



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 207 387**

⑫ Número de solicitud: 200200491

⑬ Int. Cl.⁷: **A61K 38/30**

⑭

SOLICITUD DE PATENTE

A1

⑮ Fecha de presentación: **28.02.2002**

⑯ Fecha de publicación de la solicitud: **16.05.2004**

⑰ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
16.05.2004

⑱ Solicitante/s:
**Consejo Superior de Investigaciones Científicas
c/ Serrano, 117
28006 Madrid, ES
Universidad Complutense de Madrid**

⑲ Inventor/es: **López López, Cristina;
Carro Díaz, Eva María;
Torres Alemán, Ignacio;
Torrado, Juan;
Carrascosa, Celia y
Torrado, Santiago.**

⑳ Agente: **No consta**

㉑ Título: **Composición química de IGF-I para el tratamiento y prevención de enfermedades neurodegenerativas.**

㉒ Resumen:

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

La invención se refiere a la preparación y obtención de nuevas composiciones químicas de administración lenta de IGF-I. Estas composiciones se corresponden con microesferas de tamaño menor de 5 micrómetros, entre otras características, y con cápsulas de implantación subcutánea. La presente invención describe además la utilización de cualquiera de estas composiciones en la preparación de medicamentos para el tratamiento y prevención de enfermedades neurodegenerativas como, entre otras, la enfermedad de Alzheimer o la ataxia cerebelar.

ES 2 207 387 A1

DESCRIPCIÓN

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

Sector de la técnica

La invención se refiere a la preparación y obtención de nuevas composiciones (microesferas y cápsulas) de administración de principios activos, entre otros, IGF-I, y su utilización en el tratamiento y prevención de enfermedades neurodegenerativas como, entre otras, la enfermedad de Alzheimer o la ataxia cerebelar.

Estado de la técnica

En la actualidad no existe ninguna droga o método que proteja frente a enfermedades neurodegenerativas. Este tipo de enfermedades están creciendo en importancia en los países desarrollados debido al paulatino envejecimiento de la población ya que muchas de ellas están asociadas a la edad (1). 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 (2), no existe de momento ningún tratamiento efectivo, con lo que su prevención es de extrema importancia. El hecho de que muchas de ellas tengan un claro componente hereditario permite que se pueda predecir si se va 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 ésta haga su aparición. Por ejemplo, un sistema preventivo que está a punto de ensayarse en poblaciones de riesgo para el Alzheimer es la vacunación (3) ya que existen sujetos genéticamente predispuestos a padecerlo y la edad avanzada es un factor de riesgo.

Existen una serie de proteínas de origen natural con actividad trófica hormonal terapéutica que han de ser administradas por vía parenteral debido a que son degradadas por el sistema digestivo. La más conocida es la insulina, de la que se están intentando desarrollar sistemas alternativos de administración desde hace muchos años. La administración diaria por inyección, aunque sea subcutánea, tiene dos problemas principales: el paciente tiende a evitarla (la fidelidad disminuye), y la biodisponibilidad, y por tanto la eficacia terapéutica puede verse reducida. Para el caso del factor trófico IGF-I, cuya eficacia terapéutica para un amplio rango de enfermedades está siendo ensayada en la actualidad (4), se ha observado que la administración repetida a lo largo del día por vía subcutánea es mas eficaz que una única inyección (5), 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 (6-8). Las compañías farmacéuticas especializadas en factores tróficos están dedicando grandes esfuerzos a desarrollar 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 (9). Sin embargo, dichos sistemas tienen la desventaja de ser muy voluminosos (y por lo tanto de difícil implantación en seres humanos) y de que es preciso retirar el dispositivo osmótico una vez fina-

