



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 287 500**

51 Int. Cl.:
A61K 38/30 (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **03744388 .4**
86 Fecha de presentación : **21.02.2003**
87 Número de publicación de la solicitud: **1488801**
87 Fecha de publicación de la solicitud: **22.12.2004**

54 Título: **Composición química IGF para el tratamiento y prevención de enfermedades neurodegenerativas.**

30 Prioridad: **28.02.2002 ES 200200491**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.12.2007

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.12.2007

73 Titular/es:
**Consejo Superior de Investigaciones Científicas
Serrano, 117
28006 Madrid, ES
Universidad Complutense de Madrid**

72 Inventor/es: **López López, C.;**
Carro Díaz, E. M.;
Torres Alem N., I.;
Torrado Durán, J. J.;
Torrado Durán, S. y
Carrascosa, Celia

74 Agente: **Carpintero López, Francisco**

ES 2 287 500 T3

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

DESCRIPCIÓN

Composición química IGF para el tratamiento y prevención de enfermedades neurodegenerativas.

5 **Campo de la invención**

La invención se dirige a la preparación y producción de nuevas formulaciones (microesferas y comprimidos) para la administración de sustancias activas, incluyendo IGF-I, y su utilización en el tratamiento y prevención de enfermedades neurodegenerativas como, entre otras, la enfermedad de Alzheimer o la ataxia cerebelar.

10 **Antecedentes de la invención**

En la actualidad no existe ningún fármaco o procedimiento que proteja frente a enfermedades neurodegenerativas. Este tipo de enfermedades está creciendo en importancia en los países desarrollados debido al paulatino envejecimiento de la población ya que muchas de tales enfermedades están asociadas a la edad (Amaducci L, and Tesco G, Aging as a major risk for degenerative diseases of the central nervous system, *Curr. Opin. Neurol.*, 7: 283-286 (1994)). Sin embargo, aunque se están estudiando intensamente las causas de enfermedades como demencia de Alzheimer o enfermedad de Parkinson, y se está empezando a reconocer un componente genético importante (Heintz N, and Zoghbi HY, Insights from mouse models into the molecular basis of neurodegeneration, *Annu. Rev. Physiol.*, 62: 779-802 (2000)), no existe de momento ningún tratamiento efectivo, con lo que su prevención es de extrema importancia. El hecho de que muchas de estas enfermedades tengan un claro componente hereditario permite que se pueda predecir si se va a desarrollar, o se tiene predisposición a desarrollar, una enfermedad neurodegenerativa. Esto significa que se pueden tomar medidas protectoras frente a la enfermedad antes de que aparezca. Por ejemplo, una medida preventiva que está a punto de ensayarse en poblaciones de riesgo para la enfermedad de Alzheimer es la vacunación (Gurwitz D, Immunization for Alzheimer's disease: yet closer to clinical trials, *Trends Immunol.* 22: 542-543, (2001)) ya que existen sujetos genéticamente predispuestos a padecer la enfermedad y la edad avanzada es un factor de riesgo.

Una serie de proteínas de origen natural tiene actividad trófica hormonal terapéutica y debe administrarse por vía parenteral debido a que son degradadas por el sistema digestivo. La proteína más conocida es la insulina, y la búsqueda de sistemas alternativos de administración continúa desde hace muchos años. Las inyecciones diarias, incluso las inyecciones subcutáneas, tienen dos problemas principales: el paciente tiende a evitarlas (la fidelidad disminuye), reduciendo así la biodisponibilidad, y por tanto, la eficacia terapéutica. Para el caso del factor trófico IGF-I, cuya eficacia terapéutica para un amplio rango de enfermedades está siendo ensayada en la actualidad (Relación de ensayos clínicos que se están realizando en la actualidad en Estados Unidos: http://clinicaltrials.gov/ct/gui/c/a2b/action/GetStudy?JServSessionIdzone_ct=1bfy4qa8h1), se ha observado que las inyecciones subcutáneas repetidas a lo largo del día son más eficaces que una sola inyección (Woodal SM, Breier BH, O'Sullivan U, Gluckman PD. The effect of the frequency of subcutaneous insulin-like growth factor I administration on weight gain in growth hormone deficient mice. *Horm Metab Res* 12: 581-584 (1991)), probablemente debido a que los niveles en sangre permanecen elevados por mas tiempo.

