



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 304 452**

51 Int. Cl.:

**A61K 38/17** (2006.01)

**A61P 9/10** (2006.01)

**A61P 25/00** (2006.01)

12

# TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **02774525 .6**

86 Fecha de presentación : **20.08.2002**

87 Número de publicación de la solicitud: **1425031**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **09.06.2004**

54 Título: **Una HDL para el tratamiento de un ictus y de otras condiciones isquémicas.**

30 Prioridad: **20.08.2001 EP 01120026**  
**20.08.2001 US 313605 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**16.10.2008**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**16.10.2008**

73 Titular/es: **CSL Behring AG.**  
**Wankdorfstrasse 10**  
**3014 Bern, CH**

72 Inventor/es: **Hubsch, Alphonse;**  
**Lang, Markus, G.;**  
**Lerch, Peter, G. y**  
**Paterno, Roberto**

74 Agente: **Lehmann Novo, María Isabel**

**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

Una HDL para el tratamiento de un ictus y de otras condiciones isquémicas.

5 El presente invento se refiere al uso de una lipoproteína de alta densidad (HDL, del inglés high density lipoprotein) para el tratamiento de un ictus y de otras condiciones isquémicas, en el que unas partículas de HDL, como se ilustran por partículas de una HDL reconstituida (rHDL), se administran a un individuo que necesita de ellas, particularmente mediante infusión por vía intravenosa.

10 Un ictus puede ser clasificado en formas tromboembólicas y hemorrágicas y es la tercera mayor causa de muertes en los países occidentales, detrás de una enfermedad cardíaca y de un cáncer. En los Estados Unidos de América, cada año 600.000 personas padecen de un ictus nuevo o recurrente (aproximadamente 500.000 son el (los) primer(os) ataque(s) y aproximadamente un 29% de ellas mueren dentro del primer año (1). La incidencia de los ictus aumenta con la edad, y en la ancianidad es la causa principal de una incapacidad grave a largo plazo en los EE.UU., que  
15 asciende a unos costos totales de 51,3 mil millones de \$/año (1). Aunque la tasa de muertes procedente de un ictus ha estado decreciendo en los últimos años, ampliamente debido a la concienciación aumentada y al mejor control de factores de riesgo tales como hipertensión, hipercolesterolemia, arritmia o diabetes, el número real de muertes por ictus está creciendo a causa de una población anciana creciente. Sin embargo, cuando fallan las medidas de prevención existen unos enfoques trombolíticos solamente limitados y arriesgados, p.ej. el uso de un t-PA (del inglés  
20 tissue plasminogen activator = activador del plasminógeno tisular). Una protección neuronal podría convertirse en el futuro en una estrategia nueva y más segura para el tratamiento de los ictus (2-4).

Una causa corriente del choque circulatorio es una grave pérdida de sangre asociada con un trauma. A pesar de los mejoramientos en la medicina de cuidados intensivos, sigue siendo alta la mortalidad procedente de un choque  
25 hemorrágico (5,6). Por lo tanto, existe todavía una gran necesidad de nuevos enfoques para mejorar la terapia y los resultados de pacientes con un choque hemorrágico (6). En la práctica clínica, un choque hemorrágico conduce a una descompensación vascular retrasada (que da como resultado una grave hipotensión) y, en aproximadamente un 25% de los pacientes, a la disfunción o al fallo de varios órganos, incluyendo los pulmones, los riñones, los intestinos, el hígado y el corazón (7). Una disfunción de órganos puede producirse también a partir de un suceso isquémico, causado  
30 por una reducción en el suministro de sangre como un resultado de un bloqueo que se distingue de una hemorragia. Hay también evidencia de que una reperfusión (durante una resucitación) también tiene una cierta importancia en la patofisiología del síndrome de disfunción de órganos múltiples (MODS, del inglés multiple organ dysfunction syndrome) (8).

35 De acuerdo con el documento de solicitud de patente internacional WO 01/13939 y la cita (21), una rHDL usada en un modelo de choque hemorrágico de rata demostró una importante reducción del daño para los órganos. Un choque hemorrágico comprende una reducción generalizada en el suministro de sangre a todo el cuerpo, que da como resultado un daño hipóxico, que afecta a todos los órganos y tejidos. En contraste, una isquemia describe un agotamiento localizado del suministro de sangre a órganos y tejidos específicos, dando como resultado una iniciación  
40 rápida de una anoxia en estas regiones afectadas. Los mecanismos del daño son por lo tanto bastante distintos.

Se ha mostrado que una rHDL estimula el flujo de colesterol procedente de células periféricas en un proceso mejor conocido como transporte inverso de colesterol. Además, una rHDL fija de una manera dependiente de la dosis a lipopolisacáridos (LPS) bacterianos e inhibe una producción de citocinas inducida por los LPS así como una ad-  
45 herencia de PMN's (leucocitos polimorfonucleares) a células endoteliales (21). Una rHDL tiene una actividad anti-inflamatoria y eliminadora de radicales de oxígeno libres. Una rHDL disminuye también la velocidad y la extensión de una conglomeración de plaquetas. Más recientemente, se demostró que una rHDL restaura agudamente la función endotelial y a su vez normaliza el flujo de sangre en pacientes hipercolesterolémicos por aumento de la biodisponibilidad de óxido nítrico, tal como se determina por una pletismografía del antebrazo (9).