lizada la liberación. Con el fin de evitar este inconveniente se pueden fabricar 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 glicólico, semejantes a los empleado en la fabricación de hilo de sutura reabsorbible. Existen distintos copolímeros en los que se pueden variar las proporciones de poliláctico y poliglicólico y la viscosidad de los mismos. De esta forma se puede controlar la velocidad de cesión del fármaco incorporado, y consecuentemente prolongar su absorción y la duración de sus efectos. Normalmente cuanto mayor sea la proporción de poliláctico en relación a la de poliglicólico, menor es la velocidad de cesión. Por otro lado, a mayor viscosidad intrínseca del polímero, menor es la velocidad de liberación. Concretamente, con el IGF-I, se han publicado recientemente tres trabajos (6-8) en los que se utiliza el copolímero de ácido láctico y glicólico en proporción 50:50 (Resomer 502H de la empresa 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., se induce un cambio de pH que produce una precipitación parcial de IGF-I, mientras que en el trabajo de L. Meinel y col., se emplean velocidades de agitación lenta y se incorporan proteínas como gelatina y albúmina que van a dar lugar a la obtención de microesferas de gran tamaño. En todos estos sistemas descritos las microesferas resultantes tienen un tamaño superior a 30 micrómetros, concretamente entre 30 y 125 micrómetros que varía dependiendo del trabajo.

Referencias

1. **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).
2. **Heintz N, and Zoghbi HY**, Insights from mouse models in to the molecular basis of neurodegeneration, *Annu. Rev. Physiol.*, 62: 779-802 (2000).
3. **Gurwitz D**, Immunization for Alzheimer's disease: yet closer to clinical trials, *Trends Immunol.* 22: 542-543, (2001).
4. 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
5. **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).
6. **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).
7. **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).
8. **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).
9. **Fernández AM, González de la Vega A**,

Torres-Alemán I, "Insulin-like growth factor restores motor coordination in a rat model of cerebellar ataxia". *Proc. Nat. Acad. Sci. (USA)* 95: 1253-1258 (1998).

Descripción

Breve descripción

La invención se refiere a la preparación y obtención de nuevas composiciones químicas de administración lenta de IGF-I. Estas composiciones se corresponden con microesferas de tamaño menor de 5 micrómetros, entre otras características, y con cápsulas de implantación subcutánea. La presente invención describe además la utilización de cualquiera de estas composiciones en la preparación de medicamentos para el tratamiento y prevención de enfermedades neurodegenerativas como, entre otras, la enfermedad de Alzheimer o la ataxia cerebelar.

Descripción detallada

La invención va dirigida a 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 de larga duración conteniendo el factor natural neuroprotector IGF-I. La novedad de esta aplicación es que se consigue que los síntomas de enfermedad neurodegenerativa no aparezcan mientras se administre periódicamente la preparación. Además, la administración de este preparado se hace muy cómoda (1 o dos veces al mes), y se consigue una eficacia terapéutica mayor que con inyección diaria ya que los niveles terapéuticos se mantienen mucho más tiempo (Figura 1). 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. El posible efecto en la velocidad de cesión se ha compensado con la utilización de polímeros de mayor viscosidad como el Resomer 506 (Boehringer Ingelheim) en lugar del 502H descrito en los trabajos previos. Así, se propone el empleo de un polímero de 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 emplea la técnica de triple emulsión en la que se utiliza como base una solución de IGF-I y altas velocidades de homogenización, para tener el menor tamaño posible de fase interna en la emulsión. En el método propuesto, se prescinde de la utilización de pH alcalinos (en los que se puede insolubilizar 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. Además de estas pequeñas microesferas, y con el fin de obtener preparados de muy larga duración de efectos se han desarrollado comprimidos de implantación subcutánea, de los cuales no se han encontrado referencias, ni datos de estudios previos por otros autores.

Tanto las microesferas como los comprimidos se administran periódicamente por inyección o implantación subcutánea. La eficacia protectora frente a enfermedad neurodegenerativa se mantiene de manera prolongada: 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, mientras se mantenga la administración, la enferme-

dad no aparece, si se interrumpe la administración, la enfermedad se manifiesta, aunque en estadios iniciales de la enfermedad, la re-administración del producto permite que los síntomas de la enfermedad vuelvan a desaparecer (Figura 2).

