murió ni un solo animal del grupo tratado con cerebrolisina. La

tasa de mortalidad calculada de la cohorte tratada con disolución salina era de 35% frente a 0% en el grupo de cerebrolisina, mostrando que la terapia de cerebrolisina ejerció un efecto de potenciación de la supervivencia en esta enfermedad (figura 1).

5 A continuación, se sacrificaron los animales mediante fijación por perfusión y se extrajeron los cerebros; se incluyeron en parafina, se realizaron secciones sagitales y se tiñeron con Luxol Fast Blue para el ensayo de la vacuolización en la materia blanca. La figura 2 muestra una sección sagital de cerebro teñida con Luxol Fast Blue y Nissl de un ratón con CADASIL a 0.5 mm lateralmente de la línea media. El cuerpo celular es azul oscuro; la materia blanca es predominantemente de color turquesa. La línea discontinua comprende la región observada: el cuerpo caloso anterior.
10

Los ratones C57BL/6 macho de seis semanas de edad no mostraban vacuolización en el cuerpo caloso medio anterior (figura 3A), la estructura del cual se encuentra patológicamente alterada en los ratones con CADASIL (Joutel et al., J. Clin. Invest. 120, 433-445, 2010). En contraste, se observó una pronunciada vascularización en los ratones con CADASIL (figura 3B). De esta manera, resultó posible reproducir los cambios patológicos en la materia blanca de ratones con CADASIL conocidos a partir de la literatura. En animales tratados con la sustancia portadora, se midieron 22 ± 7 vacuolas (medias \pm desviación estándar, $n=8$), 26 ± 5 vacuolas ($n=14$) en los animales tratados con cerebrolisina. Las diferencias entre los grupos no eran significativas (figura 4, $p=0,12$, prueba t de Student). A este respecto, la cerebrolisina aparentemente no presenta ningún efecto sobre la vacuolización de la sustancia blanca en ratones con CADASIL.
15
20

En conjunto, el efecto positivo sobresaliente sobre la mortalidad demuestra que la cerebrolisina es un potente candidato a agente terapéutico para combatir la enfermedad del CADASIL.

REIVINDICACIONES

1. Cerebrolisina para una utilización en la reducción de la mortalidad en pacientes de CADASIL.
- 5 2. Cerebrolisina para una utilización según la reivindicación 1, en la que el paciente de CADASIL presenta una mutación en el gen Notch3.
3. Cerebrolisina para una utilización según la reivindicación 1 o 2, en la que el paciente de CADASIL se trata con una preparación de cerebrolisina que contiene 50 a 1000 mg, preferentemente 100 a 500 mg, especialmente 150
10 a 250 mg, de concentrado de cerebrolisina por ml en disolución acuosa.
4. Cerebrolisina para una utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que el paciente de CADASIL se trata con una dosis en el intervalo de 0.1 a 100 ml, preferentemente 1 a 50 ml de cerebrolisina, correspondiente a 21.5 a 21,520 mg de concentrado de cerebrolisina.
15
5. Cerebrolisina para una utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que el paciente de CADASIL se trata con una dosis administrada por vía intramuscular de 0.1 a 10 ml, preferentemente 0.5 a 5 ml, correspondiente a 21.5 mg a 2152 mg de concentrado de cerebrolisina.
- 20 6. Cerebrolisina para una utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que el paciente de CADASIL se trata con una dosis administrada por vía intravenosa de 0.1 a 100 ml, preferentemente 1 a 50 ml, correspondiente a 215.2 a 21,520 mg de concentrado de cerebrolisina.
7. Cerebrolisina para una utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que el paciente de CADASIL se trata mediante infusión continua de cerebrolisina.
25
8. Cerebrolisina para una utilización según la reivindicación 7, en la que la infusión se lleva a cabo durante una duración de infusión de 5 min a 4 h, preferentemente 10 min a 2 h, especialmente 15 a 60 min; y/o en la que la infusión se lleva a cabo durante 1 a 100 d, preferentemente de 5 a 50 d, especialmente de 10 a 30 d.
30
9. Cerebrolisina para una utilización según la reivindicación 8, en la que la infusión se lleva a cabo una vez al día.
10. Cerebrolisina para una utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en la que la infusión se lleva a cabo mediante dilución de cerebrolisina con disolución de cloruro sódico al 0.9%, disolución de Ringer o glucosa al 5%.
35
11. Cerebrolisina para una utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en la que el paciente de CADASIL se trata con una preparación de cerebrolisina que contiene hidróxido sódico.
- 40 12. Cerebrolisina para una utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en la que el paciente de CADASIL se trata en ciclos de tratamiento que se repiten después de un periodo sin tratamiento de 1 a 6, preferentemente de 1 a 3, especialmente de 2 a 3, meses.