50 La patofisiología de un ictus está caracterizada por una amplia gama de anormalidades homeostáticas, hemodinámicas y metabólicas, tales como una formación de trombos, una función endotelial perjudicada y una cascada activada de inflamación, es decir, una aumentada producción de citocinas y una aumentada expresión de moléculas de adhesión (10-15). Otra marca característica de un ictus es el estrés oxidativo aumentado después de una reperfusión, lo que se cree que tiene una importancia nociva en la progresión de la enfermedad.  
55

Una isquemia prolongada da como resultado una elevación de la concentración intracelular de  $Ca^{++}$  y la consiguiente activación de proteasas y fosfolipasas da como resultado una formación de numerosos productos potencialmente dañinos de la descomposición de lípidos en membranas. Estos incluyen metabolitos del ácido araquidónico, los cuales,  
60 en la presencia de oxígeno durante una reperfusión, proporcionan una fuente de formación de radicales libres (p.ej. aniones de superóxidos y de hidroxilo). Estos radicales libres inducen una destrucción de la barrera hematoencefálica así como una apoptosis y/o una necrosis neuronales. Una apoptosis es una forma de muerte celular, que elimina a las células comprometidas o superfluas sin ninguna respuesta inflamatoria, y se diferencia de una necrosis por muchas características morfológicas y bioquímicas. La característica de una apoptosis se puede encontrar tanto en las neuro-  
65 nas como en la glía después de lesiones isquémicas. Las neuronas situadas en la penumbra isquémica, que no están expuestas a una isquemia letal, pueden experimentar una apoptosis retardada (16). La denominada penumbra es una zona del cerebro en la que el flujo de sangre se ha reducido hasta un nivel en el que se interrumpe la función neuronal y las consiguientes actividades eléctricas, pero permite el mantenimiento de bombas de membranas y la preservación

de gradientes de iones. Esta zona del cerebro tiene dos características que explican su importancia clínica potencial: 1) la interrupción de una función clínica y eléctrica, que caracteriza a esta zona, es fundamentalmente reversible, pero (2) la reversibilidad está limitada en el tiempo y vinculada con una reperusión.

5 Sorprendentemente, se encontró que la magnitud de las lesiones en modelos con animales para un ictus (excitotoxicidad y oclusiones de las arterias cerebrales) es reducida por administración de una HDL. Estos datos muestran que una HDL puede mejorar el resultado a continuación de un daño neuronal excitotóxico e isquémico / por reperusión, particularmente una apoptosis y/o una necrosis en la zona isquémica y en la penumbra. Además, se mostró en un modelo con animales para un choque hemorrágico, que una HDL reduce la infiltración de los PMN's e impide una  
10 lesión y una disfunción de órganos. En el momento actual, se desconoce el mecanismo de la acción. Es posible que una HDL pueda actuar como un agente eliminador de radicales de oxígeno libres, como un vasodilatador, p.ej. por medio de una mejoría en la biodisponibilidad de NO, dando como resultado una mejoría del flujo sanguíneo colateral, o puede exhibir un efecto anti-inflamatorio. Por lo tanto, una HDL puede actuar como un fármaco neuroprotector, particularmente en enfermedades cerebrovasculares. También puede trabajar mediante una combinación de todas estas  
15 actividades, consiguiendo una eficacia clínica que todavía no se ha observado en terapias actuales.

El invento se refiere en términos generales al uso de una HDL para el tratamiento de una isquemia o de una lesión por reperusión que resulte de dicha isquemia. Una isquemia para un órgano se produce como resultado de una interrupción de su suministro de sangre, y en su sentido más amplio puede dar como resultado una disfunción o un  
20 daño para el órgano, especialmente para el corazón, el cerebro, los riñones, el hígado o los pulmones. Es un suceso / una interrupción local que conduce a un daño completo o parcial y que en algunos casos es reversible. Una lesión por reperusión se produce como consecuencia de un rápido retorno de sangre oxigenada a la zona a continuación de una isquemia y se la cita frecuentemente en contratiempos cardiovasculares y cerebrales.

25 Por lo tanto, un objeto del presente invento es el uso de una HDL para la producción de un agente destinado al tratamiento de una isquemia o de una lesión por reperusión que resulte de dicha isquemia. Particularmente, una HDL se puede usar para el tratamiento de una enfermedad seleccionada entre un ictus isquémico, una lesión tisular isquémica, p.ej. una lesión isquémica de órganos, una isquemia cardíaca, una lesión por reperusión cardíaca y complicaciones que resultan de un trasplante de un órgano, p.ej. de un riñón, del corazón y del hígado, o de una operación quirúrgica de derivación cardiopulmonar y otros trastornos. Incluso más sorprendentemente, se ha encontrado que una HDL puede  
30 tener un efecto beneficioso cuando está ocurriendo una oclusión transitoria o permanente. Como resultado, no es un requisito previo para su eficacia que el coágulo, u otra entidad que causa la oclusión, se disuelva o elimine de otra manera distinta. Más aún, la administración de una HDL muestra beneficios incluso a las 6 o más horas después de un suceso isquémico. Una observación sorprendente adicional ha sido el efecto beneficioso de una administración de una  
35 HDL antes de un suceso isquémico.

Una forma de realización adicional del invento se refiere al uso de una HDL para el tratamiento de ataques isquémicos transitorios (TIA, del inglés transient ischemic attacks). Los TIA's son corrientes y aproximadamente una tercera parte de las personas afectadas desarrollarán un ictus algún tiempo más tarde. La causa más frecuente de los  
40 TIA's es la embolización por un trombo procedente de una placa aterosclerótica en un vaso grande (típicamente una arteria carótida aterosclerosada estenosada). Puesto que una HDL tiene propiedades anti-ateroscleróticas, como se muestra en estudios que consideran la función endotelial por medio de la restauración de la biodisponibilidad de óxido nítrico, la regulación del tono vascular y la estructura (9), se cree que una HDL puede desempeñar un cierto cometido en la estabilización de una placa aterosclerosada que causa TIA's, reduciendo de esta manera el riesgo de un ictus de  
45 gran magnitud. Una terapia corriente para los TIA's incluye una terapia anti-plaquetas, un tratamiento con aspirina o ticlopidina y una intervención quirúrgica tal como una endoarterectomía. Sin embargo, ninguno de estos tratamientos ha proporcionado hasta ahora una reducción sustancial en la morbilidad.

