

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 370 790**

21 Número de solicitud: 201030786

51 Int. Cl.:

**A61K 31/194** (2006.01)

**A61K 9/08** (2006.01)

**A61P 9/00** (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION CON EXAMEN PREVIO

B2

22 Fecha de presentación: **25.05.2010**

43 Fecha de publicación de la solicitud: **22.12.2011**

Fecha de la concesión: **05.10.2012**

Fecha de modificación de las reivindicaciones:  
**22.03.2012**

45 Fecha de anuncio de la concesión: **18.10.2012**

45 Fecha de publicación del folleto de la patente:  
**18.10.2012**

73 Titular/es:

**UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE  
COMPOSTELA  
EDIFICIO EMPRENDIA CAMPUS SUR  
15782 Santiago de Compostela, A Coruña, ES;  
SERVIZO GALEGO DE SAUDE y  
FUNDACIÓN PARA LA INVESTIGACIÓN  
DESARROLLO E INNOVACIÓN DEL COMPLEJO  
HOSPITALARIO UNIVERSITARIO DE SANTIAGO  
(IDICHUS)**

72 Inventor/es:

**CASTILLO SÁNCHEZ, JOSÉ;  
SOBRINO MOREIRAS, TOMAS;  
RAMOS CABRER, PEDRO;  
CAMPOS PEREZ, FRANCISCO;  
AGULLA FREIRE, JESUS y  
ARGIBAY GONZALEZ, BARBARA**

74 Agente/Representante:

**TORRENTE VILASANCHEZ, SUSANA**

54 Título: **USO DE OXALACETATO EN EL TRATAMIENTO DE ISQUEMIA.**

57 Resumen:

Uso de oxalacetato en el tratamiento de isquemia. La presente invención proporciona cantidades terapéuticamente efectivas para el tratamiento de trastornos asociados a elevados niveles de glutamato en el tejido cerebral, como por ejemplo, la isquemia cerebral. Además, las composiciones de la invención son adecuadas para la administración de tipo bolus.

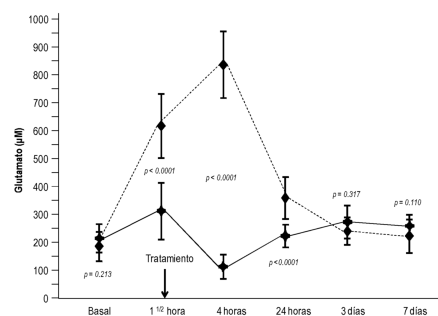


Figura 2

ES 2 370 790 B2

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 40.2.8 LP.

## **DESCRIPCIÓN**

### **Uso de oxalacetato en el tratamiento de isquemia**

#### **Sector de la técnica**

La presente invención se enmarca en el campo de la medicina para el tratamiento de  
5 trastornos asociados a elevadas concentraciones de glutamato en el tejido cerebral,  
como por ejemplo la isquemia cerebral.

#### **Antecedentes**

El ictus es una de las principales causas de muerte en los países desarrollados que  
10 además puede generar una gran incapacidad, tanto por el grado de dependencia de los  
supervivientes como por afectar a muchas personas en edad laboral. Menos de la mitad  
de los pacientes que sufren infarto cerebral son capaces de retomar una vida normal (la  
prevalencia de recuperación incompleta es de 460/1000 supervivientes). Estos  
enfermos demandan cuidados que han de ser suplidos por su familia, lo que repercute  
15 en la calidad de vida del paciente y sus cuidadores, o por instituciones públicas y  
privadas, lo que conlleva una importante inversión económica.

El ictus tiene dos causas principales: la obstrucción trombótica de un vaso sanguíneo  
(ictus isquémico que da cuenta del 80% de los casos) y la hemorragia (ictus  
hemorrágico, por rotura de vasos, que da cuenta del 20% restante). Los síntomas del  
20 ictus (pérdida de fuerza en la mitad del cuerpo, dificultad para hablar o entender,  
pérdida parcial de la visión y vértigo, entre otros) aparecen de forma brusca. Sin  
embargo, ha de transcurrir un tiempo hasta que se produce la lesión cerebral por  
muerte neuronal. Este tiempo es la "ventana terapéutica", en la que los neurólogos  
deben evitar la muerte neuronal en la parte del cerebro donde se produjo el infarto o la  
25 hemorragia.

A pesar de la alta incidencia del ictus, su tratamiento, está reducido a la recanalización  
de los vasos obstruidos con fibrinolíticos como el t-PA (activador del plasminógeno  
tisular), siendo éste el único tratamiento efectivo probado hasta el momento. Sin  
embargo, está asociado a efectos secundarios severos y a una aplicación muy  
30 restringida, sólo es aplicable entorno a un 1% de los pacientes. Como resultado, sólo

un pequeño porcentaje de pacientes pueden beneficiarse de esta terapia (Adams, H.P., Jr., et al., Classification of subtype of acute ischemic stroke. Definitions for use in a multicenter clinical trial. TOAST. Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment. Stroke, 1993. **24**(1): p. 35-41).

- 5 La escasa terapia existente para el tratamiento de esta enfermedad hace necesario desarrollar nuevas terapias que puedan ser aplicables al mayor número posible de pacientes.

Por otro lado, un alto número de agentes neuroprotectores encontrados en investigación experimental fallaron en los ensayos clínicos debido en muchos casos a la estrecha ventana terapéutica (Castellanos, M., T. Sobrino, y J. Castillo, Evolving paradigms for neuroprotection: molecular identification of ischemic penumbra. Cerebrovasc Dis, 2006. **21 Suppl 2**: p. 71-9). Otra razón importante es la baja calidad e idoneidad de los ensayos de agentes neuroprotectores de ictus en animales (Philip, M., et al., Methodological quality of animal studies of neuroprotective agents currently in phase II/III acute ischemic stroke trials. Stroke, 2009. **40**(2): p. 577-81).

Es conocido que el glutamato es el efector inicial de la muerte neuronal y del daño en la fase aguda inicial del ictus (Lipton, P., Ischemic cell death in brain neurons. Physiol Rev, 1999. **79**(4): p. 1431-568). En los pacientes con ictus hay un aumento de los niveles de glutamato en sangre, y se ha relacionado con niveles altos y prolongados de glutamato, tanto en sangre como en el líquido cefalorraquídeo (LCR), con un incremento en el déficit neurológico en pacientes con ictus (Castillo, J., et al., Neuroexcitatory amino acids and their relation to infarct size and neurological deficit in ischemic stroke. Stroke, 1996. **27**(6): p. 1060-5.) que podría ser el resultado de un aumento de la muerte celular por la acción excitotóxica del glutamato. En este sentido, concentraciones por encima de 200 micromolar en sangre actúan como un importante predictor de la progresión del daño neuronal (Castillo, J., A. Davalos, y M. Noya, Progression of ischaemic stroke and excitotoxic aminoacids. Lancet, 1997. **349**(9045): p. 79-83).

