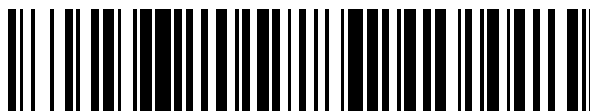


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 527 093**

51 Int. Cl.:

A61K 38/18 (2006.01)
A61K 31/727 (2006.01)
A61K 31/737 (2006.01)
A61K 47/36 (2006.01)
A61P 1/18 (2006.01)
A61P 3/10 (2006.01)
A61P 25/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.06.2007 E 07764869 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.12.2014 EP 2040736**

54 Título: **Nueva formulación para incrementar la biodisponibilidad de la neurturina**

30 Prioridad:

26.06.2006 EP 06013135

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

20.01.2015

73 Titular/es:

EVOTEC INTERNATIONAL GMBH (100.0%)
Essener Bogen 7
22419 Hamburg, DE

72 Inventor/es:

HARDER, FRIEDRICH y
AUSTEN, MATTHIAS

74 Agente/Representante:

LAZCANO GAINZA, Jesús

ES 2 527 093 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

Nueva formulación para incrementar la biodisponibilidad de la neurturina

Campo de la invención

5

La presente invención se refiere a formulaciones con proteínas de factores de crecimiento, particularmente la neurturina como ingrediente activo y excipientes polianiónicos que tienen una biodisponibilidad incrementada.

Antecedentes

10

Las células beta pancreáticas segregan insulina en respuesta a niveles aumentados de glucosa sanguínea. La insulina, entre otras hormonas, juega un papel clave en la regulación del metabolismo energético. La insulina regula el almacenamiento de glucógeno y triglicéridos y la síntesis de proteínas. La insulina estimula la entrada de glucosa a los músculos y células adiposas. En pacientes que sufren diabetes mellitus tipo I o LADA (diabetes autoinmune latente del adulto, Pozzilli & Di Mario, 2001, Diabetes Care. 8:1460-1467) las células beta se destruyen debido al ataque autoinmune. La cantidad de insulina que se produce por los islotes pancreáticos remanentes es demasiado baja, lo que resulta en elevados niveles de glucosa sanguínea (hiperglicemia). En la diabetes tipo II el hígado y las células musculares pierden su capacidad para responder a los niveles sanguíneos normales de insulina (insulino-resistencia). Elevados niveles de glucosa sanguínea (y además elevados niveles de lípidos) a su vez conducen a una alteración de la función de las células beta y a un incremento de la muerte de las mismas. Es interesante que la velocidad de la neogénesis y replicación de las células beta no parecen incrementarse en los diabéticos tipo II, por lo tanto esto con el tiempo causa una reducción en la masa total de células beta. Eventualmente la aplicación de insulina exógena se vuelve necesaria en diabéticos tipo II.

15

20

25

En diabéticos tipo I, en donde las células beta son destruidas por el ataque autoinmune, se han diseñado tratamientos que modulan el sistema inmune y pueden ser capaces de detener o reducir fuertemente la destrucción de los islotes (Raz y otros, 2001, Lancet 358: 1749-1753; Chatenoud y otros, 2003, Nat Rev Immunol. 3: 123-132; Homann y otros, Immunity. 2002, 3:403-415). Sin embargo, debido a la relativamente baja regeneración de las células beta humanas, tales tratamientos pueden ser más exitosos si se combinan con tratamientos que pueden estimular la regeneración de las células beta.

30

35

La diabetes es una enfermedad muy discapacitante, porque los medicamentos antidiabéticos comunes actuales no controlan los niveles de glucosa sanguínea lo suficientemente bien como para prevenir completamente la ocurrencia de niveles altos y bajos de glucosa sanguínea. Frecuentemente los niveles elevados de glucosa sanguínea son tóxicos y causan complicaciones de largo término como por ejemplo la nefropatía, la retinopatía y la enfermedad vascular periférica. La extensa pérdida de las células beta conduce además a una desregulación de la secreción de glucagón en las células alfa pancreáticas que contribuye al incremento del riesgo de episodios de hipoglicemia. Existe además una multitud de afecciones relacionadas, tales como obesidad, hipertensión, enfermedad cardíaca e hiperglicemia para las cuales las personas con diabetes están sustancialmente en riesgo.