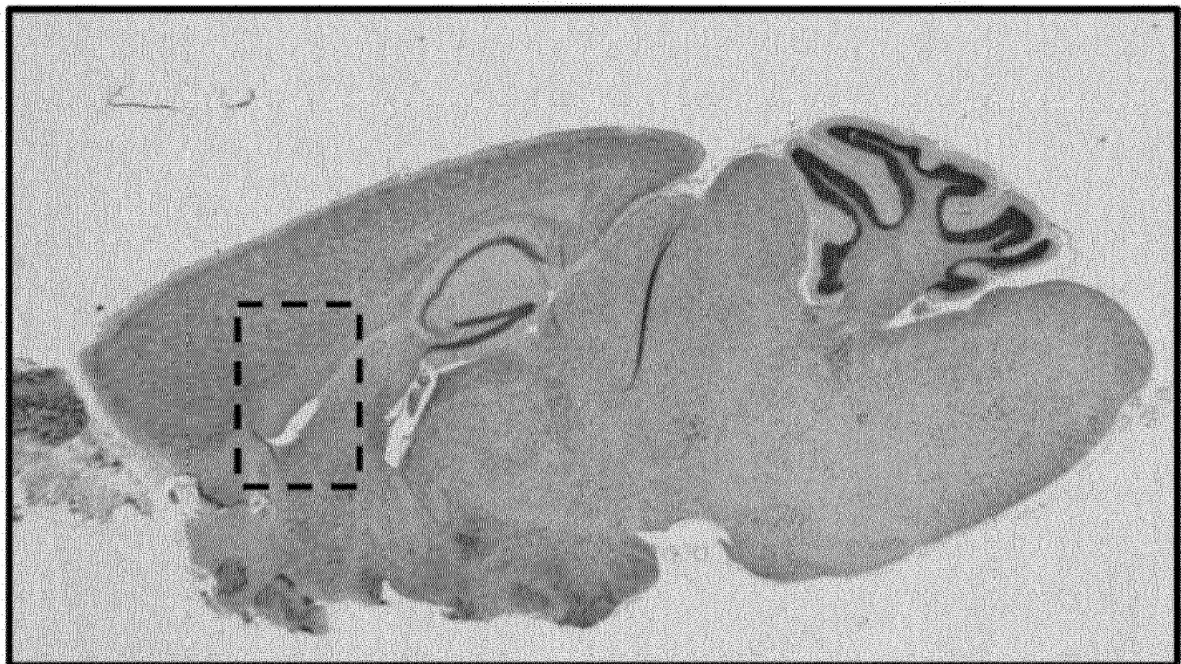