El hecho de que el glutamato juegue un papel fundamental en la cascada de eventos moleculares que ocurren después del proceso isquémico, y que se encuentre estrechamente asociado al deterioro neurológico, lo convierte en una buena diana para la búsqueda de nuevos agentes neuroprotectores en el ictus isquémico.

En este sentido, se recogen en el estado de la técnica estudios sobre la actividad neuroprotectora del oxalacetato (Nagy, D., et al., Oxaloacetate decreases the infarct size and attenuates the reduction in evoked responses after photothrombotic focal ischemia in the rat cortex. *Cell Mol Neurobiol*, 2009. **29**(6-7): p. 827-35). En estos  
5 ejemplos el oxalacetato se administra mediante infusión continua por vía intravenosa a lo largo de un periodo determinado de tiempo.

Pero es imprescindible tener en cuenta que el daño por glutamato se produce en las primeras horas post-ictus, por lo tanto cualquier intervención sobre los niveles de glutamato debería iniciarse tan pronto fuera posible para prevenir su efecto, y de forma  
10 rápida y eficaz. De ahí la importancia de poder disponer de estrategias sencillas, que puedan ser realizadas por personal técnico especializado durante el transporte en ambulancia hacia el hospital.

## 15 **Descripción de la invención**

La presente invención proporciona un método sencillo para el tratamiento o prevención de trastornos asociados a elevadas concentraciones de glutamato en el tejido cerebral, en las primeras horas en las que se produce.

Este método se basa en el uso de una cantidad terapéuticamente efectiva de oxalacetato  
20 como activador de la enzima glutamato oxalacetato transaminasa (GOT). Esta activación conduce a la reducción de los niveles de glutamato en sangre, a la disminución de los niveles de glutamato en el tejido cerebral e induce un efecto neuroprotector.

Aunque en el estado de la técnica se describe la actividad de oxalacetato como  
25 neuroprotector, las cantidades que se emplean del mismo no resultan efectivas en una administración de tipo bolus en modelos de animales siguiendo las guías STAIR para la evaluación preclínica de terapia de ictus (Philip, M., et al., Methodological quality of animal studies of neuroprotective agents currently in phase II/III acute ischemic stroke trials. *Stroke*, 2009. **40**(2): p. 577-81). Así, sorprendentemente y en  
30 contraposición a lo que se describe en el estado de la técnica (Nagy, D., et al., Oxaloacetate decreases the infarct size and attenuates the reduction in evoked

responses after photothrombotic focal ischemia in the rat cortex. *Cell Mol Neurobiol*, 2009. **29**(6-7): p. 827-35), la presente invención demuestra que 1.2 mg/100 g no es una cantidad terapéuticamente efectiva como se estableció con anterioridad, para producir ningún efecto beneficioso, ni para inducir un efecto neuroprotector tras un proceso de  
5 isquemia cerebral, ni para reducir los niveles de glutamato en la sangre, ni en el tejido cerebral.

Una ventaja de la invención es que proporciona cantidades terapéuticamente efectivas de oxalacetato para el tratamiento de trastornos asociados a elevadas concentraciones de glutamato en el tejido cerebral. Una ventaja adicional es el uso de esas cantidades  
10 terapéuticamente efectivas de oxalacetato para preparar un medicamento para administración de tipo bolus.

La administración de tipo bolus de un medicamento para el tratamiento de trastornos asociados a elevadas concentraciones de glutamato en el tejido cerebral, implica mayor probabilidad de éxito que en el caso de administración mediante infusión continuada  
15 por vía intravenosa a lo largo del tiempo, ya que se debe de tener en cuenta que sólo producirá efectos beneficiosos si se administra dentro de la “ventana terapéutica”. De este modo se solucionan los problemas del estado de la técnica.

Así, la invención se dirige al uso de oxalacetato o sus derivados para la preparación de un medicamento para administración de tipo bolus en una cantidad terapéuticamente  
20 efectiva para el tratamiento o prevención de un trastorno asociado a elevadas concentraciones de glutamato en el tejido cerebral.

La presente invención proporciona rangos de una cantidad terapéuticamente efectiva de oxalacetato o sus derivados basados en la extrapolación de los datos obtenidos en modelos animales, siguiendo las guías STAIR para la evaluación preclínica de terapia  
25 de ictus, según se describe en “Dose translation from animal to human studies revisited”, *The FASEB Journal*, 2007, 22, 659-661. Hay que destacar que la presente invención describe por primera vez resultados del estudio de la actividad del oxalacetato con estos modelos isquémicos, que reflejan con mayor proximidad la patología del ictus isquémico en humanos (Carmichael, S.T., *Rodent models of focal stroke: size, mechanism, and purpose*. *NeuroRx*, 2005. 2(3): p. 396-409).  
30

La invención también se dirige a una composición farmacéutica, a un kit y a un método de tratamiento o prevención.

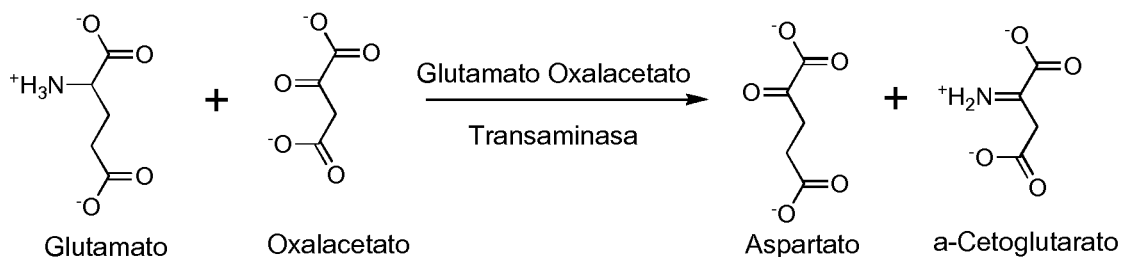
### Descripción detallada de la invención

- 5 Para la presente invención se entiende por “administración de tipo bolus o bolo” la administración intravenosa (i.v.) de un medicamento a una velocidad rápida de forma controlada, por ejemplo entre 1 y 10 segundos, preferiblemente entre 1 y 5 segundos, más preferiblemente entre 2 y 3 segundos. Se opone a la administración por infusión que tiene lugar durante un plazo de tiempo superior, por ejemplo entre 30 minutos y 8  
10 horas, o a la administración por goteo.

- En la presente invención se determinan las “elevadas concentraciones de glutamato en el tejido cerebral” mediante el análisis in vitro de la concentración de glutamato en sangre, y se concluye que la concentración de glutamato en el tejido cerebral es elevada cuando la concentración de glutamato en sangre es superior a 200 micromolar  
15 (Castillo, J., A. Davalos, y M. Noya, Progression of ischaemic stroke and excitotoxic aminoacids. Lancet, 1997. **349**(9045): p. 79-83).