Todavía una forma de realización adicional se refiere a la administración de una HDL a grupos de pacientes de  
50 riesgo tales como pacientes que están siendo sometidos a una operación quirúrgica. La administración de una HDL puede reducir la incidencia y/o la gravedad de nuevos ictus. La administración de una HDL podría también ser útil en pacientes con TIA's, fibrilación atrial y estenosis asintomática de la carótida.

El uso de una HDL para el tratamiento de las enfermedades anteriores, particularmente para el tratamiento de un  
55 ictus y de ataques isquémicos transitorios, cumple una necesidad clínica hasta ahora no satisfecha. Esto proporciona una terapia neuroprotectora efectiva clínicamente para individuos con una lesión cerebral traumática.

El término "HDL", tal como se usa en el presente invento, se refiere a partículas similares a lipoproteínas de alta densidad y comprende una HDL naciente o una HDL reconstituida (rHDL) o cualquier mezcla de éstas. Dichas  
60 partículas se pueden producir a partir de un componente proteínico o peptídico, y a partir de lípidos. El término "HDL" incluye también dentro de su alcance a cualquiera HDL recombinante o compuesto análogo a éste que tenga una relación funcional con una HDL naciente o reconstituida.

Las proteínas son preferiblemente apolipoproteínas, p.ej. apolipoproteínas humanas o apolipoproteínas recombinantes, o péptidos con propiedades similares. Apropriados lípidos son fosfolípidos, preferiblemente fosfatidil colina, opcionalmente mezclada con otros lípidos (colesterol, ésteres de colesterol, triglicéridos, u otros lípidos). Los lípidos  
65 pueden ser lípidos sintéticos, lípidos presentes en la naturaleza o combinaciones de ellos.

La administración de una HDL puede dar como resultado, por una parte, un efecto a corto plazo, es decir que se observa un efecto beneficioso inmediato sobre varios parámetros clínicos y esto puede suceder no sólo dentro de las 3 horas del comienzo de un ictus, sino incluso a las 6 horas o posiblemente incluso más largo tiempo y, por otra parte, como un efecto a largo plazo, se puede obtener una alteración beneficiosa en el perfil de lípidos. Además, una HDL se asemeja muy estrechamente a sustancias que se presentan por naturaleza en el cuerpo y por lo tanto la administración de una HDL está libre de efectos secundarios.

Una HDL se administra preferiblemente por infusión, p.ej. por inyección y/o infusión arterial, intraperitoneal o preferiblemente intravenosa en una dosificación que es suficiente para obtener el deseado efecto farmacológico. Por ejemplo, una HDL se puede administrar antes del comienzo de una isquemia (si fuese previsible, p.ej. antes de un trasplante de órganos) y/o durante una isquemia, antes y/o poco después de una reperfusión, particularmente dentro de las 24 h - 48 h.

La dosificación de una HDL varía preferiblemente entre 10 y 200 mg, más preferiblemente entre 40 y 80 mg de una HDL (en peso basado en una apolipoproteína) por kg de peso corporal y por tratamiento. Por ejemplo, la dosificación de una HDL que se administra puede ser de aproximadamente 20 - 100 mg de una HDL por kg de peso corporal (peso basado en una apolipoproteína) administrada como una inyección por bolo y/o como una infusión durante un período de tiempo necesario clínicamente, p.ej. durante un período de tiempo que varía entre unos pocos minutos y varias horas, p.ej. hasta 24 horas. Si fuese necesario, la administración de una HDL se puede repetir una o varias veces.

Una lipoproteína de alta densidad reconstituida (rHDL) se puede preparar a partir de una apolipoproteína A-I humana (apoA-I), p.ej. aislada a partir de un plasma humano, y fosfatidilcolina (PC) derivada de soja, mezclada en unas relaciones molares de aproximadamente 1:150 de apoA-1:PC.

De acuerdo con el presente invento, se prefiere particularmente una HDL, p.ej. una HDL naciente, una rHDL, una HDL recombinante o una partícula similar a una HDL, que tiene una relación molar de proteína (p.ej. la apolipoproteína A-1) y de un fosfolípido situada en el intervalo de 1:50 a 1:250, particularmente de alrededor de 1:150. Además, una rHDL puede contener opcionalmente lípidos adicionales tales como colesterol, ésteres de colesterol, triglicéridos y/o esfingolípidos, preferiblemente en una relación molar hasta de 1:20, p.ej. de 1:5 a 1:20, basada en la apolipoproteína. Una rHDL preferida se describe en el documento de solicitud de patente europea EP-A-0.663.407.

La administración de una HDL se puede combinar con la administración de otros agentes farmacéuticos, tales como agentes trombolíticos, agentes anti-inflamatorios, y agentes neuro- y/o cardio-protectores.

Además, el presente invento se refiere al uso de una HDL para el tratamiento de una isquemia o de una lesión por reperfusión que resulte de dicha isquemia, que comprende administrar a un individuo, que necesite de ella, una cantidad eficaz de una HDL. Preferiblemente, una HDL se administra a un paciente humano.