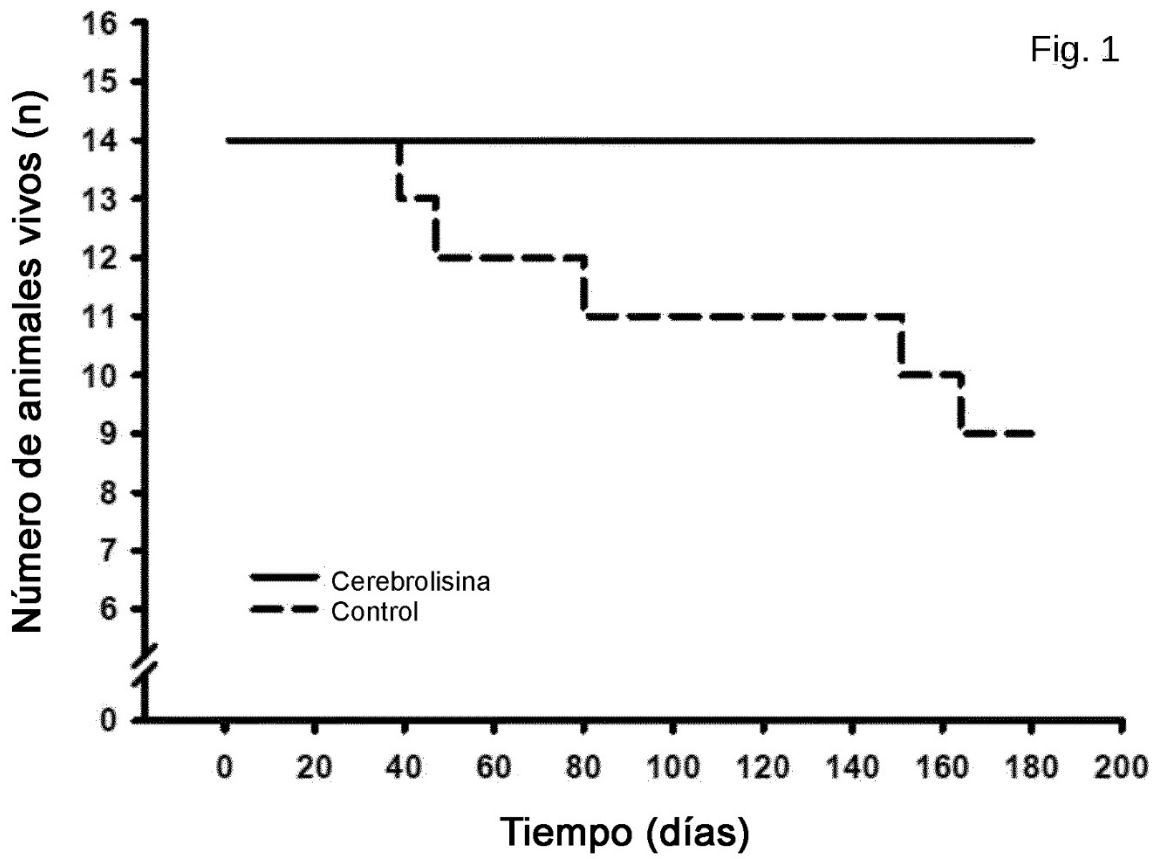