- Para la presente invención se entiende por “oxalacetato” el derivado desprotonado del ácido oxalacético, que responde a la siguiente fórmula  $[C_4H_2O_5]^{-2}$ . Se entiende por “sus derivados” la forma protonada parcial (base conjugada) o totalmente (ácido  
20 oxalacético), sus sales farmacéuticamente aceptables, y sus ésteres como por ejemplo el dietil oxalacético, y sus sales como por ejemplo la sal sódica del dietil oxalacetato. Comercialmente está disponible en forma de sal, como por ejemplo la sal sódica. Como metabolito está implicado en varias rutas metabólicas como el ciclo de Krebs o la fotosíntesis C-4.

- 25 La enzima glutamato oxalacetato transaminasa (GOT) es una enzima hepática, que tiene la capacidad de metabolizar el glutamato en presencia de oxalacetato formando como producto de degradación el aspartato y el  $\alpha$ -cetoglutarato, según el siguiente esquema:



El uso de una cantidad terapéuticamente efectiva de oxalacetato o sus derivados, según la invención, como activador de la enzima GOT, promueve que la reacción se acelere y conduce a una disminución de la concentración de glutamato en sangre lo que implica

5 un incremento del gradiente de concentración de glutamato existente entre el cerebro y la sangre favoreciendo la salida del glutamato extracelular del parénquima cerebral.

La rápida salida del exceso de glutamato del parénquima cerebral proveniente de células que han perdido su competencia energética o de células muertas, redundará en un menor daño sobre el tejido sano, y por tanto, en una atenuación del déficit neurológico de los pacientes con trastornos asociados a elevadas concentraciones de glutamato en el tejido cerebral.

10

En un aspecto particular, un trastorno asociado a elevadas concentraciones de glutamato es preferiblemente un trastorno seleccionado entre el grupo formado por isquemia cerebral, traumatismo cerebral, glaucoma y esclerosis lateral amiotrófica. Más preferiblemente, isquemia cerebral.

15

De este modo, en un aspecto particular, la invención se dirige al uso de oxalacetato o sus derivados para la preparación de un medicamento para administración de tipo bolus en una cantidad terapéuticamente efectiva para el tratamiento o prevención de un trastorno asociado a elevadas concentraciones de glutamato en el tejido cerebral que se selecciona de entre el grupo formado por isquemia cerebral, traumatismo cerebral, glaucoma y esclerosis lateral amiotrófica.

20

En un aspecto más particular, la invención se dirige al uso de oxalacetato o sus derivados para la preparación de un medicamento para administración de tipo bolus en una cantidad terapéuticamente efectiva para el tratamiento o prevención de isquemia cerebral.

25

En otro aspecto la presente invención se dirige al uso de oxalacetato o sus derivados para la preparación de un medicamento para administración de tipo bolus en una cantidad terapéuticamente efectiva para disminuir los niveles de glutamato en sangre.

En otro aspecto, la invención se dirige al uso de oxalacetato o sus derivados para la  
5 preparación de un medicamento para administración de tipo bolus en una cantidad terapéuticamente efectiva para disminuir los niveles de glutamato en el tejido cerebral. En otro aspecto, la invención se dirige al uso de oxalacetato o sus derivados para la preparación de un medicamento para administración de tipo bolus en una cantidad terapéuticamente efectiva para inducir un efecto neuroprotector.

10 Para la presente invención se entiende por “cantidad terapéuticamente efectiva”, la dosificación concreta de oxalacetato o sus derivados para producir un efecto beneficioso en el cuerpo humano o animal, esto es, tratando o previniendo trastornos en el tejido cerebral asociados a elevados niveles de glutamato, preferiblemente un trastorno seleccionado entre el grupo formado por isquemia cerebral, traumatismo  
15 cerebral, glaucoma y esclerosis lateral amiotrófica, más preferiblemente la isquemia cerebral, y minimizando efectos secundarios. Preferiblemente la cantidad terapéuticamente efectiva se administra en un plazo de tiempo desde que se produce el trastorno en el tejido cerebral asociado a elevadas concentraciones de glutamato para el tratamiento o prevención del trastorno en el tejido cerebral, “ventana terapéutica”. Un  
20 plazo de tiempo preferido es inferior a 3 horas desde que se produce el aumento de los niveles de glutamato en el tejido cerebral. Un plazo de tiempo más preferido es inferior a 2 horas, y aún más preferido es igual o inferior a 90 minutos.

La cantidad terapéuticamente efectiva de oxalacetato o sus derivados preferida para la invención es superior a 2.4 mg/Kg de peso de paciente; preferiblemente está  
25 comprendida entre 4 mg/Kg y 8 mg/Kg; más preferiblemente entre 5 mg/Kg y 6 mg/Kg.

En otro aspecto la invención se dirige a una composición farmacéutica que comprende oxalacetato o sus derivados en una cantidad terapéuticamente efectiva para administración de tipo bolus. Dicha composición es útil en el tratamiento o prevención  
30 de un trastorno asociado a elevadas concentraciones de glutamato en el tejido cerebral. Preferiblemente de un trastorno asociado a elevadas concentraciones de glutamato en el tejido cerebral que se selecciona de entre el grupo formado por isquemia cerebral,



traumatismo cerebral, glaucoma y esclerosis lateral amiotrófica. Más preferiblemente, en el tratamiento o prevención de isquemia cerebral.

Se pueden preparar las composiciones farmacéuticas de interés para la invención, mediante procedimientos conocidos en la técnica. Por ejemplo, los compuestos se  
5 pueden formular con excipientes, diluyentes y vehículos habituales, y conformarse en soluciones o suspensiones para la administración vía intravenosa. Preferentemente, la composición farmacéutica tiene un pH de entre 7.2 y 7.4.

En un aspecto particular de la invención, la composición farmacéutica definida anteriormente comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de oxalacetato o sus  
10 derivados superior a 2.4 mg/Kg de peso de paciente; preferiblemente está comprendida entre 4 mg/Kg y 8 mg/Kg; más preferiblemente entre 5 mg/Kg y 6 mg/Kg.

En otro aspecto particular de la invención, la composición farmacéutica definida anteriormente comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de oxalacetato o sus derivados que está en disolución en un volumen total de entre 1 mL y 5 mL.  
15 Preferentemente un volumen total de entre 2 y 4 mL; más preferiblemente 2.5 mL. Los volúmenes de la composición farmacéutica la hacen adecuada para su administración de tipo bolus.

De este modo, en un aspecto particular, la composición farmacéutica de la invención es una disolución que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de  
20 oxalacetato o sus derivados en una concentración superior a 35 mg/mL; preferiblemente entre 500 y 50 mg/mL; más preferiblemente entre 225 y 110 mg/mL; más preferiblemente entre 140 y 180 mg/mL; aún más preferiblemente entre 160 y 170 mg/mL. Por ejemplo, para una cantidad de oxalacetato o sus derivados de aproximadamente 6 mg/Kg, es adecuada una composición farmacéutica con un  
25 volumen total de 2.5 mL, en este caso y suponiendo un peso medio de paciente de 70 Kg, la concentración de la composición es de entre 160 y 170 mg/Kg (aproximadamente 168 mg/Kg).