Además, el presente invento será explicado con detalle mediante los siguientes Ejemplos:

#### Ejemplo 1

##### *Lesión excitotóxica*

Se llevaron a cabo experimentos en ratas Sprague-Dawley anestesiadas con hidrato de cloral (400 mg/kg por vía ip. = intraperitoneal). Una vena femoral fue canulada para la infusión de una rHDL. Las ratas se colocaron dentro de un aparato estereotáxico y, después de una incisión por la línea central, recibieron una inyección unilateral de N-metil-D-aspartato (NMDA) o de un vehículo dentro del cuerpo estriado derecho: coordenadas: 0,2 mm posterior, 3 mm lateral, 5,5 mm ventral con respecto a la bregma. Cinco minutos después de la introducción de la aguja, la solución se inyectó durante un periodo de tiempo de 6 minutos usando una bomba de jeringa de Hamilton con un caudal de 0,5 ml/min. A los 5 minutos después de que se hubo completado la inyección, la aguja se retiró.

En esta serie de experimentos, las ratas recibieron una infusión intravenosa de una solución salina (n = 5) (5 µl/min) durante 4 h. Después de 2 h, se llevó a cabo una inyección unilateral de NMDA (75 nM en 3 ml de una solución salina tamponada con fosfato de pH 7,4) dentro del cuerpo estriado derecho. Después de veinticuatro horas, las ratas fueron sacrificadas y se les extrajo el cerebro para realizar su análisis histológico. En otro grupo de experimentos, las ratas recibieron una infusión intravenosa de una rHDL (n = 5) (5 µl/min) en una dosis de 120 mg/kg durante 4 h. Después de 2 h, se aplicó una inyección unilateral de NMDA (75 nM en 3 ml de una solución salina tamponada con fosfato de pH 7,4) dentro del cuerpo estriado derecho y se continuó durante 2 h adicionales una infusión intravenosa de una rHDL. Veinticuatro horas más tarde, las ratas fueron sacrificadas y se les extrajo el cerebro para realizar su análisis histológico. Los resultados se muestran en la Tabla 1:

TABLA 1

*Volumen de la lesión en mm<sup>3</sup>*

Rata	Testigo	rHDL
1	50,27	16,54
2	47,05	18,86
3	41,28	17,44
4	38,5	17,51
5	51,66	19,86
n	5	5
MEDIA	45,75	18,04
SD (desviación típica)	5,69	1,31
SEM (error típico de la media)	2,55	0,59

En este experimento se observó una reducción espectacular del volumen necrótico del cerebro en animales tratados con una rHDL, de un 60,6% en comparación con los testigos.

En una serie adicional de experimentos se administró una rHDL (120 mg/kg) o una infusión de un placebo (solución salina) durante 4 h comenzando a las 3 h después de una inyección de NMDA. La magnitud del infarto se midió histológicamente después de 24 h. Los resultados se muestran en la Tabla 2.

TABLA 2

Solución salina + NMDA		rHDL + NMDA	
Volumen de la lesión (mm <sup>3</sup> )		Volumen de la lesión (mm <sup>3</sup> )	
	175		77
	101		83
	105		133
	180		121
	149		51
	115		66
Media	137		88
DT	35		32
% de reducción		-36 %	
p (ensayo t de Student)		0,03	

En este experimento se encontró una reducción de la magnitud del infarto de 36%.

## Ejemplo 2

### *Oclusión de la arteria cerebral central*

#### *2.1. Administración antes de la oclusión*

Se llevaron a cabo experimentos en ratas Sprague-Dawley anestesiadas con hidrato de cloral (400 mg/kg por vía ip). Las traqueas fueron canuladas y los animales se ventilaron mecánicamente con aire y con oxígeno suplementario, para mantener el nivel de gases en sangre dentro de unos intervalos normales. Se vigiló continuamente la temperatura rectal y se mantuvo en 37°C. Se colocaron unos catéteres dentro de la arteria femoral para medir la presión sanguínea sistémica y para vigilar el nivel de gases en sangre. Una vena femoral fue canulada para la infusión de un fármaco. Se hizo una incisión en la línea central del cuello y se dejó expuesta la arteria carótida común derecha. A continuación de una coagulación de sus ramales, la arteria carótida externa (ECA, de external carotid artery) se abrió distalmente. Un hilo de nylon (diámetro 0,22 mm), que tenía un cilindro distal de silicona (longitud 2 mm, diámetro 0,38 mm) de

un pegamento termofusible, se introdujo en el lumen de la ECA y se hizo avanzar dentro de la arteria carótida interna hasta llegar al origen de la MCA. Para restaurar el flujo sanguíneo en la MCA, el hilo de nylon se retiró y se cortó treinta minutos más tarde.

- 5      Análisis histológico: Veinticuatro horas después de la operación quirúrgica, se realizó una eutanasia. Los cerebros se extrajeron con rapidez, se congelaron en isopentano a  $-50^{\circ}\text{C}$  y se almacenaron a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Unas secciones cerebrales coronarias cortadas con un criostato ( $20\text{ }\mu\text{m}$ ) se tiñeron con tiónina y se analizaron usando un analizador de imágenes. Las zonas lesionadas fueron delimitadas por la descoloración de la tinción histológica en un tejido alterado, comparada con el color de un tejido sano. Se determinaron las regiones interesantes mediante el uso de un mapa estereotáxico para la rata y se usó un sistema de análisis de imágenes para medir la zona lesionada.