40

45

Aparte de la afectación en la calidad de vida de los pacientes, el tratamiento de la diabetes y sus complicaciones a largo plazo presenta una enorme carga financiera para nuestros sistemas de cuidados de la salud con tendencia a elevarse. Por lo tanto, para el tratamiento de la diabetes mellitus tipo I y LADA, y además para el tratamiento de las etapas tardías de la diabetes mellitus tipo 2 hay una fuerte necesidad en la técnica de identificar factores que induzcan la regeneración de las células beta pancreáticas productoras de insulina. Estos factores podrían restaurar la función normal del páncreas endocrino una vez que se afecte su función o aún podrían prevenir el desarrollo o progreso de la diabetes tipo I, LADA o diabetes tipo II.

50

La neurturina se expresa en el páncreas embrionario, y se ha demostrado que la neurturina recombinante estimula la diferenciación de las células ES en células productoras de insulina. Además, los ratones transgénicos con niveles elevados de neurturina tienen una masa de células beta pancreáticas sustancialmente incrementada. Con base en estos hallazgos, se propuso el uso de la neurturina en trastornos pancreáticos tales como la diabetes (ver, por ejemplo, WO03/099318 y WO2005/051415).

55

La neurturina se propuso anteriormente como un tratamiento para las enfermedades neurodegenerativas tales como Parkinson, Alzheimer y enfermedad de Huntington, trastornos de la neurona motora o trastornos auditivos. (WO 97/08196, WO 99/06064; Akerud y otros J Neurochem. 1999;73(1):70-78; Koeberle & Ball Neuroscience. 2002; 110(3):555-567; Bilak y otros Mol Cell Neurosci. 1999;13(5):326-336;Perez-Navarro y otros Neuroscience. 2000; 98(1):89-96; Rosenblad y otros, Eur J Neurosci. 1999; 11 (5):1554-1566).

60

Se encontró, sin embargo, que tras la liberación incrementada por convección (CED) en cerebros de rata, se limitó el

volumen de distribución de la neurturina y el factor GDNF relacionado (Hamilton y otros, Exp Neurol. 2001 ; 168(1):155-161). En nuestros propios estudios, encontramos que después de la inyección subcutánea e intravenosa la biodisponibilidad de la neurturina es baja, solo aproximadamente 10% de la neurturina inyectada subcutáneamente entra a la circulación (ver Fig. 1). Sería, por lo tanto, altamente deseable proveer una forma de formulación que incremente la biodisponibilidad de la neurturina.

La heparina se usa extensamente en medicina debido a sus acciones anticoagulantes. La inhibición de la coagulación sanguínea por heparina ocurre mediante la unión e inhibición del factor proteasa Xa y otras proteasas de serina que participan en la cascada de la coagulación y se describió que se requiere un mínimo de pentasacárido para la inhibición del factor Xa (Wang y otros., J Clin Invest. 2002; 110:127-136; Esko & Lindahl J Clin Invest. 2001;108(2):169-173; Weitz, JL, N Engl J Med. 1997; 337(10):688-698).

Se conoce que los factores de crecimiento proteicos tales como VEGF, bFGF, neurturina y - A - y la proteína relacionada GDNF se enlazan a la heparina (Lin y otros J Neurochem. 1994; 63 (2):758-768; WO 97/08196; Kotzbauer y otros Nature. 1996; 384(6608):467-470; Hamilton y otros, más arriba). La heparina no fraccionada consiste de cadenas del polímero glicosaminoglicano. Estas cadenas contienen residuos alternos de D-glucosamina y ácido urónico (ya sea ácido glucurónico o ácido idurónico), y tienen pesos moleculares hasta aproximadamente 30000 Dalton (Weitz y otros, más arriba).