La presente invención proporciona datos que demuestran que la administración de tipo bolus de oxalacetato o sus derivados en una cantidad terapéuticamente efectiva,  
30 conduce a la disminución de los niveles de glutamato en sangre. Como consecuencia, disminuye también el nivel del glutamato en el parénquima cerebral. La presencia de

niveles de glutamato elevados en la sangre disminuye el gradiente cerebro-sangre para el glutamato y reduce, por tanto, la facilidad de lavado del exceso de glutamato cerebral; por otro lado los niveles bajos de glutamato en sangre promueven el drenaje del glutamato cerebral hacia el torrente sanguíneo. Este mecanismo de acción permite  
5 reducir la excitotoxicidad producida por el glutamato a elevada concentración y así reducir los daños causados por los elevados niveles de glutamato en el tejido cerebral. En particular, la isquemia cerebral. De este modo, el tratamiento con oxalacetato basado en la actividad de la enzima hepática (GOT) se demuestra como tratamiento eficaz para reducir los niveles de glutamato plasmático, reducir los niveles de  
10 glutamato en el tejido cerebral y reducir el daño cerebral isquémico, induciendo un efecto neuroprotector.

En otro aspecto la invención también se dirige a un kit que comprende una composición farmacéutica como se definió anteriormente, para el tratamiento o prevención de un trastorno asociado a elevadas concentraciones de glutamato en el  
15 tejido cerebral.

La invención se dirige también a un método de prevención o tratamiento de un trastorno asociado a elevadas concentraciones de glutamato en el tejido cerebral que comprende la administración de tipo bolus de una cantidad terapéuticamente efectiva de oxalacetato o sus derivados. Preferiblemente de un trastorno asociado a elevadas  
20 concentraciones de glutamato en el tejido cerebral que se selecciona de entre el grupo formado por isquemia cerebral, traumatismo cerebral, glaucoma y esclerosis lateral amiotrófica. Más preferiblemente, de prevención o tratamiento de isquemia cerebral.

En un aspecto particular, la cantidad terapéuticamente efectiva de oxalacetato o sus derivados son preferiblemente las de interés para la invención como se describieron  
25 con anterioridad.

En otro aspecto particular, esta cantidad terapéuticamente efectiva de oxalacetato o sus derivados se encuentra en una disolución en una concentración superior a 35 mg/mL; preferiblemente entre 500 y 50 mg/mL; más preferiblemente entre 225 y 110 mg/mL; más preferiblemente entre 140 y 180 mg/mL; aún más preferiblemente entre 160 y 170  
30 mg/mL.

En otro aspecto particular, la disolución tiene un volumen total de entre 1 mL y 5 mL. Preferentemente un volumen total de entre 2 y 4 mL; más preferiblemente 2.5 mL.

En otro aspecto particular, el método de prevención o tratamiento descrito con anterioridad se aplica desde que se produce el aumento de los niveles de glutamato en el tejido cerebral en un plazo de tiempo inferior a 3 horas. Un plazo de tiempo más preferido es inferior a 2 horas, y aún más preferido es igual o inferior a 90 minutos.

En otro aspecto, la invención se dirige a un método de prevención o tratamiento de un trastorno asociado a elevadas concentraciones de glutamato en el tejido cerebral que comprende la administración de tipo bolus de una composición farmacéutica como se definió anteriormente.

### Descripción de las figuras

Figura 1. Efecto de respuesta a diferentes dosis de oxalacetato sobre los niveles de glutamato en sangre (figura 1a) y de aspartato (figura 1b): dosis de oxalacetato 1.5 mg/100 g (i.v.) (n=3) ■; dosis de oxalacetato 3.5 mg/100 g (i.v.) (n=4) ●. Los resultados de glutamato y aspartato se muestran como  $\pm$ S.E.M, expresados como un porcentaje de niveles basales. La evaluación estadística de los resultados se llevó a cabo aplicando el análisis t-Student.

Figura 2. Evolución de los niveles de glutamato en sangre expresados en concentración (micromolar) en función del tiempo, en animales control ◆ y en animales como modelo de isquemia tratados MCAO ◆. Los niveles de glutamato se muestran como  $\pm$ S.E.M. La evaluación estadística de los resultados se llevó a cabo aplicando el análisis t-Student.

Figura 3. Evolución de volumen de infarto (figura 3a) y edema (figura 3b) en función del tiempo, en los grupos control ◆ y tratados ◆ (tratados 90 min después de la oclusión transitoria de la arteria crebral media) (MCAO). Los niveles de volumen de infarto y edema se muestran como  $\pm$ S.E.M. La evaluación estadística de los resultados se llevó a cabo aplicando el análisis t-Student.

Figura 4. Representa el resultado del test somatosensorial para un grupo control y un grupo tratado.

Los siguientes ejemplos son útiles para ilustrar la invención y no deben de interpretarse como una limitación de la misma.

## 5 Ejemplos

El oxalacetato utilizado (Sigma-Aldrich, Ref, 171263, 95%) se disolvió en suero fisiológico hasta alcanzar una concentración de 10 mg/mL y se ajustó el pH a 7.4. Puesto que el peso medio de los animales de experimentación era de 325g, y la dosis administrada de 3.5mg/100 g peso animal, se administró a cada animal un volumen  
10 medio de 1.2 mL de oxalacetato 10 mg/mL.

Los protocolos de estudio de ratas macho Sprague-Dawley (SD) (Charles River Laboratories; France), de peso entre 300 a 350 g, fueron aprobados por el Comité del Hospital de Santiago de Compostela sobre el Uso y Cuidado de Animales.

La anestesia se indujo mediante inhalación de 5% de sevoflurano en una mezcla de  
15 óxido nitroso/ oxígeno (70/30). La temperatura rectal se mantuvo a 37.5°C. Los niveles de glucosa (180-220 mg/dl) se analizaron antes de la intervención.

Las cantidades de oxalacetato administradas a ratas se extrapolaron a dosis en humanos según se describe en “Dose translation from animal to human studies revisited”, The FASEB Journal, 2007, 22, 659-661, aplicando la fórmula:

20 
$$\text{Dosis en humanos (mg/kg)} = \text{Dosis en animal (mg/kg)} * (\text{km animal} / \text{km humano})$$

y aplicando el valor de 6 para la de km de animal y el valor de 37 para la km de humano.

Los ejemplos se diseñaron de manera que el oxalacetato se administró dentro de una ventana terapéutica ancha y siguiendo las guías STAIR para la evaluación preclínica  
25 de terapia de ictus (Philip, M., et al., Methodological quality of animal studies of neuroprotective agents currently in phase II/III acute ischemic stroke trials. Stroke, 2009. 40(2): p. 577-81).