Una solución que se está intentando para este problema es el desarrollo de sistemas de liberación prolongada ("depot") de factores tróficos, incluido el IGF-I (Lam XM, Duenas ET, Daugherty AL, Levy N, and Cleland JL "Sustained release of recombinant human insulin-like growth factor-I for treatment of diabetes" *J. Contr. Rel.* 67: 281-292 (2000); Singh M, Shirley B, Bajwa K, Samara E, Hora M, and O'Hagan D, "Controlled release of recombinant insulin-like growth factor from a novel formulation of polylactide-co-glycolide microparticles" *J. Contr. Rel.* 70: 21-28 (2001); Meinel L, Illi OE, Zapf J, Malfanti M, Merkle HP, Gander B, "Stabilizing insulin-like growth factor-I in poly (D,L-lactide-co-glycolide) microspheres" *J. Contr. Rel.* 70: 193-202 (2001)). Las compañías farmacéuticas especializadas en factores tróficos están trabajando en el desarrollo de este tipo de formulación. Estudios previos han demostrado la utilidad de IGF-I formulada en sistemas osmóticos de administración subcutánea de liberación controlada. Estos sistemas producen efectos terapéuticos en algunos procesos patológicos (Fernandez AM, Gonzalez de la Vega A, Torres-Aleman I, "Insulin-like growth factor restores motor coordination in a rat model of cerebellar ataxia". *Proc. Nat. Acad. Sci.* (EE. UU.) 95: 1253-1258 (1998)). Sin embargo, tienen la desventaja de ser voluminosos (y por lo tanto de difícil implantación en seres humanos) y de que es preciso retirar el dispositivo osmótico una vez finalizada la liberación. Con el fin de evitar este inconveniente se pueden desarrollar preparados biodegradables de tamaño reducido y de liberación prolongada. Con este fin se emplean cada vez con más frecuencia copolímeros biodegradables de ácido láctico y ácido glicólico, semejantes a los empleados en la fabricación de hilo de sutura absorbible. Existen distintos copolímeros en los que se puede variar la proporción y viscosidad del ácido poliláctico y del ácido poliglicólico. De esta forma se puede controlar la velocidad de liberación del fármaco, y por consiguiente, prolongar la absorción del fármaco y la duración de sus efectos. Normalmente cuanto mayor sea la proporción del ácido poliláctico en relación con la del ácido poliglicólico, menor es la velocidad de liberación del fármaco. Por otro lado, a mayor viscosidad intrínseca del polímero, menor es la velocidad de liberación. Concretamente, se han publicado recientemente tres trabajos del IGF-I, (Lam XM, Duenas ET, Daugherty AL, Levy N, and Cleland JL "Sustained release of recombinant human insulin-like growth factor-I for treatment of diabetes" *J. Contr. Rel.* 67: 281-292 (2000); Singh M, Shirley B, Bajwa K, Samara E, Hora M, and O'Hagan D, "Controlled release of recombinant insulin-like growth factor from a novel formulation of polylactide-co-glycolide microparticles" *J. Contr. Rel.* 70: 21-28 (2001); Meinel L, Illi OE, Zapf J, Malfanti M, Merkle HP, Gander B, "Stabilizing insulin-like growth factor-I in poly (D,L-lactide-co-glycolide) microspheres" *J. Contr. Rel.* 70: 193-202 (2001)) en los que se utiliza un copolímero de ácido láctico y de ácido glicólico en proporción 50:50 (Resomer 502H de Boehringer Ingelheim). Los procedimientos

de preparación son o bien por atomización, o por la técnica de triple emulsión. En la técnica de triple emulsión se utilizaron distintos sistemas para aumentar el tamaño de las microesferas resultantes. Así, en el trabajo de M. Singh y col. (Singh M, Shirley B, Bajwa K, Samara E, Hora M, and O'Hagan D, "Controlled release of recombinant insulin-like growth factor from a novel formulation of polylactide-co-glycolide microparticles" *J. Contr. Rel.* 70: 21-28 (2001)), se induce un cambio de pH para producir una precipitación parcial de IGF-I, mientras que en el trabajo de L. Meinel y col. (Meinel L, Illi OE, Zapf J, Malfanti M, Merkle HP, Gander B, "Stabilizing insulin-like growth factor-I in poly (D,L-lactide-co-glycolide) microspheres" *J. Contr. Rel.* 70: 193-202 (2001)), se emplean velocidades de agitación lenta y se incorporan proteínas como gelatina y albúmina para obtener de microesferas de gran tamaño. En todos estos sistemas, las microesferas resultantes tienen un diámetro superior a 30 micrómetros, que varía entre 30 y 125 micrómetros dependiendo del trabajo.

Breve descripción

La invención se dirige a nuevas formulaciones terapéuticas de administración lenta de IGF-I, a un procedimiento de preparación y producción de estas formulaciones y a su utilización en la elaboración de medicamentos para el tratamiento y prevención de enfermedades neurodegenerativas como, entre otras, la enfermedad de Alzheimer o la ataxia cerebelar. Estas formulaciones se corresponden con microesferas de diámetro inferior a 5 micrómetros, entre otras características, y con comprimidos de implantación subcutánea.

Descripción detallada

La invención está diseñada para prevenir enfermedades del sistema nervioso debidas a pérdida de neuronas ya sean de origen genético o esporádico. Consiste en la administración por vía subcutánea de una formulación terapéutica de larga duración y biodegradable, que se desarrolla en la presente invención y contiene el factor natural neuroprotector IGF-I. La novedad de esta aplicación es que previene la aparición de los síntomas de la enfermedad neurodegenerativa, como se evalúa en modelos animales de ataxia cerebelar hereditaria y de enfermedad de Alzheimer, y en ratas viejas, mediante la administración periódica de esta formulación de larga duración (véase Ejemplos 2, 3 y 4; Figura 2). Además, la administración de esta formulación se hace muy cómoda (1 ó dos veces al mes) (Figura 1B), y su eficacia terapéutica es mayor que con inyecciones subcutáneas diarias de IGF-I (Figura 1A) ya que los niveles terapéuticos se mantienen mucho más tiempo. Como la vía de administración es subcutánea, se han desarrollado partículas de menor tamaño (menores de 5 micrómetros) ya que pasan con mayor facilidad a través de las agujas de inyección.

Así, un objeto de la presente invención es una formulación o composición terapéutica que contiene el factor natural neuroprotector IGF-I, en adelante formulación terapéutica de la presente invención, que permite la liberación lenta de IGF-I intacto y funcionalmente activo y que está constituida por unas microesferas de copolímeros de alta viscosidad con un diámetro inferior a 5 micrómetros, generalmente entre 1 y 2 micrómetros, y preferiblemente aproximadamente 1,3 micrómetros.

La formulación terapéutica propuesta por esta invención comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de IGF-I junto con un excipiente farmacéuticamente adecuado. Esta formulación terapéutica es útil para su administración y/o aplicación en especies mamíferas, preferiblemente humanos.

La cantidad terapéuticamente efectiva de la formulación de la presente invención que debe administrarse, así como su dosificación para tratar un estado patológico, depende de numerosos factores, entre los que se encuentra la edad, el estado del paciente, la gravedad de la enfermedad, la vía y frecuencia de administración, y otros.