Hamilton y otros observaron un volumen de distribución significativamente incrementado en CED de GDNF y neurturina junto con heparina.

Para el GDNF se demostró que la heparina puede incrementar la unión a su receptor GFR α , y que el GDNF unido a la heparina está protegido del ataque proteolítico (Rickard y otros, Glycobiology. 2003; 13(6):419-426).

El documento US 5,849,689 reveló la administración del factor de crecimiento del hepatocito (HGF) en combinación con la heparina, heparina de bajo peso molecular y polisulfato de pentosán. Se mostró que la vida media en plasma de HGF se incrementó significativamente mediante la co-administración de HGF y heparina, mientras que la co-administración de HGF con heparina de bajo peso molecular condujo a sólo un pequeño incremento de la vida media plasmática en comparación con la administración de HGF solo.

Los presentes inventores encontraron que la biodisponibilidad de la neurturina, sin embargo, sólo se incrementa moderadamente mediante la heparina, particularmente después de la administración subcutánea. Por lo tanto, el objetivo de la presente invención fue proporcionar una nueva formulación de factores de crecimiento proteicos, particularmente formulaciones novedosas de neurturina, que tienen una biodisponibilidad significativamente incrementada.

Resumen de la invención

La presente invención se refiere a una formulación farmacéutica que comprende la neurturina como ingrediente activo y un polímero polianiónico de bajo peso molecular que tiene un peso molecular (Mw) promedio de hasta 8000 Da junto con portadores farmacéuticamente aceptables, diluyentes y/o adyuvantes, donde el polímero polianiónico es un polímero que contiene un grupo sulfato y en donde:

la formulación es para uso en inyección subcutánea o intravenosa, en ambos casos para uso en medicina humana o veterinaria; y/o

la formulación es para uso en la prevención o tratamiento de trastornos pancreáticos.

Se reveló además, pero sin formar parte de la invención, un método para la administración de un factor de crecimiento proteico a un sujeto necesitado de éste, donde se administra una formulación farmacéutica que comprende un factor de crecimiento proteico como un ingrediente activo y un polímero polianiónico de bajo peso molecular junto con portadores farmacéuticamente aceptables, diluyentes y/o adyuvantes.

En una modalidad preferida de la invención, el polímero polianiónico es una heparina de bajo peso molecular o un polisulfato de pentosana (PPS).

Las formulaciones de la presente invención son particularmente adecuadas para prevenir o tratar trastornos pancreáticos, más particularmente trastornos pancreáticos autoinmunes, por ejemplo, diabetes autoinmune como la diabetes tipo I o LADA y también diabetes tipo II.

Las formulaciones de la presente invención son particularmente adecuadas para prevenir o tratar trastornos neurodegenerativos, más particularmente la polineuropatía diabética.