La oclusión de la arteria cerebral media (MCAO) se utilizó como modelo de isquemia cerebral, como se describe en bibliografía (Longa, E.Z., et al., Reversible middle  
30 cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. Stroke, 1989. 20(1): p. 84-91).

Este modelo se considera como el que mejor mimetiza la isquemia cerebral en humanos y ha sido empleado en numerosos estudios en ratas (Carmichael, S.T., Rodent models of focal stroke: size, mechanism, and purpose. *NeuroRx*, 2005. 2(3): p. 396-409).

- 5 Los análisis de glutamato y aspartato en sangre se realizaron según el método descrito en la siguiente referencia (White, J.A., R.J. Hart, and J.C. Fry, An evaluation of the Waters Pico-Tag system for the amino-acid analysis of food materials. *J Automat Chem*, 1986. 8(4): p. 170-7).

- 10 Los volúmenes de infarto y edema se estudiaron mediante resonancia magnética de imagen. Estos experimentos se llevaron a cabo en un equipo de 9.4 T (Bruker BioSpin, Alemania) de agujero horizontal de 20cm de diámetro y de gradientes de 440mT y 250ms. Todas las imágenes se procesaron empleando ImageJ (Rasband, W.S., ImageJ, NIH, <http://rsb.info.nih.gov/ij>).

- 15 Los estudios somatosensoriales se realizaron según lo descrito en (Reglodi, D., A. Tamas, and I. Lengvari, Examination of sensorimotor performance following middle cerebral artery occlusion in rats. *Brain Res Bull*, 2003. 59(6): p. 459-66).

**Ejemplo 1.** Efecto de la administración de oxalacetato sobre los niveles de glutamato en suero.

- 20 Se administró una dosis de oxalacetato de 1.5 mg/100 g (i.v.) a animales sanos y no se observaron cambios en los niveles de glutamato en sangre después de 3 horas (figura 1a). Tampoco se observaron cambios en los niveles de aspartato (figura 1b).

- 25 La administración de una mayor dosis de oxalacetato, 3.5 mg/100 g (i.v.) a animales sanos produjo una disminución de los niveles de glutamato en suero de un 60 % respecto los niveles basales, 2 horas después de la administración. Dicho efecto se mantuvo incluso a hasta las 3 horas después de la administración (figura 1a). Coincidiendo con el descenso en los niveles de glutamato, se observó un aumento en los niveles de aspartato a las 2 y 3 horas después del tratamiento con el oxalacetato (figura 1b). El incremento en los niveles del aspartato confirma que el glutamato está  
30 siendo metabolizado por la enzima GOT como consecuencia del tratamiento con oxalacetato.

Los niveles en sangre de oxalacetato y aspartato fueron establecidos en un grupo control tratado con salino.

Estos resultados demuestran que la administración de tipo bolus de oxalacetato de 1.2 mg/100 g (i.v.) (Nagy, D., et al., Oxaloacetate decreases the infarct size and attenuates the reduction in evoked responses after photothrombotic focal ischemia in the rat cortex. Cell Mol Neurobiol, 2009. **29**(6-7): p. 827-35) no producen ningún efecto sobre los niveles de glutamato y por lo tanto no es una dosis efectiva según la invención.

**Ejemplo 2.** Efecto de la administración de oxalacetato sobre los niveles de glutamato en sangre en modelos animales con isquemia focal.

Se diseñaron dos grupos, un grupo MCAO tratado con salino y otro MCAO tratado con oxalacetato 3.5 mg/100 g (i.v.) 90 minutos después de la oclusión. En ambos grupos se determinaron los niveles de glutamato en sangre, volumen de infarto y volumen de edema. Se realizó un test somatosensorial en el día 7.

En el grupo control se observó un incremento de los niveles de glutamato en sangre de un 40% 4 horas después de la oclusión. Después de 24 horas desde la oclusión, el glutamato volvió a los niveles normales (figura 2).

En el grupo tratado, los niveles de glutamato se redujeron un 50% por debajo de los basales después de 4 horas de producida la oclusión. Los niveles de glutamato volvieron a los valores basales pasadas 24 horas desde la oclusión (figura 2).

El volumen de infarto se redujo aproximadamente un 40% en el grupo tratado respecto a los animales controles a las 24 horas después de la isquemia. Tras 7 días se redujo un 80% en el grupo tratado y un 20% en el grupo control (figura 3a).

El grupo tratado no mostró incremento en el volumen de edema, sin embargo, en el día 3 en el grupo control se produjo un fuerte incremento en comparación con el grupo tratado (figura 3b).

Según los datos aquí obtenidos, y realizando la extrapolación a dosis en humanos empleando la fórmula que se citó anteriormente, la dosis de administración de oxalacetato a un paciente es de aproximadamente 6 mg/kg. Suponiendo un peso medio del paciente de 70 Kg, una cantidad de oxalacetato adecuada para administrar a un

paciente es de aproximadamente 420mg. Un volumen (bolo) de 2.5 mL es adecuado para administrar a un paciente. De este modo una composición farmacéutica puede prepararse en una concentración de 420mg de oxalacetato / 2.5 mL, es decir, de 168 mg /mL, realizándose la dilución en suero fisiológico con un pH de 7.4 y 0.9% de NaCl.

**Ejemplo 3.** Test somatosensorial.

El test somatosensorial se realizó sobre una escala de 0-4, de forma que los animales que presentaban mayores alteraciones somatosensoriales alcanzaron puntuaciones de 4. El test realizado demostró que el grupo tratado tiene una mejor puntuación que el grupo control (figura 4).

## REIVINDICACIONES

1. Uso de oxalacetato o sus derivados para la preparación de un medicamento para administración de tipo bolus en una cantidad terapéuticamente efectiva para el tratamiento o prevención de un trastorno asociado a elevadas concentraciones de glutamato en el tejido cerebral, donde la cantidad terapéuticamente efectiva de oxalacetato o sus derivados es superior a 2.4 mg/Kg de peso de paciente.  
5
2. Uso según la reivindicación 1, donde el trastorno asociado a elevadas concentraciones de glutamato en el tejido cerebral se selecciona de entre el grupo formado por isquemia cerebral, traumatismo cerebral, glaucoma y esclerosis lateral  
10 amiotrófica.
3. Uso según la reivindicación 1 y 2, donde el trastorno es la isquemia cerebral.
4. Uso de oxalacetato o sus derivados para la preparación de un medicamento para administración de tipo bolus en una cantidad terapéuticamente efectiva para disminuir los niveles de glutamato en sangre.
- 15 5. Uso de oxalacetato o sus derivados para la preparación de un medicamento para administración de tipo bolus en una cantidad terapéuticamente efectiva para disminuir los niveles de glutamato en el tejido cerebral.
6. Uso de oxalacetato o sus derivados para la preparación de un medicamento para administración de tipo bolus en una cantidad terapéuticamente efectiva para inducir  
20 un efecto neuroprotector.
7. Uso, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la cantidad terapéuticamente efectiva de oxalacetato o sus derivados está comprendida entre 4 mg/Kg y 8 mg/Kg.
8. Uso, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la cantidad  
25 terapéuticamente efectiva de oxalacetato o sus derivados está comprendida entre 5 mg/Kg y 6 mg/Kg.
9. Composición farmacéutica que comprende oxalacetato o sus derivados en una cantidad terapéuticamente efectiva para administración de tipo bolus para el tratamiento o prevención de un trastorno asociado a elevadas concentraciones de



glutamato en el tejido cerebral, donde la cantidad terapéuticamente efectiva de oxalacetato o sus derivados es superior a 2.4 mg/Kg de peso de paciente.