La formulación terapéutica que contiene el IGF-I proporcionado por esta invención se puede suministrar en cualquier forma de administración que se considere adecuada para la administración subcutánea, incluyendo los excipientes farmacéuticamente aceptables necesarios para la formulación de acuerdo con la forma de administración. Una revisión de las formas farmacéuticas de administración de medicamentos y de los excipientes necesarios puede encontrarse en el *Tratado de Farmacia Galénica*, C Fauli i Trillo, 1993, Luzán 5, SA Ediciones, Madrid.

El posible efecto en la velocidad de liberación se ha compensado con la utilización de copolímeros de mayor viscosidad como el Resomer 506 (Boehringer Ingelheim) en lugar del 502H, como se describe en los trabajos previos. Así, se propone el empleo de un copolímero con una viscosidad de 0,8 dl/g, en lugar del descrito en los trabajos citados, que tiene una viscosidad de 0,2 dl/g. Para obtener estas microesferas de menor tamaño se empleó la técnica de triple emulsión. En esta técnica se utiliza como base una solución de IGF-I junto con elevadas velocidades de homogenización, para tener el menor tamaño posible de fase interna en la emulsión. Además, en el procedimiento propuesto en la presente invención se prescinde de la utilización de pH alcalinos (en los que se puede insolubilizar el IGF-I) y de otras proteínas de alto peso molecular (albúmina, gelatina, etc). De esta forma se obtienen microesferas de pequeño tamaño, generalmente entre 1-2 micrómetros, más apropiadas para la administración subcutánea por inyección con agujas.

Un objeto adicional de la presente invención es un procedimiento de preparación y producción de la formulación terapéutica a la que se hace referencia en la presente invención, en adelante procedimiento de la presente invención, basado en la técnica de triple emulsión y extracción de solvente como sigue:

- Los copolímeros utilizados son de alta viscosidad entre 0,5 dl/g y 1,5 dl/g, preferiblemente 0,8 dl/g,

ES 2 287 500 T3

- Se utilizan elevadas velocidades de homogenización, preferiblemente a 13.500 rpm
- Las soluciones utilizadas presentan un pH no alcalino, y
- Se prescinde de proteínas de alto peso molecular, tales como albúmina y gelatina.

Un objeto particular de la presente invención es el procedimiento de la invención donde el copolímero es, entre otros, un copolímero de ácido láctico y de ácido glicólico 50:50 (PLGA 50:50).

Otro objeto de la presente invención es la formulación terapéutica obtenida por el procedimiento de la presente invención.

Como referencia y ejemplo no limitativo de la técnica de triple emulsión se presentan los trabajos publicados de Lam y col., Singh y col. y Meinel y col. (Lam XM, Duenas ET, Daugherty AL, Levy N, y Cleland JL "Sustained release of recombinant human insulin-like growth factor-I for treatment of diabetes" *J. Contr. Rel* 67: 281-292 (2000); Singh M, Shirley B, Bajwa K, Samara E, Hora M, and O'Hagan D, "Controlled release of recombinant insulin-like growth factor from a novel formulation of polylactide-co-glycolide microparticles" *J. Contr. Rel.* 70: 21-28 (2001); Meinel L, Illi OE, Zapf J, Malfanti M, Merkle HP, Gander B, "Stabilizing insulin-like growth factor-I in poly (D,L-lactide-co-glycolide) microspheres" *J. Contr. Rel.* 70: 193-202 (2001)).

Por otro lado, tal y como se indicaba en la introducción, estas microesferas de copolímeros de ácido láctico y ácido glicólico también se pueden preparar por expertos en la materia a través del procedimiento de triple emulsión y extracción de solvente y a través de la técnica de atomización, entre otras, que es por lo que las formulaciones terapéuticas de la presente invención preparadas y obtenidas usando estas técnicas forman parte de la presente invención. El procedimiento de atomización para la preparación de microesferas se ha descrito en numerosos trabajos, tales como los siguientes: P. Johansen, E. Estévez, R. Zurbriggen, H.P. Merkle, R. Gluck, G. Corradin y B. Gander. Towards clinical testing of a single-administration tetanus vaccines based on PLA/PLGA microspheres. *Vaccine*. 2000. 19(9-10): 1047-54; P. Johansen, Y. Men, R. Audran, G. Corradin, H.P. Merkle y B. Gander. Improving stability of microencapsulated tetanus toxoid by co-encapsulation of additives. *Pharmaceutical Research*. 1998. 15(7): 1103-10; S. Takada, Y. Uda, H. Toguchi y Y. Ogawa. Application of a spray-drying technique in the production of THR-containing injectable sustained-release microparticles of biodegradable polymers. *PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology*. 1995. 49(4): 180-4; F. Pavanetto, I. Genta, P. Giunchedi y B. Conti. Evaluation of spray drying as a method for polylactide and polylactide-co-glycolide microsphere preparation. *Journal of Microencapsulation*. 1993. 10(4):487-97; B. Bittner y T. Kissel. Ultrasonic atomization for spray drying: a versatile technique for the preparation of protein loaded biodegradable microspheres. *Journal of Microencapsulation*. 1999. 16(3): 325-341.

Tanto las microesferas como los comprimidos se administran periódicamente por inyección o implantación subcutánea. La eficacia protectora frente a la enfermedad neurodegenerativa se mantiene de manera prolongada: esta formulación se ha administrado durante casi 5 meses a ratones pcd que padecen neurodegeneración hereditaria y éstos no han desarrollado la enfermedad neurodegenerativa hereditaria en todo este tiempo. Es decir, que mientras se administra el fármaco, la enfermedad no aparece, pero si se interrumpe la administración, la enfermedad reaparece. En las etapas iniciales de la enfermedad, la re-administración del producto provoca la desaparición de los síntomas de la enfermedad (Figura 2A). Por otro lado, la administración de la formulación terapéutica de microesferas a ratones transgénicos enfermos de Alzheimer y en ratas viejas disminuyó los síntomas asociados a dicha enfermedad, como son, entre otros, los depósitos de beta-amiloide y las lesiones glióticas reactivas (véase Ejemplos 3 y 4, Figura 2).