Descripción detallada de la invención

- 5 El factor de crecimiento proteico puede seleccionarse de factores de crecimiento de proteínas unidos a heparina tales como neurturina, artemina, persefina, VEGF, bFGF, o GDNF, o fragmentos farmacéuticamente activos y derivados de ellos. Especialmente preferidos son los factores de crecimiento humanos.
- 10 En consecuencia con la invención, el factor de crecimiento proteico es un producto de la proteína de neurturina, con mayor preferencia la neurturina humana o un fragmento de ella farmacéuticamente activo. Los productos de la proteína neurturina se producen preferentemente a través de técnicas recombinantes porque tales métodos son capaces de lograr grandes cantidades de proteínas de alta pureza, pero no se limitan a productos que se expresan en los sistemas celulares bacterianos, de vegetales, de mamíferos o insectos.
- 15 Las formas del producto de la proteína neurturina recombinante incluyen formas glicosiladas y no glicosiladas de la proteína. En general, las técnicas recombinantes comprenden el aislamiento del gen que codifica el producto proteína de neurturina, con clonaje del gen en vectores adecuados y/o tipos celulares, con modificación del gen si es necesario para codificar la variante deseada y con expresión del gen para producir el producto de proteína de neurturina.
- 20 Alternativamente puede sintetizarse químicamente una secuencia de nucleótidos que codifica el producto neurturina deseado. Se contempla que el producto neurturina puede expresarse mediante el uso de secuencias de nucleótidos que varían en el uso de los codones debido a la degeneración del código genético o variaciones alélicas o alteraciones realizadas para facilitar la producción del producto de proteínas por la célula seleccionada.
- 25 Kotzbauer y otros, Nature 384:467-470, describen la identificación del ADNc y la secuencia de aminoácidos de un ratón y un ADNc humano y la secuencia de aminoácidos de la proteína de neurturina. En consecuencia con esta invención, los productos de neurturina pueden aislarse o generarse mediante una variedad de medios. Los métodos principales para elaborar los productos de neurturina adecuados se describen en la solicitud de patente WO 97/08196. Se describen además una variedad de vectores, células huéspedes, y condiciones para el crecimiento de los cultivos para la expresión de la proteína de neurturina, así como métodos para sintetizar variantes del producto de la proteína de neurturina. Los vectores adicionales adecuados para la expresión del producto de proteína de neurturina se muestran en la patente núm. EP 0 423 980.
- 30 El peso molecular de la neurturina purificada indica que en su forma biológicamente activa la proteína es un dímero unido a disulfuro. El material aislado después de la expresión en un sistema bacteriano es esencialmente biológicamente inactivo, y existe como un monómero. Se necesita un replegamiento para producir el dímero unido a disulfuro activo. Los procesos adecuados para el replegamiento y maduración de la neurturina expresada en sistemas bacterianos son sustancialmente similares a los descritos en WO93/06116. Los ensayos estándares in vitro para la determinación de la actividad de la neurturina son además sustancialmente similares a los usados para determinar la actividad de GDNF como se describe en WO93/06116 y en patente de los Estados Unidos núm. 6,184,200.
- 35 Un ensayo preferente para la determinación de la actividad de la neurturina se basa en el enlace de la neurturina a una familia de receptores GFRa2 de GDNF y a los receptores de la tirosino-quinasa cRet.A. De este modo se activa la vía MAPK.
- 40 El ensayo usa la línea de células de neuroblastoma humano TGW (JCRB0618) que expresa GFRa2 y cRet y que se transfieren con un gen de luciferasa bajo control de elementos repetitivos de respuesta del suero (SRE).
- 45 Como la expresión de luciferasa se correlaciona con la activación de la vía MAPK, la actividad de la neurturina puede determinarse mediante la expresión de luciferasa.
- 50 Las variantes del producto de neurturina se preparan mediante la introducción de cambios adecuados en los nucleótidos del ADN que codifican el polipéptido o mediante la síntesis química in vitro del polipéptido deseado. Se podrá apreciar por expertos en la técnica que muchas combinaciones de deleciones, inserciones y sustituciones pueden hacerse que resultan en una variante de un producto de proteína que presenta la actividad biológica de la neurturina.
- 55 Las técnicas de mutagénesis por el reemplazo, inserción o deleción de uno o más residuos de aminoácidos seleccionados son bien conocidas por las personas expertas en la técnica (por ejemplo, patente de Estados Unidos núm. 4,518,584).
- 60 Las variantes de sustitución de la neurturina tienen eliminado al menos un residuo de aminoácidos de la secuencia de aminoácidos de la neurturina humana o de ratón y un residuo diferente insertado en su lugar. Tales variantes de sustitución incluyen variantes alélicas, que se caracterizan por cambios que ocurren naturalmente en la secuencia de nucleótidos en la población de especies que pueden o no resultar en un cambio de aminoácidos.

Es preferente que la identidad de secuencia para la neurturina humana madura sea de al menos 90%, en particular la identidad es de al menos 94%, preferentemente más del 96%, y aún con mayor preferencia la secuencia de identidad es de más del 98%.