10. Composición según la reivindicación 9, donde el trastorno asociado a elevadas concentraciones de glutamato en el tejido cerebral se selecciona de entre el grupo  
5 formado por isquemia cerebral, traumatismo cerebral, glaucoma y esclerosis lateral amiotrófica.

11. Composición según la reivindicación 9 y 10, donde el trastorno es la isquemia cerebral.

12. Composición según las reivindicaciones de 9 a 11, donde la cantidad  
10 terapéuticamente efectiva de oxalacetato o sus derivados está comprendida entre 4 mg/Kg y 8 mg/Kg.

13. Composición según las reivindicaciones de 9 a 12, donde la cantidad terapéuticamente efectiva de oxalacetato o sus derivados está comprendida entre 5 mg/Kg y 6 mg/Kg.

15 14. Composición según las reivindicaciones de 9 a 13, donde la cantidad terapéuticamente efectiva de oxalacetato o sus derivados está en disolución en un volumen total de entre 1 mL y 5 mL.

15. Composición según las reivindicaciones de 9 a 13, donde la cantidad terapéuticamente efectiva de oxalacetato o sus derivados está en disolución en un  
20 volumen total de entre 2 mL y 4 mL.

16. Composición según las reivindicaciones de 9 a 13, donde la cantidad terapéuticamente efectiva de oxalacetato o sus derivados está en disolución en un volumen total de 2.5 mL.

17. Kit que comprende una composición farmacéutica definida en cualquiera de las  
25 reivindicaciones de 9 a 16 para el tratamiento o prevención de un trastorno asociado a elevadas concentraciones de glutamato en el tejido cerebral.

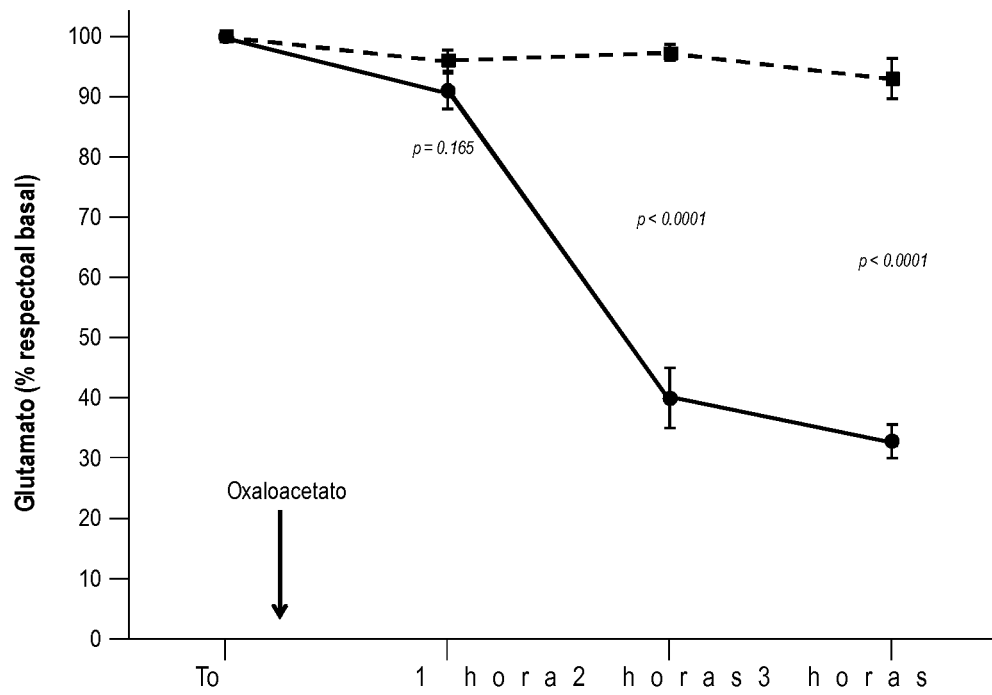


Figura 1a

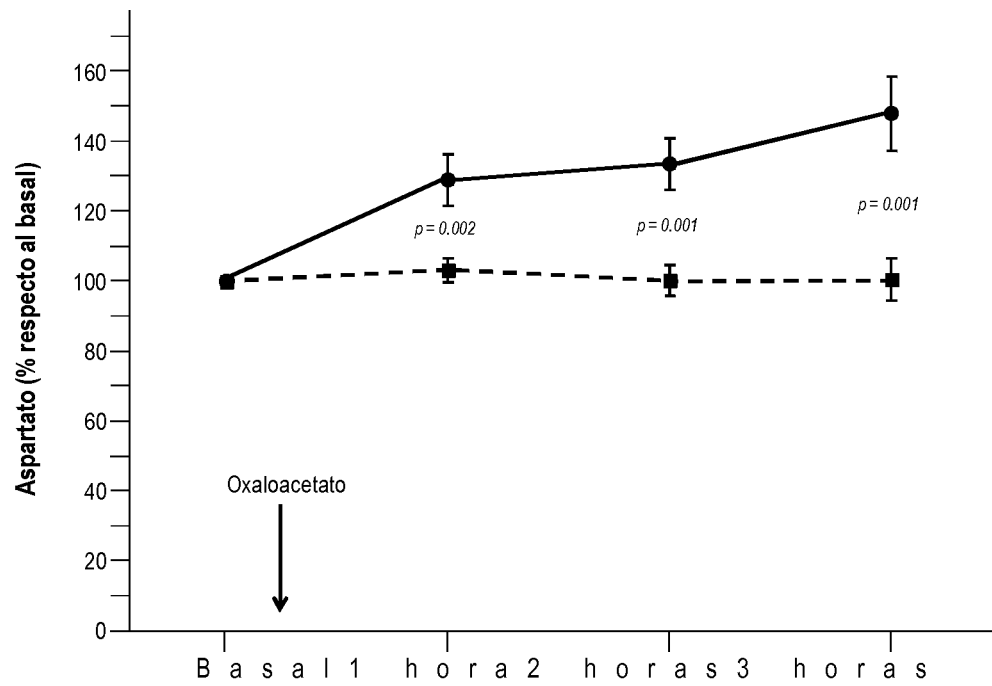
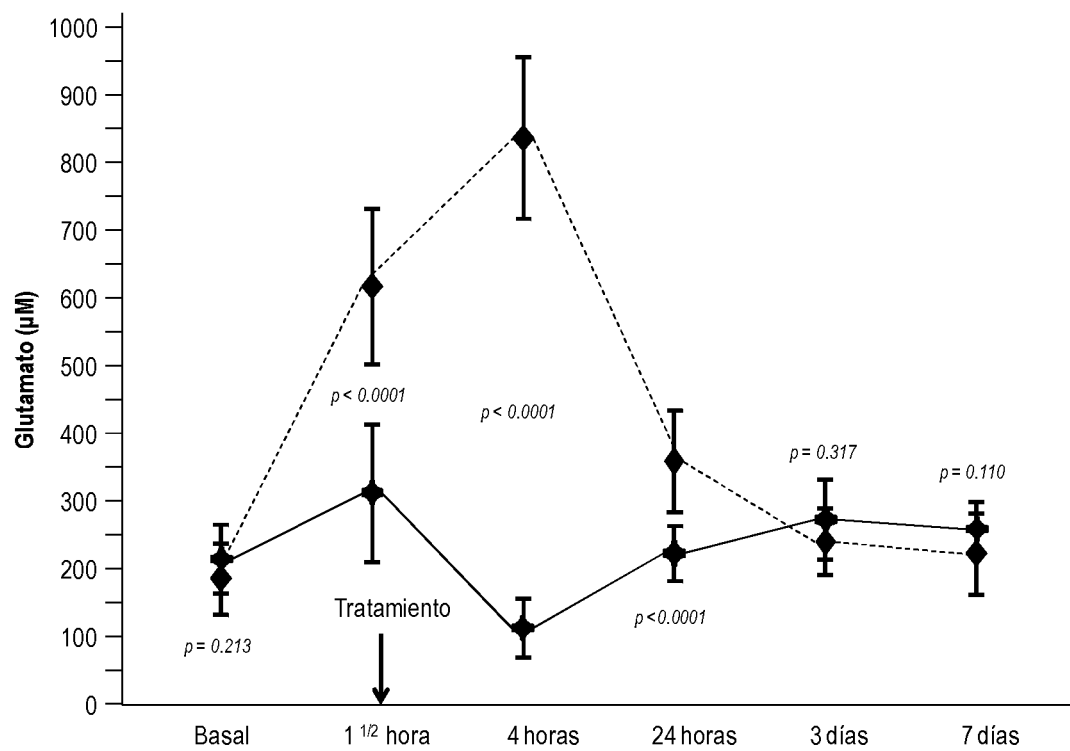