La presente invención describe la utilización de cualquiera de estas formulaciones en la preparación de medicamentos para el tratamiento y prevención de enfermedades neurodegenerativas como, entre otras, enfermedad de Alzheimer, ataxia cerebelar, ataxia-telangiectasia, demencia vascular, esclerosis múltiple, ictus, neuropatías periféricas y trauma cerebral o espinal. Así, un objeto de la presente invención es la utilización de la formulación terapéutica de la presente invención en la preparación o producción de medicamentos para el tratamiento y prevención de enfermedades neurodegenerativas como, entre otras, enfermedad de Alzheimer, ataxia cerebelar, ataxia-telangiectasia, demencia vascular, esclerosis múltiple, ictus, neuropatías periféricas y trauma cerebral o espinal.

Además de estas pequeñas microesferas, los comprimidos de implantación subcutánea se han desarrollado con el fin de obtener preparados con efectos de muy larga duración (véase Ejemplo 1c), en adelante comprimidos de la presente invención, de los cuales no se han encontrado referencias, ni datos de estudios previos por otros autores. Así, un objeto adicional de la presente invención es este comprimido para la liberación prolongada del IGF-I.

Un objeto adicional de la presente invención es el procedimiento para la preparación y producción del comprimido de la presente invención basado en la siguiente técnica:

- El IGF-I se disuelve en ácido acético 0,01 mM,
- A esta solución se le añade ciclosporina,
- Esta mezcla se añade al copolímero de ácido láctico y ácido glicólico (Resomer 503 H de Boehringer Ingelheim) y se amasa suavemente, pasando a continuación el producto a través de una malla de 2 mm,

- Se deja secar a temperatura ambiente durante tres horas y se vuelve a pasar a través de una malla de 2 mm, y
- Se deja secar otras 15 horas a temperatura ambiente y se comprime con punzones cóncavos de 6 mm de diámetro.

5

Finalmente, un objeto adicional de la presente invención lo constituye la utilización del comprimido de la presente invención en la elaboración o preparación de medicamentos para el tratamiento y prevención de enfermedades neurodegenerativas como, entre otras, enfermedad de Alzheimer, ataxia cerebelar, ataxia-telangiectasia, demencia vascular, esclerosis múltiple, ictus, neuropatías periféricas y trauma cerebral o espinal.

10

Descripción de los dibujos

Figura 1.- Los niveles de IGF-I en sangre tras una única inyección subcutánea de IGF-I (A) se mantienen elevados durante menos de 24 horas, mientras que tras la inyección subcutánea (sc) de microesferas de IGF-I (B), los niveles de IGF-I se mantienen elevados durante al menos 2 semanas.

15

Figura 2.- Efecto preventivo del tratamiento con depósitos de IGF-I en enfermedades neurodegenerativas en A) Ratones con ataxia cerebelar hereditaria tratados con microesferas de IGF-I (▲), con comprimidos de IGF-I (■) y el grupo control sin tratamiento (microesferas vacías) (●) El grado de coordinación motora se valora con el test de "rotarod" descrito en Fernández y col. (1998) B) Ratas viejas tratadas con microesferas de IGF-I en las que se valoró la amiloidosis asociada a neurodegeneración durante el envejecimiento normal de los animales mediante inmunotinción de la proteína GFAP, C) Ratas viejas tratadas con microesferas de IGF-I en las que se valoró la amiloidosis asociada a neurodegeneración durante el envejecimiento normal de los animales mediante la determinación de los niveles de la proteína GFAP en el cerebro (corteza), y D) Ratas viejas tratadas con microesferas de IGF-I en las que se valoró la amiloidosis asociada a neurodegeneración durante el envejecimiento normal de los animales mediante la determinación de los niveles de beta-amiloide en el cerebro (corteza) y líquido cefalorraquídeo (CSF).

20

25

Ejemplos

30

Ejemplo 1

Elaboración y administración de preparaciones de IGF-I

35

Ejemplo 1a

Inyección subcutánea de IGF-I (Figura 1A)

Se disuelve IGF-I humano recombinante (rhIGF-I) liofilizado (GroPep, Australia) en solución salina (NaCl al 0,9%) para obtener una concentración de 500 µg/100 µl. Ratas Wistar adultas de 300 g de peso (n=6 por cada tiempo de recogida) reciben una única inyección subcutánea (en la escápula) de 100 µl. Para la valoración del IGF-I en suero por radioinmunoensayo (I. Torres-Aleman, S. Pons, L.M. García-Segura. Climbing fiber deafferentation reduces insulin-like growth factor I (IGF-I) content in cerebellum. *Brain Res.* 564: 348-351 (1991); S Pons and I Torres-Aleman Basic fibroblast growth factor modulates insulin-like growth factor-I, its receptor, and its binding proteins in hypothalamic cell cultures. *Endocrinology* 131: 2271-2278 (1992)), se extrae sangre tras la anestesia y se sacrifican los animales a distintos tiempos tras la inyección del IGF-I.

45

Como se describe en la Figura 1A una inyección subcutánea única de IGF-I (1,8 mg/kg) en ratas adultas provocó un rápido incremento de los niveles de IGF-I aunque estos se mantuvieron así durante menos de 24 horas (Figura 1A).