La presente invención describe la utilización de cualquiera de estas composiciones en la preparación de medicamentos para el tratamiento y prevención de enfermedades neurodegenerativas como, entre otras, enfermedad de Alzheimer, ataxia cerebelosa, ataxia-telangiectasia, demencia vascular, esclerosis múltiple, ictus, neuropatías periféricas y trauma cerebral o espinal.

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 menos de 24 horas, mientras que tras inyección subcutánea de microesferas de IGF-I (B), éstos se mantienen elevados durante al menos 2 semanas. Figura 2.- Efecto preventivo del tratamiento con depots de IGF-I en enfermedades neurodegenerativas en A) Ratones con ataxia cerebelar hereditaria tratados con microesferas de IGF-I (▲), con cápsulas de IGF-I (■) y el grupo control sin tratamiento (●). El grado de coordinación motora se valora con el test de "rota-rod" descrito en Fernández et al (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 la el envejecimiento normal de los animales mediante la determinación de los niveles de la proteína GFAP en cerebro, y D) Ratas viejas tratadas con microesferas de IGF-I en las que se valoró la amiloidosis asociada a neurodegeneración durante la el envejecimiento normal de los animales mediante la determinación de los niveles de beta-amiloide en cerebro (corteza) y líquido cefalorraquídeo (CSF).

Ejemplos

Ejemplo 1

Elaboración y administración de preparaciones de administración de IGF-I

Ejemplo 1a

Inyección subcutánea de IGF-I (Figura 1A)

Se disuelve IGF-I humano recombinante liofilizado (GroPep, Australia) en suero salino (ClNa 0.9%) a una concentración de 500 µg/100 µl. Ratas Wistar adultas de 300 grs (n=6 por cada tiempo de recogida) reciben una única inyección subcutánea (en la escápula) de 100 µl. Para valoración del IGF-I en suero por radioinmunoensayo (Torres-Alemán, 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)) la sangre se extrae del tronco tras anestesia y decapitación del animal a distintos tiempos tras la inyección del IGF-I.

Ejemplo 1b

Elaboración de microesferas de IGF-I

Se parten de 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. Paralelamente se disolvieron en 500 mg del copolímero de ácido láctico y glicólico (Resomer 506) en 10 ml de cloruro de metileno, que se mezcla con la fase

acuosa de IGF-I. La emulsión se homogeniza a 13500 rpm para obtener una emulsión binaria A/O de pequeño tamaño de partícula. Posteriormente, se añade dicha emulsión a una solución de 400 ml de tampón PBS de 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 tiene incorporado 8 g de alcohol polivinílico. Al incorporar la primera emulsión sobre la solución de PBS y después de agitar energicamente con un homogenizador a 13500 rpm durante 2 minutos, se obtiene una triple emulsión A/O/A. Esta triple emulsión se mantiene en agitación suave (700 rpm) durante 4 horas para que se vaya evaporando el cloruro de metileno, y formándose así las microesferas. Posteriormente, las microesferas se centrifugan a 6000 rpm durante 20 minutos y se decanta el sobrenadante. A continuación 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 conservan en nevera (4°C) hasta su utilización. Las esferas resultantes tienen un tamaño medio de partícula de $1,3 \pm 1$ micrómetros (medida por difracción láser), y una riqueza del 5%. El porcentaje de encapsulación es del 70%.

Ejemplo 1c

Elaboración de cápsulas de implantación de IGF-I

Para preparar un lote de 10 comprimidos se pesan 15 mg de IGF-I 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 glicólico (Resomer 503 H de Boehringer Ingelheim) y se amasa suavemente, pasando a continuación el producto a través de una malla de 2mm de luz. Se deja secar a temperatura ambiente durante tres horas y se vuelve a pasar por la malla anterior. Se deja secar otras 15 horas a temperatura ambiente y se comprime con punzones cóncavos de 6 mm de diámetro, ajustando el peso de las cápsulas a 50 mg. De esta forma se obtienen cápsulas biconvexas de 6 mm de diámetro y 3 mm de espesor de 50 mg y con una riqueza de 1,5 mg de IGF-I por cápsula. Estos comprimidos se implantan mediante una pequeña incisión y sin necesidad de anestesia debajo de la piel de los ratones "pcd".