Figura 1b



**Figura 2**

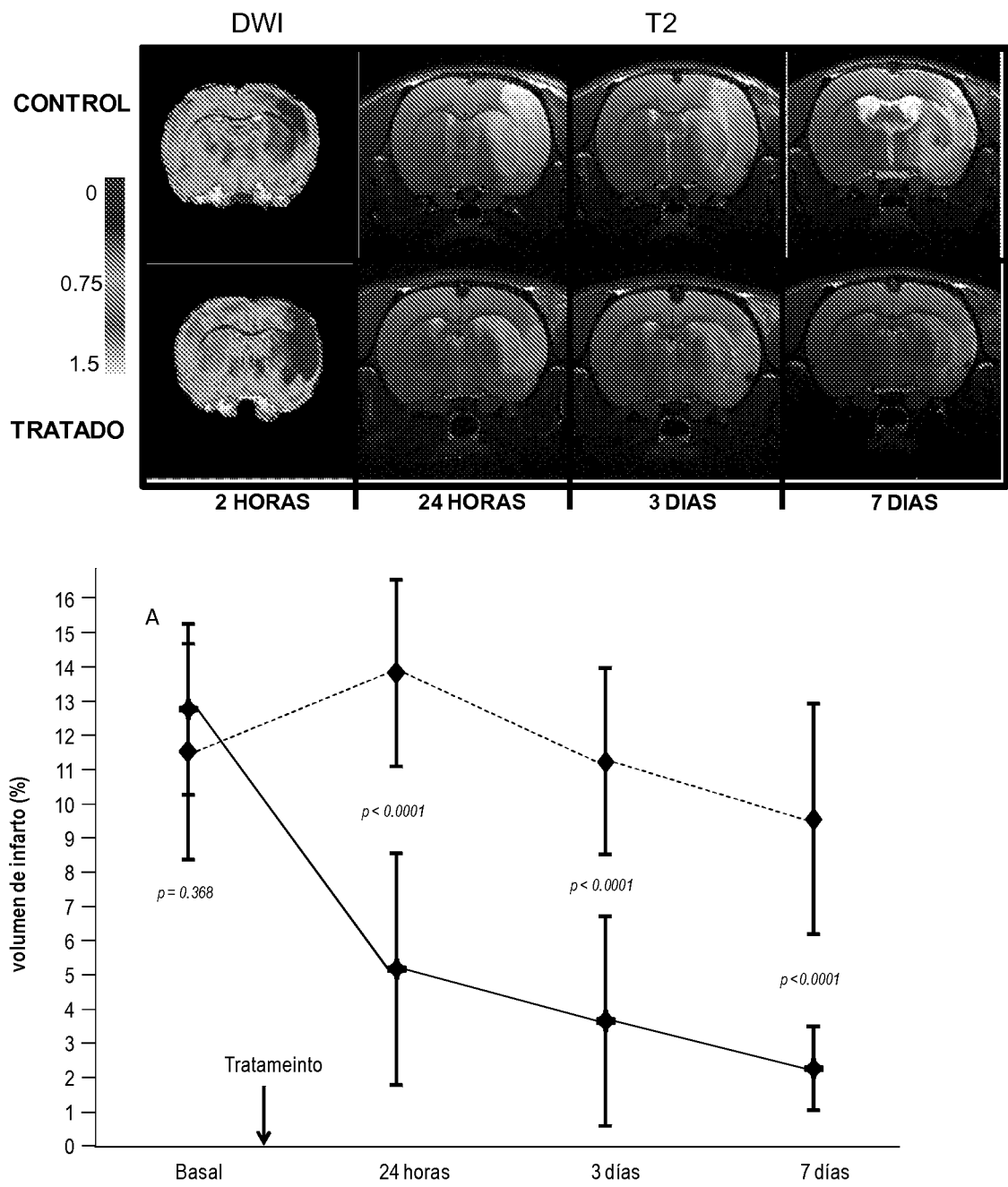


Figura 3a

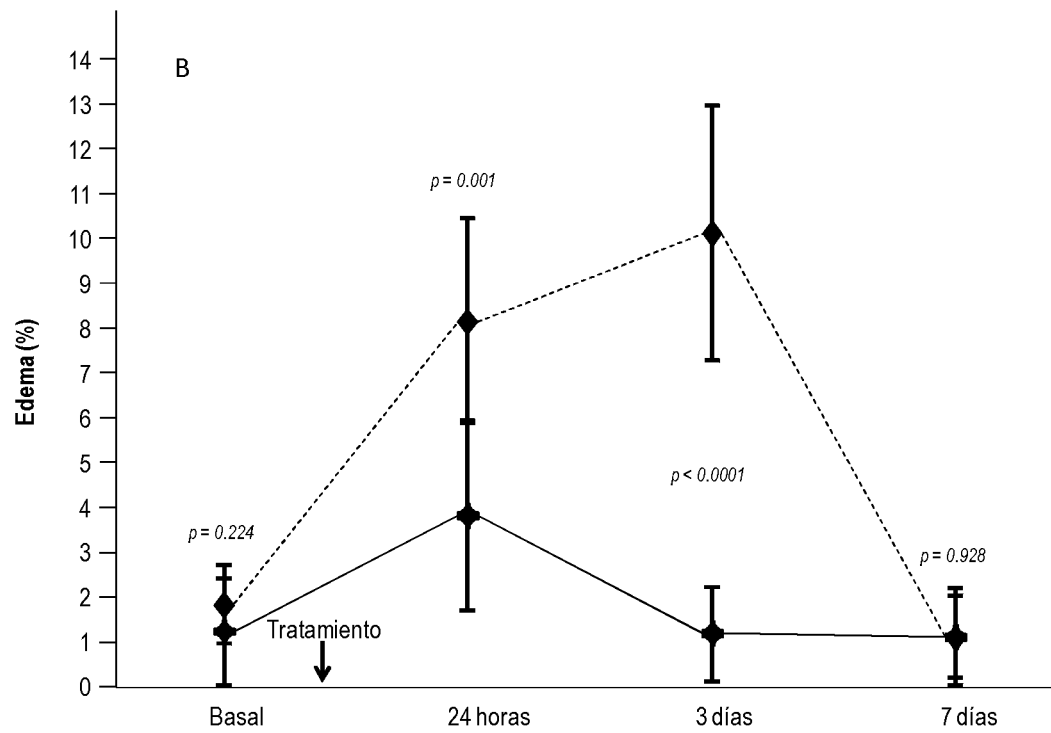
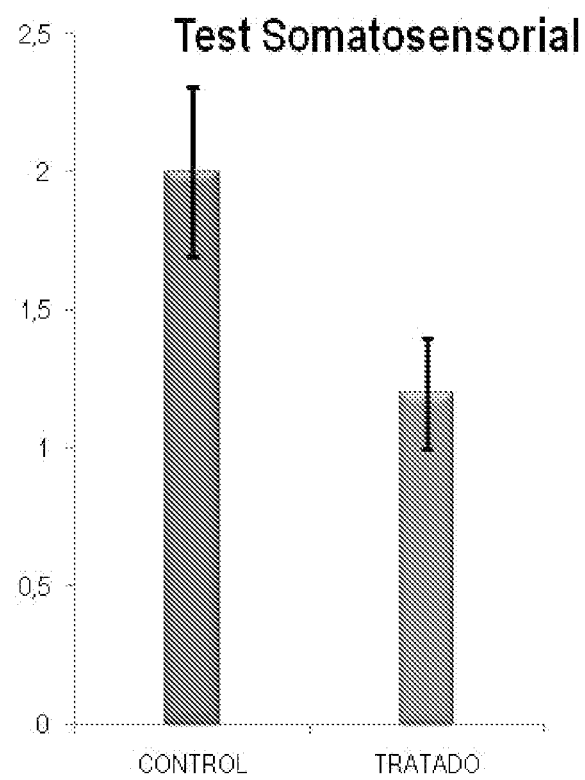


Figura 3b



**Figura 4**



OFICINA ESPAÑOLA  
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 201030786

②② Fecha de presentación de la solicitud: 25.05.2010

③② Fecha de prioridad:

## INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

### DOCUMENTOS RELEVANTES

| Categoría | Documentos citados                                                                                                                                                                                                                                                       | Reivindicaciones afectadas |
|-----------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------|
| X         | US 7404951 B2 (TEICHBERG) 29.07.2008, columna 1, líneas 17-20; columna 3, línea 49 – columna 4, línea 34; columna 5, líneas 17-23; columna 14, líneas 22-30; columna 15, líneas 43-37; columna 17, líneas 58-65; columna 18, línea 62 – columna 19, línea 21; ejemplo 2. | 1-6,10-12,19               |
| X         | US 2009304661 A1 (TEICHBERG et al.) 10.12.2009, párrafos [0001],[0020]-[0023],[0042],[0043],[0074],[0093],[0107],[0180],[0121],[0136],[0152],[0153].                                                                                                                     | 1-6,10-12,19               |

#### Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

#### El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones

☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe  
29.09.2011

Examinador  
N. Vera Gutierrez

Página  
1/4

## CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

**A61K31/194** (2006.01)

**A61K9/08** (2006.01)

**A61P9/00** (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

A61K, A61P

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, CAS, MEDLINE, BIOSIS, EMBASE, NPL



Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 29.09.2011

**Declaración**

|                                                 |                                 |           |
|-------------------------------------------------|---------------------------------|-----------|