50

Ejemplo 1b

Elaboración de microesferas de IGF-I

La preparación de las microesferas de IGF-I se realizó mediante una modificación del procedimiento descrito anteriormente de triple emulsión y extracción de solvente A/O/A (Singh M, Shirley B, Bajwa K, Samara E, Hora M, and O'Hagan D (2001) Controlled release of recombinant insulin-like growth factor from a novel formulation of polylactide-co-glycolide microparticles. *J.Control Release* 70: 21-28) que permite la liberación eficaz de un IGF-I intacto y biológicamente activo (Meinel L, Illi OE, Zapf J, Malfanti M, Peter MH, and Gander B (2001) Stabilizing insulin-like growth factor-I in poly(D,L-lactide-co-glycolide) microspheres. *J.Control Release* 70: 193-202). El procedimiento comienza con 40 mg de IGF-I que se disuelven en 100 microlitros de ácido acético 0,01 mM. A esta disolución se le añaden 0,7 ml de fosfato monosódico 10 mM (pH 6,0) conteniendo 10,5 mg de Tween 20 (Serva, Alemania). Paralelamente se disolvieron 500 mg del copolímero de ácido láctico y ácido glicólico 50:50 (PLGA 50:50, Resomer[®] 506, Alemania), con una viscosidad inherente de 0,8 dl/g, en 10 ml de cloruro de metileno, que se mezcla con la fase acuosa de IGF-I. La emulsión se homogeniza a 13.500 rpm utilizando un Polytron[®] durante 2 minutos, para obtener la primera emulsión binaria A/O de pequeño tamaño de partícula. Posteriormente, se añade dicha emulsión a una solución de 400 ml de tampón PBS, pH 7,4, formado para 1 litro con 6,8 g de fosfato monopotásico y 195,5 ml de solución de NaOH 0,2M. Este tampón PBS contiene 8 g de alcohol polivinílico (alcohol polivinílico 15000, Fluka,

65

ES 2 287 500 T3

Suiza). Al verter la primera emulsión sobre la solución de PBS y después de agitar enérgicamente con un homogeneizador a 13.500 rpm durante 2 minutos (Ultraturrax®), se obtiene una triple emulsión A/O/A. Esta triple emulsión se mantiene en agitación suave (700 rpm) durante 4 horas mientras se evapora el cloruro de metileno, formándose así las microesferas. Posteriormente, las microesferas se recuperan mediante una centrifugación a 6.000 rpm durante 20 minutos y se decanta el sobrenadante. A continuación, las microesferas se lavan con agua desionizada y de nuevo se centrifugan y decantan. El proceso de lavado se repite tres veces. Por último, las microesferas se liofilizan y se refrigeran (4°C) hasta su utilización.

La carga de rhIGF-I en las microesferas se determinó mediante la disolución de 10 mg de microesferas en 1 ml de NaOH 1N que se agitó durante toda la noche a temperatura ambiente. La concentración proteica se valoró mediante absorción UV a 284 nm, utilizando un coeficiente de extinción de $1.043 \text{ (mg/ml)}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ para rhIGF-I en NaOH 1N. El tamaño de la microesfera se determinó mediante difracción laser (Galai® Cis-1). Las muestras diluidas de varios lotes fueron corridas por triplicado, y se estimó para cada lote el diámetro medio. La morfología de la microesfera se analizó mediante microscopía electrónica (JEOL 6400). Las microesferas resultantes tienen un tamaño medio de partícula de $1,3 \pm 1$ micrómetros, y una riqueza del 5%. El porcentaje de encapsulación fue del 70%.

La administración subcutánea de estas microesferas de IGF-I a ratas adultas (5 mg/kg) provocó que los niveles en sangre de IGF-I se mantuvieran elevados durante al menos de 2 semanas (Figura 1B). El diámetro relativamente pequeño de estas microesferas facilitó la inyección de esta suspensión a través de una aguja 23 G.

Ejemplo 1c

Elaboración de comprimidos de implantación de IGF-I

Para preparar un lote de 10 comprimidos se pesan 15 mg de IGF-I (GroPep, Australia) que posteriormente se disuelven en 1,5 ml de ácido acético 0,01 mM. A esta solución se le añaden 30 mg de ciclosporina que queda en suspensión. Esta mezcla se añade a 455 mg de copolímero de ácido láctico y ácido glicólico (Resomer 503 H de Boehringer Ingelheim) y se amasa suavemente, pasando a continuación el producto a través de una malla de 2 mm. Se deja secar a temperatura ambiente durante tres horas y se vuelve a pasar a través de una malla de 2 mm. Se deja secar otras 15 horas a temperatura ambiente y se comprime con punzones cóncavos de 6 mm de diámetro, ajustando el peso de los comprimidos a 50 mg. De esta forma se obtienen comprimidos biconvexos de 6 mm de diámetro y 3 mm de espesor, 50 mg de peso y que tienen un contenido de 1,5 mg de IGF-I por comprimido. Estos comprimidos se implantan mediante una pequeña incisión sin necesidad de anestesia debajo de la piel de los ratones pcd; al ser de material biodegradable no necesitan ser retirados.

Ejemplo 2

Tratamiento de ratones con degeneración hereditaria del cerebelo (Purkinje cell degeneration) mediante microesferas y comprimidos de implantación de IGF-I

En ratones de dos meses de edad con ataxia cerebelar hereditaria (ratones pcd "Purkinje cell degeneration", Jackson Labs) que manifiestaban señales de la enfermedad al mes de vida (descoordinación motora que lleva a la muerte prematura) se administraron microesferas de IGF-I por inyección subcutánea a una dosis de 100 $\mu\text{g/kg}$ una vez cada dos semanas tras dos primeras dosis de 50 $\mu\text{g/kg}$ y 75 $\mu\text{g/kg}$ (Figura 2A). Para determinar la regresión o no de los síntomas con el tratamiento se evaluó su capacidad motora una vez por semana en el test de rota-rod (A.M. Fernandez, A. Gonzalez de la Vega, I. Torres-Aleman. Insulin-like growth factor restores motor coordination in a rat model of cerebellar ataxia. *Proc. Nat. Acad. Sci.* (EE. UU.) 95: 1253-1258 (1998)). El experimento se realizó en dos lotes independientes de 6 ratones cada vez. El resultado fue que los ratones mostraron un grado normal de coordinación de movimientos mientras se mantuvo el tratamiento (100 días) con las microesferas (Figura 2A, línea con triángulos) o con comprimidos (Figura 2A, línea con cuadrados), en comparación con los resultados en ratones sanos (los ratones tratados presentaron valores de coordinación motora máxima de casi 300 segundos de forma similar a los resultados en ratones sanos (datos no mostrados)) mientras que en el grupo control no desaparecieron los síntomas de ataxia (valores de coordinación motora máxima del orden de 200-240 segundos).