Fig. 2

Fig. 3A

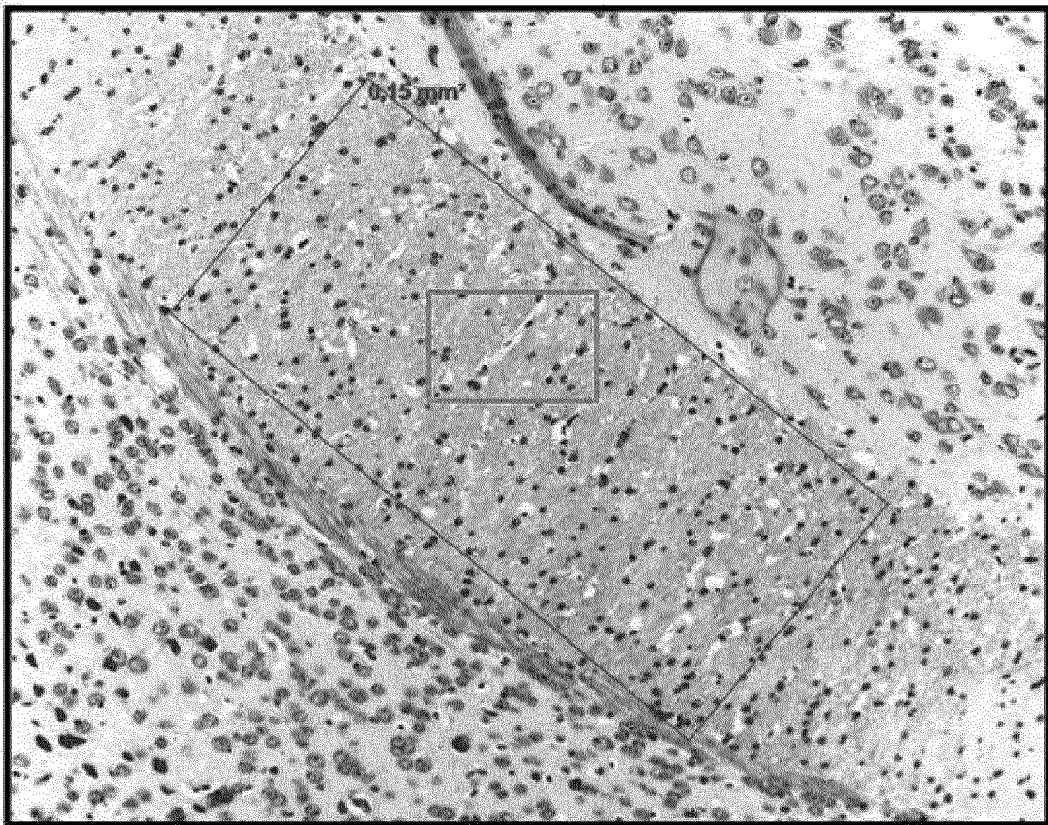
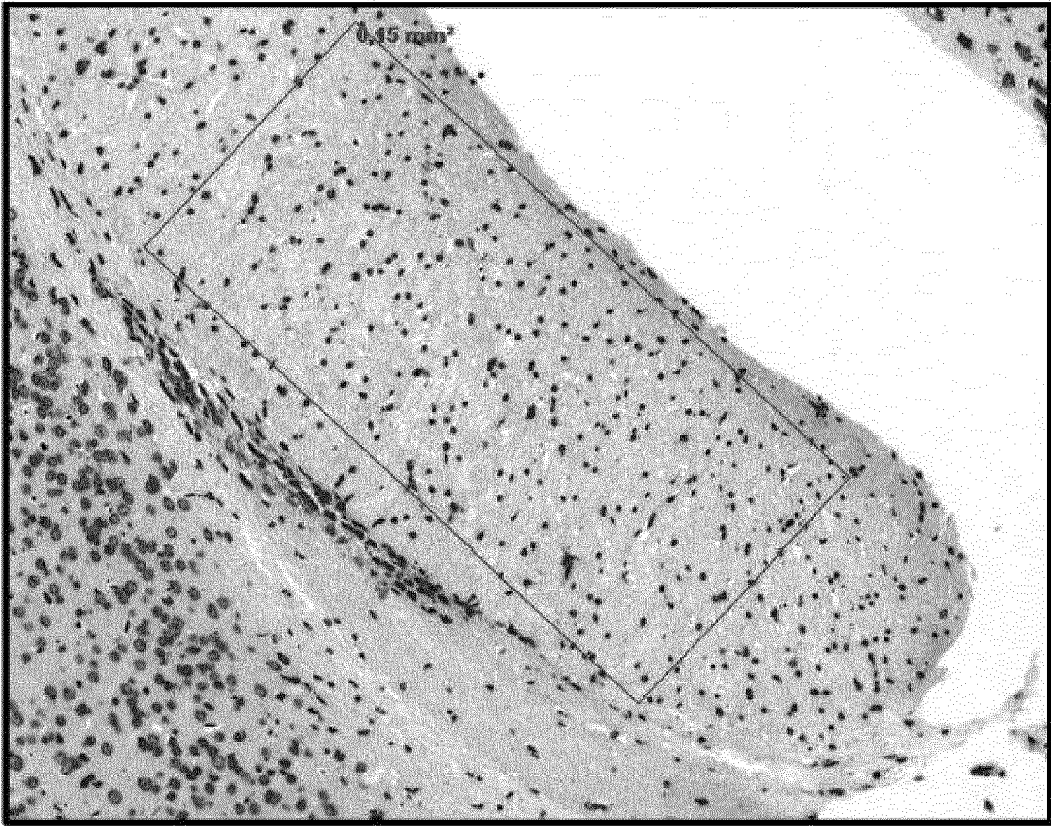