- 15      En esta serie de experimentos, las ratas recibieron una infusión intravenosa de una solución salina ( $n = 5$ ) ( $5\text{ }\mu\text{l/min}$ ) durante 4 h. Después de 2 h, la MCA de las ratas fue ocluida durante 30 minutos, lo que fue seguido por una reperusión. Después de veinticuatro horas, las ratas fueron sacrificadas para un análisis histológico del cerebro. En otro grupo de experimentos, las ratas recibieron una infusión intravenosa de una rHDL ( $n=5$ ) ( $5\text{ }\mu\text{l/min}$ ) en una dosis de  $120\text{ mg/kg}$  durante 4 h. Después de 2 h, las MCA de las ratas fueron ocluidas durante 30 minutos, lo que fue seguido por una reperusión. Veinticuatro horas más tarde, las ratas fueron sacrificadas para un análisis histológico del cerebro. Los resultados se muestran en la Tabla 3.

- 20      En el modelo de oclusión de las MCA, se obtuvieron los siguientes resultados:

TABLA 3

*Volumen de la lesión en  $\text{mm}^3$*

25

Rata	Testigo	rHDL
1	158,94	54,18
2	229,78	35,27
3	201,52	37,64
4	193,02	34,64
5	210,24	76,74
n	5,00	5,00
MEDIA	198,70	47,69
SD	26,08	18,11
SEM	11,66	8,10

40

Una rHDL redujo el volumen necrótico del cerebro en un 76% en comparación con ratas testigos.

## 45      2.2. Administración después de una oclusión

- Una rHDL se administró 3 h después de una lesión en el modelo de MCAo (del inglés middle cerebral artery occlusion = oclusión de la arteria cerebral central). En 12 ratas se alcanzó una oclusión provisional de la arteria cerebral central (MCA del inglés middle cerebral artery) introduciendo un hilo de nylon a través de la arteria carótida, y se restauró el flujo de sangre 30 minutos más tarde. Después de 3 horas, ellas recibieron una infusión intravenosa ya sea de una rHDL ( $120\text{ mg/kg}$  durante 4 h,  $6\text{ ml/kg}$  durante 4 h) o de una solución salina ( $6\text{ ml/kg}$  durante 4 h). Las ratas fueron asignadas aleatoriamente al grupo tratado con rHDL o al grupo testigo. En cuatro ratas adicionales se realizó el mismo proceso de oclusión de la MCA pero el hilo de nylon fue detenido en la arteria carótida interna, sin interferir con el flujo de sangre en la carótida, y fue retirado treinta minutos más tarde (grupo de MCAo simulado). Después de 3 horas, dos ratas de este grupo recibieron una rHDL y otras dos recibieron una solución salina por vía intravenosa ( $6\text{ ml/kg}$  durante 4 h). 24 h más tarde, todas las ratas fueron sacrificadas y los cerebros se extrajeron para su análisis histológico. La zona necrótica fue delimitada por la descoloración de la tinción histológica en comparación con el color de un tejido sano. Las regiones interesantes fueron determinadas por medio del uso de un mapa estereotáxico para la rata y se usó un sistema de análisis de imágenes (imagen de NIH) para medir el área necrótica.

60

En el grupo MCAo simulado no había ninguna lesión.

- Después de una oclusión de la MCA en las otras 12 ratas, tratadas por vía intravenosa con una solución salina o con una rHDL, los resultados de los análisis de las imágenes se presentan en la Tabla 4. Los resultados muestran que una infusión de una rHDL a las 3 horas después de la oclusión dio como resultado una reducción del 60% en el volumen del infarto ( $\text{mm}^3$ ).

65

TABLA 4

Área de la lesión en mm <sup>3</sup>			
	Testigo		rHDL
Rata			
1	88,94		87
2	118,9		46,91
3	110,06		43,91
4	121,09		43,13
5	224,14		36,65
6	157,45		35,63
Media	136,8		48,9
SD	48,2		19,2
		% de reducción	64 %
		p (ensayo t de Student)	0,0020

El volumen necrótico fue reducido en un 64% en comparación con el de ratas testigos.

*Conclusión:* En ambos modelos, se observó una reducción espectacular del volumen de un infarto en animales tratados con rHDL, en comparación con el de testigos tratados con un placebo:

Modelo excitotóxico: reducción de 60,6% o 36% del volumen necrótico; modelo de oclusión de la MCA: reducción del 76% o 60%.

### Ejemplo 3

*Administración de una rHDL en un modelo de rata para un ictus (modelo de oclusión de la MCA)*

#### Método

Se usaron en este estudio 120 ratas Sprague-Dawley machos. 100 ratas recibieron o bien una oclusión transitoria o una oclusión permanente. 20 ratas sirvieron como testigos quirúrgicos y con rHDL. Una rHDL (120 mg/kg/4 h) se infundió comenzando a las 2 h antes o a las 3 o 6 h después de la inducción de un ictus. Se usó el mismo método de oclusión con un hilo que en el Ejemplo 2.

Las ratas fueron agrupadas en tres brazos de tratamiento. El grupo 1 recibió una dosis profiláctica de una rHDL 2 horas antes de haber recibido una oclusión transitoria de la MCA (a las 2 horas) y continuó recibiendo el tratamiento durante la oclusión. Luego la arteria fue reperfundida.

El grupo 2 recibió una oclusión transitoria de la MCA seguida por una perfusión.

El tratamiento con una HDL se administró o bien 3 horas o 6 horas más tarde.

El grupo 3 recibió una oclusión permanente de la MCA y recibió un tratamiento a las 3 horas o a las 6 horas después de la oclusión.

Siguiendo el protocolo anterior, las ratas fueron examinadas para comprobar el cambio neurológico usando cuatro ensayos neurológicos motores clásicos, a saber por flexión de una pata delantera, retorcimiento del torso, empuje lateral y movilidad. Las calificaciones fueron añadidas para cada uno de los ensayos y los resultados se presentaron en la Figura 1.