Hay que indicar que mientras se administraba una dosis de IGF-I, ya sea mediante microesferas o comprimidos, la disminución de los niveles de IGF-I se correlacionaba con la pérdida de la capacidad de coordinación motora. Cuando se administraban nuevas dosis de IGF-I (tras la segunda dosis (14 días) y tercera dosis (28 días) de las microesferas y tras la nueva reimplantación del comprimido (70 días) los síntomas de la enfermedad vuelven a desaparecer. Nótese también que la eficacia del tratamiento con las microesferas depende de la dosis administrada (Figura 2A) de tal forma que no se observa disminución de la coordinación motora con la dosis de 100 $\mu\text{g/kg}$ al contrario que con las dosis iniciales de 50 $\mu\text{g/kg}$ y 75 $\mu\text{g/kg}$.

Ejemplo 3

Tratamiento de ratones transgénicos con enfermedad similar a Alzheimer usando microesferas IGF-I

En ratones transgénicos de 10 meses de edad que presentan un exceso de beta-amiloide por transgénesis del gen de APP humano mutado (ratones Tg2576, véase Hsiao y col., 1996 (Hsiao K, Chapman P, Nilsen S, Eckman C, Harigaya

Y, Younkin S, Ynag F, Cole G. Correlative memory deficits, Abeta elevation, and amyloid plaques in transgenic mice. *Science*. 274: 99-102, (1996)), mantenidos en condiciones normales de estabulación: ciclos de 12 horas de luz-oscuridad y agua y comida *ad libitum*) se administraron microesferas de IGF-I durante un mes y posteriormente se valoraron los niveles de beta-amiloide cerebral mediante Western blot. Los niveles de beta-amiloide (β A) (como se determina mediante la evaluación por densitometría las bandas obtenidas por Western blot) en la corteza e hipocampo de los ratones transgénicos sin tratar eran de 7 y 25 veces más altos que los encontrados en sus hermanos no enfermos (*hmutAPP^{-/-}*) mientras que los ratones transgénicos tratados con IGF-I presentaron niveles de β A iguales a los animales no enfermos ($p < 0,01$ frente a Tg2576 sin tratar).

10 Ejemplo 4

Prevención de la enfermedad de Alzheimer (prevención de la amiloidosis en cerebro) en ratas viejas con microesferas IGF-I

15 En ratas Wistar viejas de 18 meses de edad, mantenidas en condiciones normales de luz y comida, se administraron las microesferas de IGF-I durante 1 mes y se determinó la aparición de lesiones glióticas en el parénquima cerebral (corteza frontal) mediante la inmunotinción de la proteína GFAP (Lee, CK, Weindruch, R & Prolla, TA. Gene-expression profile of the ageing brain in mice. *Nature Genet* 25, 294-297 (2000)) (Figura 2b). Se determinaron los niveles de la proteína GFAP (Figura 2c) y niveles beta-amiloide en cerebro (corteza) y líquido cefalorraquídeo (CSF) (Vaucher, E. y col. Amyloid β peptide levels and its effects on hippocampal acetylcholine release in aged, cognitively impaired and unimpaired rats. *J Chem Neuroanat* 21, 323-329 (2001)) (Figura 2dD) mediante Western blot. Los elevados niveles de proteína GFAP o de péptido beta-amiloide en el cerebro y/o bajos niveles de péptido beta-amiloide en el líquido cefalorraquídeo son síntomas de la amiloidosis asociada a la neurodegeneración de Alzheimer. Todos estos parámetros fueron similares entre las ratas viejas tratadas con IGF-I y las ratas adultas, mientras que en estos dos casos anteriores 20 los niveles eran menores que los observados en ratas viejas no tratadas (Figura 2b, 2c y 2d). Hay que indicar que los niveles beta-amiloide en CSF se incrementaron en ratas viejas tratadas con IGF-I por aclaración beta-amiloide (Figura 2d, panel inferior).

Materiales y procedimientos

30 *Animales*. Las ratas Wistar adultas y viejas (250-350 g), los ratones transgénicos Tg2576, los ratones macho y hembra pcd (Purkinje cell degeneration) cruzados endogámicamente, y las camadas de ratones no atáxicos agrupados por edad y sexo conjuntamente con ratones C57, como grupo control, fueron utilizados de acuerdo con la Directiva EU 86/609/CEE. Los animales se mantuvieron bajo condiciones normales de laboratorio.

35 *Reactivos*. 125 INa (Amersham, Gran Bretaña) se utilizó para iodinar rhIGF-I. A menos que se diga lo contrario, el resto de reactivos utilizados en la presente invención provienen de Sigma (EE. UU.) o de Merck (España).

40 *Diseño experimental del análisis de IGF-I en sangre*: Las múltiples muestras de sangre tomadas a cada animal se realizaron en ratas adultas y se determinaron los niveles de IGF-I en suero antes y después de la administración subcutánea (sc) de rhIGF-I. Dependiendo del peso de las ratas se prepararon las dosis de microesferas (50 μ g/kg) como una suspensión en una solución salina estéril para su inmediata administración *in bolus*. Otro grupo de ratas recibió una inyección subcutánea de *bolus* convencional de una solución de 1,8 mg/kg de rhIGF-I. En todos los casos las muestras de sangre se tomaron a través de la vena subclavia a diferentes tiempos tras la inyección. Las relativas 45 altas dosis utilizadas permitieron asegurar su detección en el suero tras su inyección. Debido a que es difícil de realizar múltiples extracciones de muestras sanguíneas en ratones, las muestras se obtuvieron de diferentes ratones en distintos momentos. Debido a que los ratones pcd son difíciles de criar, únicamente se emplearon para determinar la eficacia terapéutica de las microesferas de IGF-I.