Ejemplo 2

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

En ratones de dos meses de edad con ataxia cerebelar hereditaria (Purkinje cell degeneration: "pcd") que manifiestan la enfermedad al mes de vida (descoordinación motora que lleva a la muerte prematura) se administraron microesferas de IGF-I por inyección subcutánea a dosis de 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ una vez cada dos semanas (Figura 2A). Para determinar la regresión o no de los síntomas tras este tratamiento se determinó su capacidad motora una vez por semana en el test de rota-rod (A.M. Fernández, A. González de la Vega, I. TORRES-ALEMÁN. Insulin-like growth factor restores motor coordination in a rat model of cerebellar

ataxia. Proc. Nat. Acad. Sci. (USA) 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) e igualmente cápsulas (Figura 2A, línea con cuadrados) mientras que en el grupo control no desaparecieron los síntomas de ataxia.

Hay que indicar que a lo largo del tiempo una vez administrada una dosis de IGF-I, ya sea mediante microesferas o cápsulas, la disminución de los niveles de IGF-I se correlacionan con la pérdida de la capacidad de coordinación motora y que al administrar nuevas dosis de IGF-I (tras la segunda dosis (14 días) y tercera dosis (28 días) de las microesferas y tras la nueva reimplantación de la cápsula (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 $\mu\text{g}/\text{kg}$ al contrario que lo observado con las dosis iniciales de 50 y 75 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

Ejemplo 3

Tratamiento de animales transgénicos enfermos de Alzheimer con 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, ver Hsiao et al., 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 estándar de estabulación: ciclos de 12 horas de luz-oscuridad y agua y comida libre) se administraron microesferas de IGF-I durante un mes y posteriormente se valoraron los niveles de beta-amiloide cerebral. Los niveles de beta-amiloide (βA) en la corteza e hipocampo de los transgénicos sin tratar eran de 7 y 25 veces mas altos que los encontrados en sus hermanos no enfermos (APP-/-) mientras que los tratados con IGF-I presentaron niveles de βA iguales a los animales no enfermos ($p < 0.01$ vs Tg2576 sin tratar).

Ejemplo 4

Prevención de la enfermedad de Alzheimer en ratas viejas con microesferas IGF-I

En ratas Wistar viejas de 18 meses de edad (mantenidas en condiciones estándar de luz y comida) se administraron la microesferas de IGF-I durante 1 mes y determinaron la aparición de lesiones glióticas en el parénquima cerebral mediante la inmunotinción de la proteína GFAP (Figura 2B), la determinación de los niveles de la proteína GFAP (Figura 2C) y la determinación de βA en cerebro y líquido cefalorraquídeo (Figura 2D), todos ellos síntomas de la amiloidosis asociada a la neurodegeneración de Alzheimer. Todos estos parámetros fueron similares entre las ratas tratadas con IGF-I y las ratas adultas, mientras que en estos dos casos anteriores los niveles eran menores que los observados en ratas viejas no tratadas (Figura 2B, 2C y 2D).

REIVINDICACIONES

1. Composición química **caracterizada** porque comprende el principio activo IGF-I y porque es una formulación subcutánea de liberación lenta de dicho principio.

2. Composición según la reivindicación 1 **caracterizado** porque son microesferas con un tamaño menor de 5 micrómetros que comprenden copolímeros con una viscosidad entre 0,5 y 1,5 dl/gr.

3. Composición según la reivindicación 2 **caracterizada** porque, preferentemente, el tamaño de las microesferas es $1,3 \pm 1 \mu\text{m}$.