Fig. 3B

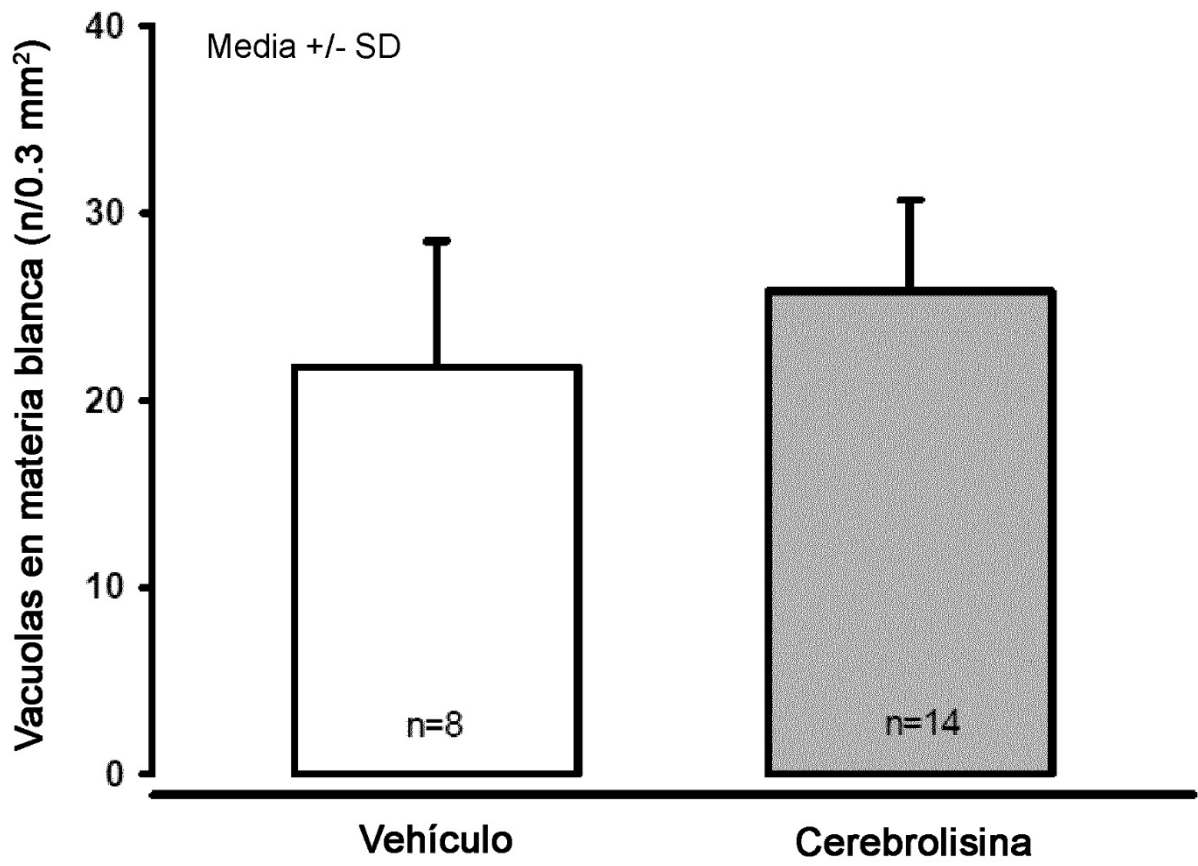


Fig. 4