50 Para minimizar la interferencia con IGF-BPs las muestras de suero se extrajeron usando cartuchos C₁₈. (Millipore, EE. UU.) mientras que las muestras de tejido se hirvieron en ácido acético 1N durante 30 minutos tal como los inventores han descrito anteriormente (Pons S and Torres-Aleman I (1992) Basic fibroblast growth factor modulates insulin-like growth factor-I, its receptor, and its binding proteins in hypothalamic cell cultures. *Endocrinology* 131: 2271-2278).

55

60

65

ES 2 287 500 T3

REIVINDICACIONES

5 1. Formulaci3n terap3utica que contiene el factor natural neuroprotector IGF-I que permite la liberaci3n lenta de IGF-I intacto y funcionalmente activo, **caracterizada** porque est3 constituida por unas microesferas de cop3lmeros de alta viscosidad, de 0,5 dl/g a 1,5 dl/g y con un di3metro inferior a 5 micr3metros.

2. Formulaci3n terap3utica seg3n la reivindicaci3n 1, **caracterizada** porque las microesferas de cop3lmeros presentan una viscosidad de 0,8 dl/g y un di3metro de aproximadamente 1,3 micr3metros.

10 3. Procedimiento para la preparaci3n y producci3n de la formulaci3n terap3utica seg3n las reivindicaciones 1 y 2 mediante la t3cnica de triple emulsi3n y extracci3n de solvente, **caracterizado** porque se realiza de la siguiente forma:

- Los cop3lmeros utilizados son de alta viscosidad, entre 0,5 dl/g y 1,5 dl/g, preferiblemente 0,8 dl/g,
- 15 - Se utilizan elevadas velocidades de homogenizaci3n, preferiblemente a 13.500 rpm,
- Las soluciones utilizadas presentan un pH no alcalino, y
- 20 - Se prescinde de otras prote3nas de alto peso molecular, tales como, entre otras, alb3mina y gelatina.

4. Procedimiento para la preparaci3n y producci3n de la formulaci3n terap3utica seg3n la reivindicaci3n 3, **caracterizado** porque el cop3lmero es, entre otros, un cop3lmero de 3cido l3ctico y 3cido glic3lico 50:50 (PLGA 50:50).

25 5. Uso de la formulaci3n terap3utica seg3n las reivindicaciones 1 y 2 en la elaboraci3n o preparaci3n de productos medicinales para el tratamiento y prevenci3n de enfermedades neurodegenerativas como, entre otras, enfermedad de Alzheimer, ataxia cerebelar, ataxia-telangiectasia, demencia vascular, esclerosis m3ltiple, ictus, neuropat3as perif3ricas y trauma cerebral o espinal.

30 6. Comprimido con una capacidad de liberaci3n prolongada de IGF-I, **caracterizado** porque se prepara mediante un procedimiento basado en la siguiente t3cnica:

- El IGF-I se disuelve en 3cido ac3tico 0,01 mM,
- 35 - A esta soluci3n se le a3ade ciclosporina y permanece en suspensi3n,
- Esta mezcla se a3ade al cop3lmero de 3cido l3ctico y 3cido glic3lico (Resomer 503 H, Boehringer Ingelheim) y se amasa suavemente, pasando a continuaci3n el producto a trav3s de una malla de 2 mm,
- 40 - Se deja secar a temperatura ambiente durante tres horas y se vuelve a pasar a trav3s de una malla de 2 mm,
- Se deja secar otras 15 horas a temperatura ambiente y se comprime con punzones c3ncavos de 6 mm de di3metro.

45 7. Uso de un comprimido seg3n la reivindicaci3n 6 en la elaboraci3n o preparaci3n de productos medicinales para el tratamiento y prevenci3n de enfermedades neurodegenerativas como, entre otras, enfermedad de Alzheimer, ataxia cerebelar, ataxia-telangiectasia, demencia vascular, esclerosis m3ltiple, ictus, neuropat3as perif3ricas y trauma cerebral o espinal.