| <b>Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)</b>            | Reivindicaciones 7-9, 13-18     | <b>SI</b> |
|                                                 | Reivindicaciones 1-6, 10-12, 19 | <b>NO</b> |
| <b>Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)</b> | Reivindicaciones 7-9, 13-18     | <b>SI</b> |
|                                                 | Reivindicaciones 1-6, 10-12, 19 | <b>NO</b> |

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

**Base de la Opinión.-**

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

**1. Documentos considerados.-**

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

| Documento | Número Publicación o Identificación | Fecha Publicación |
|-----------|-------------------------------------|-------------------|
| D01       | US 7404951 B2                       | 29.07.2008        |
| D02       | US 2009304661 A1                    | 10.12.2009        |

**2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración**

La solicitud se refiere al uso de oxalacetato o sus derivados para la fabricación de un medicamento para administración tipo bolus en una cantidad terapéuticamente efectiva para el tratamiento o prevención de un trastorno asociado a elevadas concentraciones de glutamato en el tejido cerebral.

Los documentos D01 y D02 divulgan un método y una composición para proteger el tejido neuronal de las lesiones provocadas por niveles elevados de glutamato, por ejemplo en casos de isquemia, traumatismo cerebral, glaucoma y esclerosis lateral amiotrófica. En ambos documentos el agente empleado para ese fin puede ser un co-factor de las enzimas modificadoras de glutamato, como por ejemplo, oxalacetato (D01: ejemplo 2, reivindicaciones 6, 13, 15; D02: reivindicaciones 22, 23). En la columna 17, líneas 58 - 65 de D01 y en el párrafo [0136] de D02 se indica que las preparaciones pueden ser formuladas para la administración parenteral tipo bolus.

Por ello, las reivindicaciones 1-6, 10-12, 19 de la solicitud carecen de novedad (Artículo 6.1 L.P.).

Respecto a las reivindicaciones 7-9, 13-18, relativas a la cantidad de oxalacetato empleada, se considera que son nuevas e implican actividad inventiva (Artículo 8.1 L.P.).