A partir de esta Figura está claro que una rHDL, administrada tanto en forma de un tratamiento previo como en forma de una dosis a las 3 o 6 horas después de una oclusión (tanto transitoria como permanente), dio como resultado una mejor calificación neurológica que para las ratas sin tratar.

A continuación de los análisis neurológicos, las ratas fueron sacrificadas y se extrajeron sus cerebros. Unas secciones de los cerebros de las ratas fueron examinadas usando una técnica balística de luz, que medía el área de un infarto

por la reflexión de la luz. Los resultados de unas MCAo permanente y transitoria, tratadas con una rHDL, se muestran en las Figuras. 2 y 3.

Estos gráficos muestran que si una rHDL se administra a ratas (i) 2 horas antes de una oclusión, hay una reducción en el volumen total de un infarto de 54%, o (ii) 3 horas después de una oclusión transitoria hay una reducción de 65%, y (iii) 6 horas después de una oclusión transitoria hay una reducción de 62%. Una reducción similar de 59% se observó para una oclusión permanente en ambos momentos del tratamiento.

Por lo tanto, la administración de una rHDL es eficaz como tratamiento profiláctico antes de una oclusión y como tratamiento terapéutico en dos diferentes momentos después de una oclusión. Más particularmente, se pueden combinar un tratamiento profiláctico con un tratamiento terapéutico.

## Bibliografía

1. American Heart Association (AHA), 2000
2. **Hays SJ.** Therapeutic approaches to the treatment of neuroinflammatory diseases [Enfoques terapéuticos para el tratamiento de enfermedades neuroinflamatorias]. *Curr Pharm Des* 4:335-348, 1998
3. **Jean WC, Spellman SR, Nussbaum ES, Low WC,** Reperfusion injury after focal cerebral ischemia: the role of inflammation and the therapeutic horizon [Lesión por reperfusión después de una isquemia cerebral focal: el cometido de una inflamación y el horizonte terapéutico]. *Neurosurgery* 43:1382-1396, 1998
4. **Barone FC, Feuerstein GZ.** Inflammatory mediators and stroke: new opportunities for novel therapeutics [Mediadores inflamatorios y un ictus: nuevas oportunidades para nuevos tratamientos terapéuticos]. *J Cereb Blood Flow Metab* 19:819-834, 1999
5. **Morgan WM, y O'Neill JA.** Hemorrhagic and obstructive shock in pediatric patients [Choque hemorrágico y obstructivo en pacientes pediátricos]. *New Horiz* 6: 150-154, 1998
6. **Demetriades D, Smith JS, Jacobson LE, Moncure M, Minei J, Nelson BJ y Scannon PJ.** Bactericidal/permeability-increased protein (rBP121) in patients with hemorrhage due to trauma: results of a multicenter phase II clinical trial. RBP121 Acute Hemorrhage Trauma Study Group [Proteína (rBP121) bactericida / con permeabilidad aumentada en pacientes con una hemorragia debida a un trauma: resultados de una prueba clínica en la fase II de múltiples cánceres]. *J Trauma* 46: 667-676, 1999
7. **Regel G, Gotz M, Weltner T, Sturm JA and Tscherne H.** Pattern of organ failure following severe trauma. [Cuadro de fallos de órganos después de un trauma grave]. *World J Surg* 20: 422-429, 1996
8. **Cryer HG.** Therapeutic approaches for clinical, ischaemia and reperfusion injury [Enfoques terapéuticos para lesiones clínicas, de isquemia y por reperfusión]. *Schock* 8: 26-32, 1997
9. **Spieker LE, Sudano I, Lerch PG, Lang MG, Binnigeli C, Corti R, Lüscher TF, Noll G.** High-density lipoprotein restores endothelial function in hypercholesterolemic men [Una lipoproteína de alta densidad restaura la función endotelial en personas hipercolesterolémicas]. *N Engl J Med*, 2000. (en preparación)
10. **Feuerstein GZ, Wang X, Barone FC.** The role of cytokines in the neuropathology of stroke and neurotrauma [El cometido de las citocinas en la neuropatología de ictus y traumas neuronales] *Neuroimmunomodulation* [Neuroinmunomodulación] 5:143-159, 1998
11. **DeGraba TJ.** The role of inflammation after acute stroke: utility of pursuing anti-adhesion molecule therapy [El cometido de una inflamación: utilidad de proseguir una terapia contra moléculas de adhesión]. *Neurology* [Neurología] 51:62-68, 1998
12. **Benveniste EN.** Cytokine actions in the central nervous system. [Acciones de citocinas en el sistema nervioso central]. *Cytokine Growth Factor* [Factor de crecimiento de citocinas] *Rev* 9:259-275, 1998
13. **Van Wagoner NJ, Benveniste EN,** Interleukin-6 expression and regulation in astrocytes [Expresión y regulación de interleucina 6 en astrocitos]. *J. Neuroimmunol* 100:124-139, 1999
14. **Touzani O, Boutin H, Chuquet J, Rothwell N.** Potential mechanism of interleukin-1 involvement in cerebral ischemia [Mecanismo potencial de la implicación de la interleucina 1 en una isquemia cerebral], *J Neuroimmunol* 100:203-215, 1999
15. **del Zoppo G, Ginis I, Hallenbeck JM, Iadecola C, Wang X, Feuerstein GZ.** Inflammation and stroke: putative role for cytokines, adhesion molecules and iNOS in brain responses to ischemia [Infamación e ictus: cometido putativo para citocinas, moléculas de adhesión y respuestas a una isquemia por iNOS en el cerebro]. *Brain Pathol* 10:95-112, 2000