50

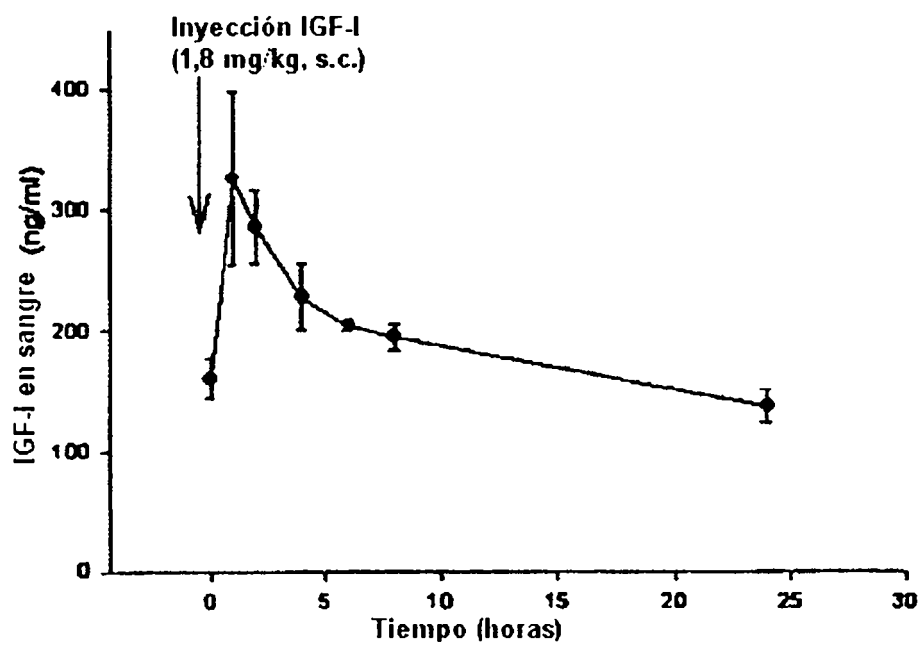
55

60

65

A

Inyección única de IGF-I (s.c.) en ratas



B

microesferas IGF-I en ratas

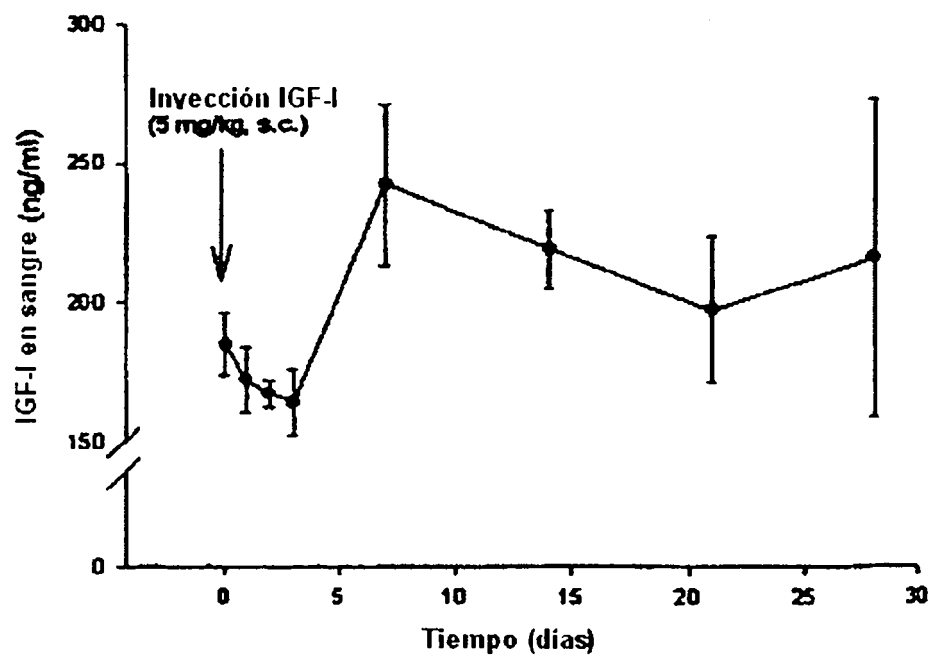


FIGURA 1

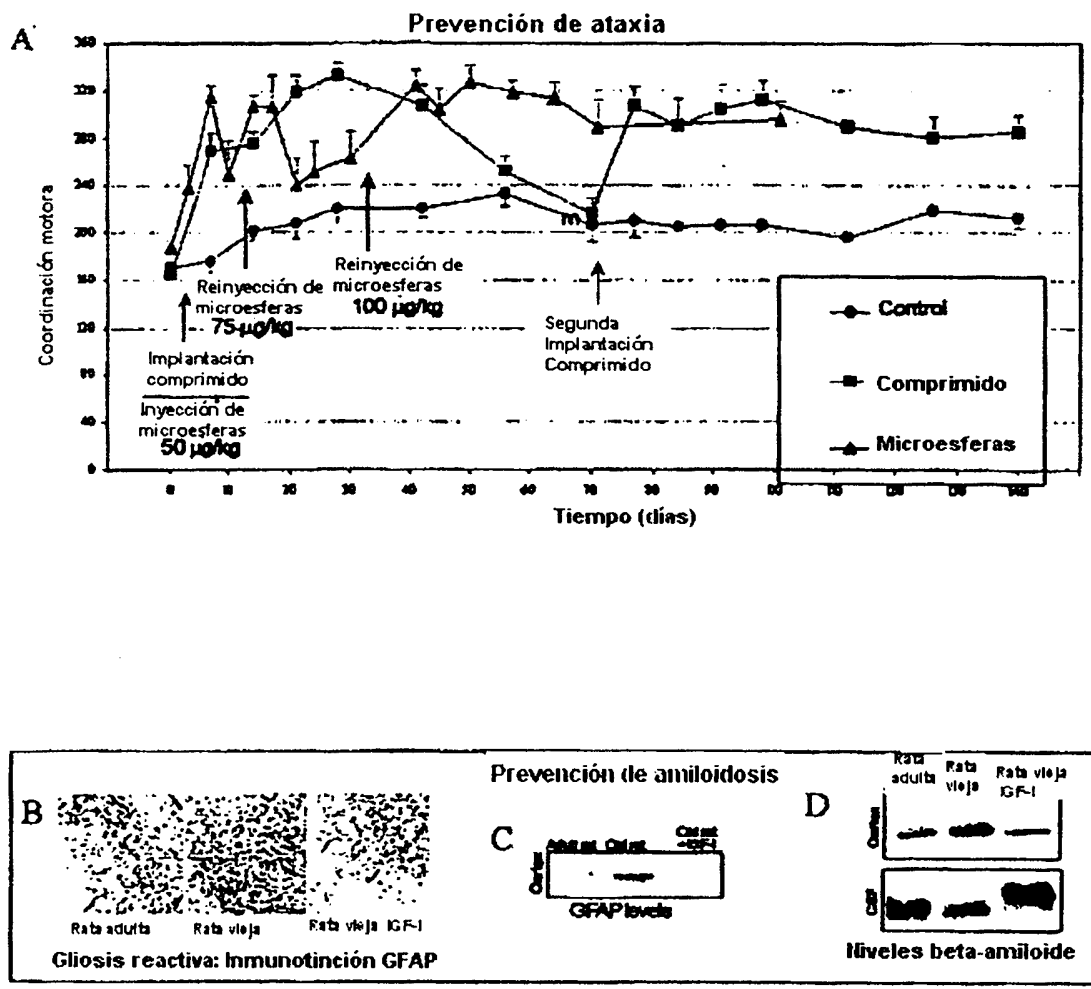


FIGURA 2