4. Composición según las reivindicaciones 2 y 3 **caracterizada** porque los copolímeros presentan,

preferentemente, una viscosidad de 0,8 dl/gr.

5. Composición según la reivindicación 1 **caracterizada** porque es una cápsula de implantación subcutánea que comprende copolímeros que permiten su liberación lenta y que al ser de material biodegradable no necesita ser retirada.

6. Utilización de la composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a la 5 en la preparación de medicamentos para la prevención y el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas, entre otras, enfermedad de Alzheimer, ataxia cerebelosa, ataxiatelangiectasia, demencia vascular, esclerosis múltiple, ictus, neuropatías periféricas y trauma cerebral o espinal.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

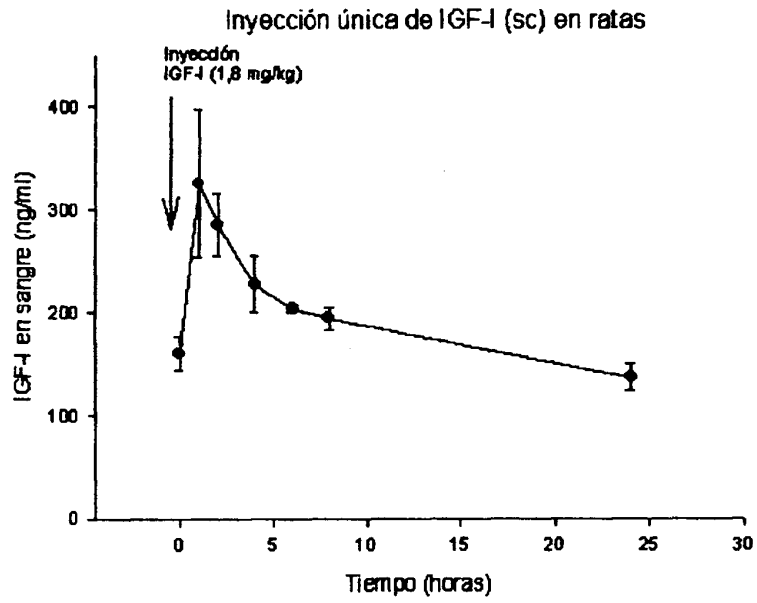
50

55

60

65

A



B

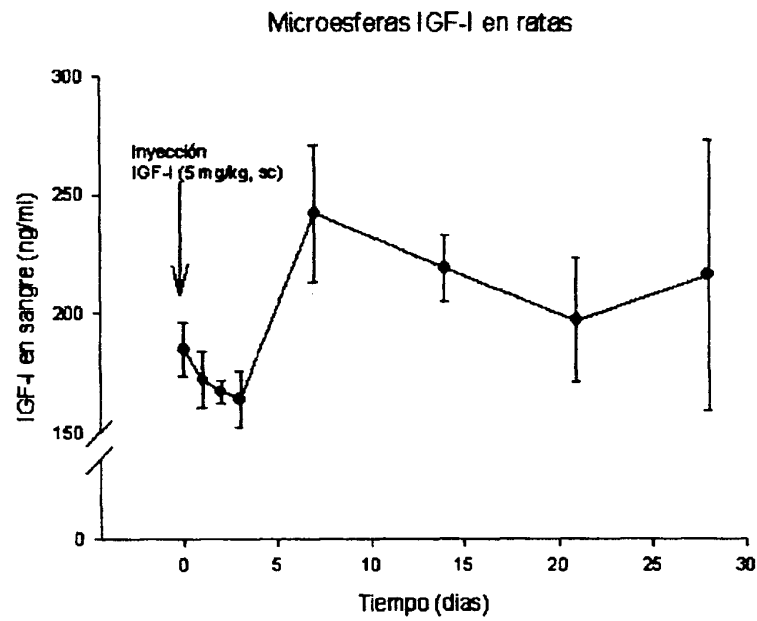


Figura 1

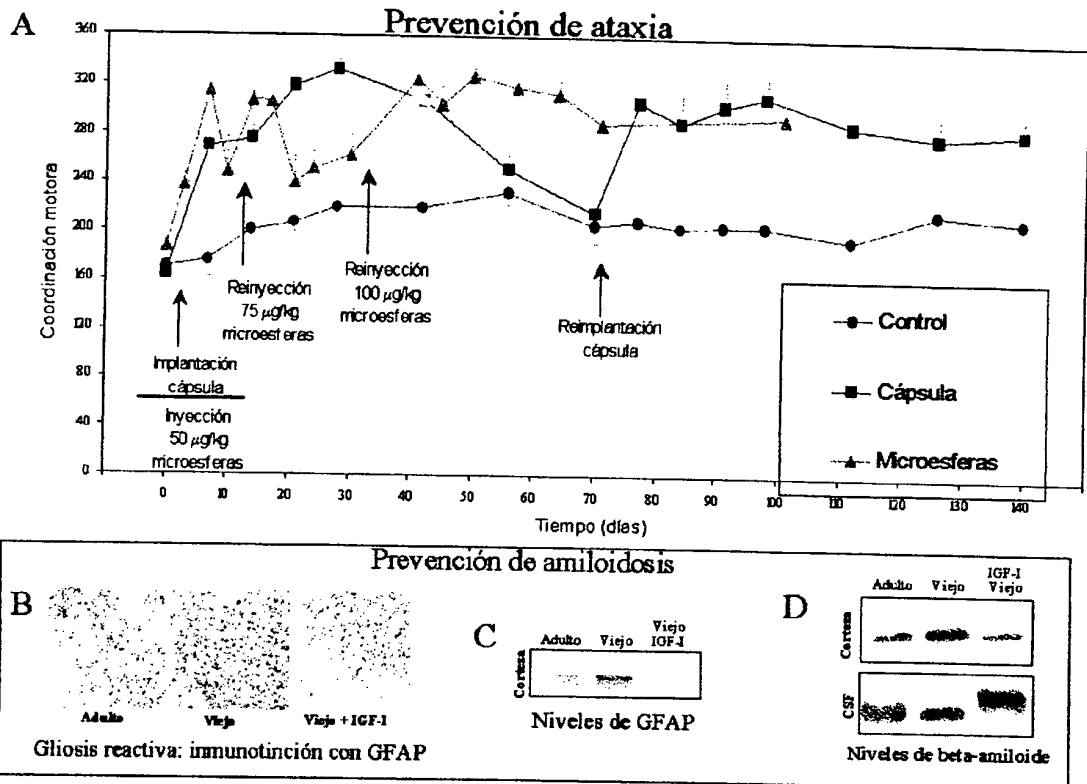


Figura 2



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 207 387

② Nº de solicitud: 200200491

③ Fecha de presentación de la solicitud: 28.02.2002

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.7: A61K 38/30

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	US 5093317 A (MICHAEL E. LEWIS et al.) 03.03.1992, columna 3, línea 63 - columna 4, línea 22.	1,2,6,7
A	US 5633228 A (MICHAEL E. LEWIS et al.) 27.05.1997, todo el documento.	1-5
A	WO 9721442 A1 (COLORADO STATE UNIVERSITY RESEARCH FOUNDATION) 19.06.1997, página 2, líneas 13-22; página 4, líneas 17-27; página 7, líneas 11-19; ejemplo 1.	1-5
A	WO 9933481 A2 (APPLIED RESEARCH ARS HOLDING N.V.) 08.07.1999	3-8
A	A.M. FERNÁNDEZ et al. Neuroprotective Action of Peripherally Administered Insuline-like Growth Factor I in the Injured Olivocerebellar. Rathway European Journal of Neuroscien., Vol. II, páginas 2019-2030. 1999.	

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

15.04.2004

Examinador

M. Ybarra Fernández

Página

1/1