16. **Du C, R Hu, CA Csernansky, CY Hsu, DW Choi.** Very delayed infarction after mild focal cerebral ischemia: A role for apoptosis? [Infarto muy retardado después de una isquemia cerebral focal suave. ¿Un cometido de la apoptosis?] *J Cereb Blood Flow Metab* 16:195-201, 1996

17. **Matsuda Y, Hirata K, Inoue N, Suematsu M, Kawahima S, Akita H, Yokoyama M.** High density lipoprotein reverses inhibitory effect of oxidized low density lipoprotein on endothelium-dependent arterial relaxation [Una lipoproteína de alta densidad invierte el efecto inhibidor de una proteína de baja densidad oxidada sobre la relajación arterial dependiente del endotelio]. *Circ Res* 72(5):1103-1109, 1993

18. **Chander R, Kapoor NK.** High density lipoprotein is a scavenger of superoxide anions [Una lipoproteína de alta densidad es un agente eliminador de aniones de superóxidos]. *Biochem Pharmacol* 40(7):1663-1665, 1990

19. **Araujo FB, Barbosa DS, Hsin CY, Maranhao RC, Abdalla DS,** Evaluation of oxidative stress in patients with hyperlipidemia [Evaluación del estrés oxidativo en pacientes con hiperlipidemia]. *Atherosclerosis* [Aterosclerosis] 117 (1):61-71, 1995

20. **Huang JM, Huang ZX, Zhu W.** Mechanism of high-density lipoprotein subfractions inhibiting copper-catalyzed oxidation of low-density lipoprotein [Mecanismo de subfracciones de lipoproteínas de alta densidad que inhiben una oxidación catalizada con cobre de una lipoproteína de baja densidad]. *Clin Biochem* 31(7):537-543, 1998

21. **Cockerill GW y colaboradores.** High-density lipoproteins rescue end-stage organ failure in a rat model of haemorrhagic shock [Fallo de órganos en la etapa final del rescate con lipoproteínas de alta densidad en un modelo de choque hemorrágico en ratas]. *J. Submicroscopic Cyt. Path.* 32(3): 353, 2000.

# REIVINDICACIONES

- 5 1. Un uso de una HDL para la producción de un agente destinado al tratamiento de una isquemia o una lesión por reperfusión que resulta de dicha isquemia.
- 10 2. El uso de la reivindicación 1 para el tratamiento de una enfermedad seleccionada entre un ictus isquémico, una lesión tisular isquémica, una isquemia cardíaca y una lesión por reperfusión cardíaca que resulta de dicha isquemia cardíaca, y complicaciones que resultan de un trasplante de órganos o de una operación quirúrgica de derivación cardiopulmonar.
3. El uso de la reivindicación 1 ó 2, en el que una HDL se ha de administrar por infusión y/o inyección intravenosa.
- 15 4. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que una HDL se ha de administrar antes del comienzo de una isquemia y/o durante una isquemia.
5. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que una HDL se ha de administrar en o después de una reperfusión.
- 20 6. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que una HDL se ha de administrar en una dosificación de 10-200 mg de HDL (peso basado en una apolipoproteína) por kg de peso corporal y por tratamiento.
7. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que una HDL se ha de administrar como una inyección en bolo y/o como una infusión para un periodo de tiempo necesario clínicamente.
- 25 8. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en el que una HDL tiene una relación de proteína, p.ej. una apolipoproteína A-I, a fosfolípidos en el intervalo de 1:50-1:250 y opcionalmente unos lípidos adicionales tales como colesterol, ésteres de colesterol, triglicéridos y/o esfingolípidos están presentes en una relación molar de hasta 1:20 basada en la proteína.
- 30 9. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en el que la HDL se selecciona entre una HDL naciente, una HDL reconstituida (rHDL), una HDL recombinante, o mezclas de ellas.
10. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en el que la HDL se deriva de un plasma humano.
- 35 11. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en el que la HDL se selecciona entre cualquiera HDL recombinante o compuesto análogo a ella con una relación funcional con una HDL naciente o reconstituida.
- 40 12. El uso de una cualquiera de la reivindicaciones 1-11, en el que la HDL se ha de administrar en combinación con otros agentes farmacéuticos, tales como agentes trombolíticos, agentes anti-inflamatorios y agentes neuro- y/o cardio-protectores.
- 45 13. Un uso de una cantidad efectiva de una HDL para la producción de un agente destinado al tratamiento de una isquemia o de una lesión por reperfusión que resulta de dicha isquemia en un mamífero, preferiblemente en un ser humano.

## Calificaciones neurológicas

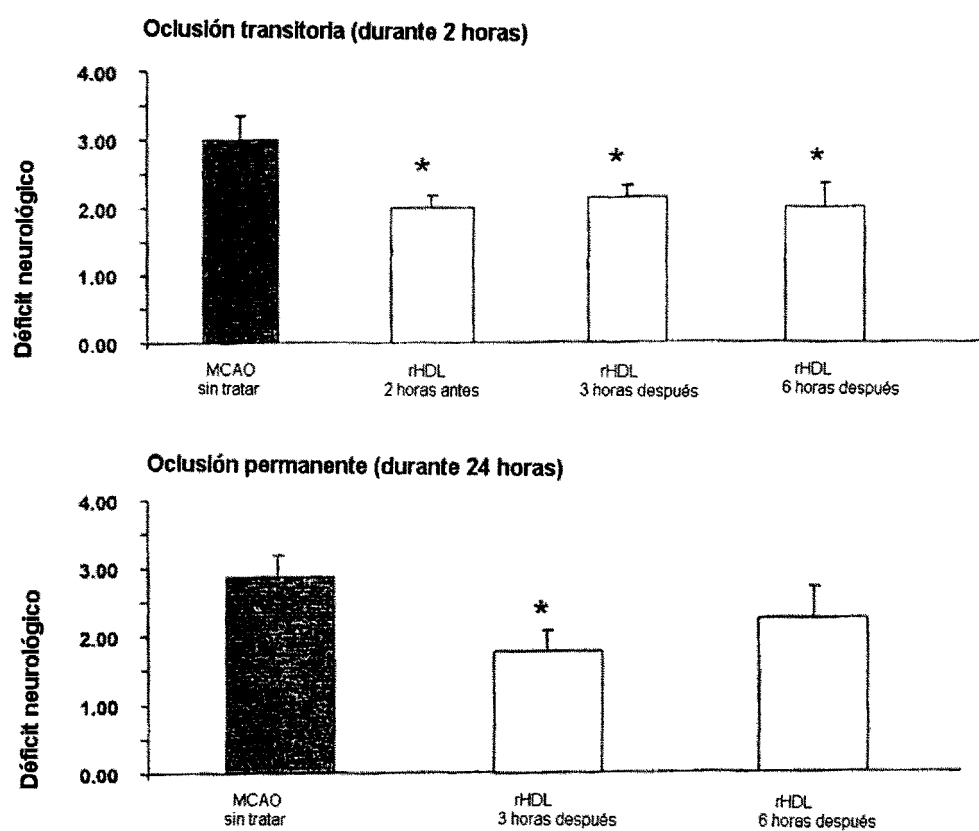


Fig. 1

### MCAO transitoria tratada con una rHDL

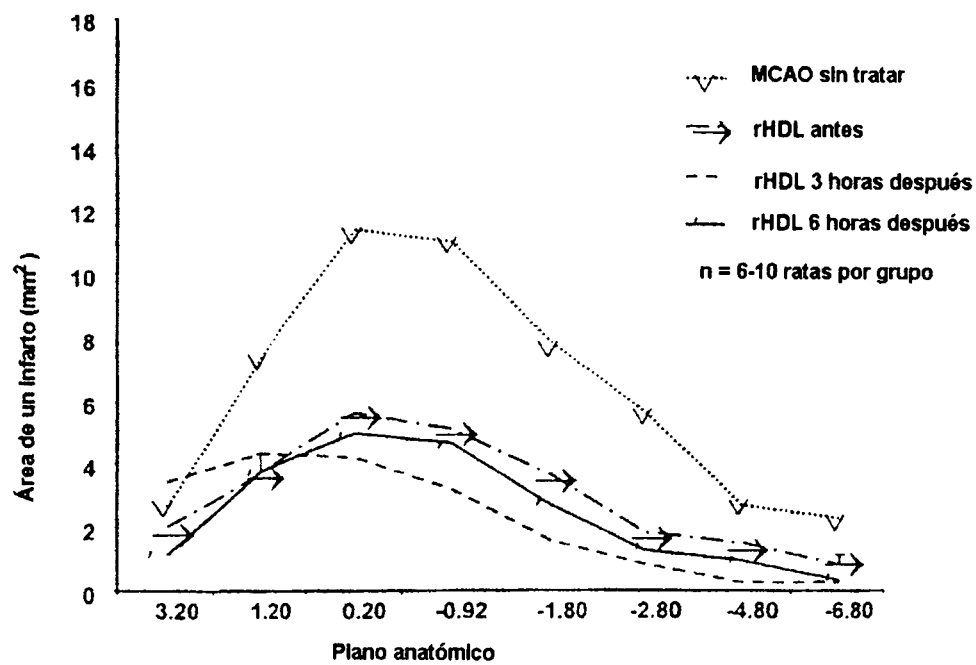


Fig. 2

### MCAO permanente tratada con una rHDL

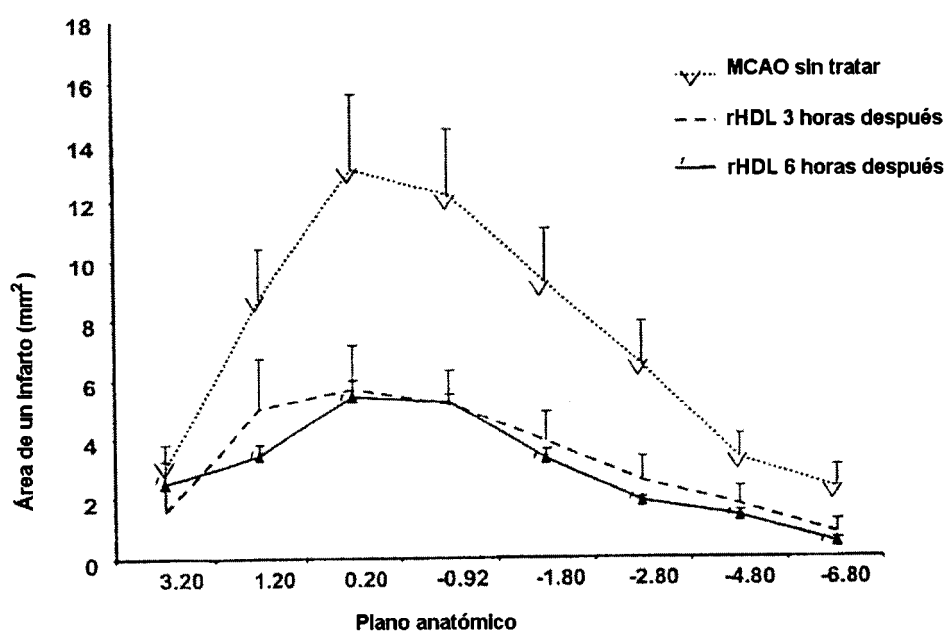


Fig. 3