5

Los derivados del producto de proteína de neurturina también pueden prepararse por un experto en la técnica, dadas las revelaciones de la presente descripción. Los compuestos químicos más adecuados para la derivatización incluyen polímeros solubles en agua. Es deseable un polímero soluble en agua porque la proteína a la cual debe atarse no precipita en un ambiente acuoso, tal como el ambiente fisiológico. Preferentemente, el polímero deberá ser farmacéuticamente aceptable para la preparación de un producto o composición terapéuticos. Una persona experta en la técnica será capaz de seleccionar el polímero deseado con base en consideraciones tales como si el conjugado polímero/proteína se usaría terapéuticamente, y si es así, la dosis deseada, el tiempo en la circulación, la resistencia a la proteólisis y otras consideraciones. Un polímero soluble en agua particularmente preferente para usarse en esta descripción es el polietilenglicol. Si se desea la unión al receptor deben evitarse ataduras a residuos importantes para la unión del receptor. Se puede desear específicamente una proteína N terminal modificada químicamente.

La presente invención contempla el uso de productos de proteínas de neurturina, es decir, derivados que son neurturina expresada de procariotas, o variantes de ellas unidas al menos a una molécula de polietilenglicol, así como el uso de neurturina o variantes de ella unida a una o más moléculas de polietilenglicol a través de un enlace de acilo o alquilo. La pegilación puede llevarse a cabo mediante cualquiera de las reacciones de pegilación conocidas en la técnica. Ver, por ejemplo: Focus on Growth Factors, 3 (2):4-10, 1992; EP 0 154 316; EP 0 401 384; y otras publicaciones citadas en la presente descripción que se refieren a la pegilación.

La presente invención muestra además el uso de derivados que son neurturina expresada por procariotas, o variantes de ella unidas al menos a un residuo hidrofóbico, por ejemplo, una molécula de ácido graso, así como el uso de una neurturina o variante de ella unida a uno o más residuos hidrofóbicos.

Por ejemplo, la solicitud de la patente publicada como WO 03/010185 describe un método para producir polipéptidos acilados en células huéspedes transformadas mediante la expresión de una molécula precursora del polipéptido deseado que son después acilados en un paso posterior in vitro.

El polímero polianiónico de bajo peso molecular puede ser un polímero sintético, un polímero de origen natural o un polímero derivado de un polímero de origen natural mediante modificación y/o fragmentación química o enzimática. El polímero polianiónico contiene una pluralidad de grupos sulfatos. El polímero polianiónico es por lo tanto un polímero que contiene grupos sulfato. El peso molecular promedio ponderado (M_w) del polímero polianiónico se eleva hasta aproximadamente 8000 Da. Además, es preferente que el peso molecular promedio ponderado (M_w) sea al menos aproximadamente 200 Da y con mayor preferencia al menos aproximadamente 500 Da.

Por ejemplo, el polímero polianiónico puede ser seleccionado de sacáridos sulfatados de bajo peso molecular, ciclodextrinas sulfatadas, o polímeros sintéticos sulfatados tales como polímeros de acrílico, polímeros aromáticos y/o polialcoholes. Más particularmente, el polímero polianiónico se selecciona de heparinas de bajo peso molecular o derivados de heparina, sulfatos de heparina, sulfatos de condroitina, sulfatos de dextrano, polisulfatos de pentosana o derivados o combinaciones de estos.

En lo adelante se proporcionan ejemplos no limitantes de polímeros polianiónicos de bajo peso molecular que son adecuados para incorporarse a la formulación de la presente invención.

Oligosacáridos derivados de heparina químicamente modificados (lista de Wang y otros. (2002), más arriba), oligosacáridos similares a la heparina, sulfatos de dextrano, glicaminoglicanos sulfatados de bajo peso molecular, sulfatos de dextrina-2, sulfatos de celulosa y polímero de sulfonato de naftaleno (por ejemplo, PRO 2000), PAVAS (un copolímero de ácido acrílico con sulfato de alcohol vinílico, el polímero sulfonado PAMPS [poli(2-acril-amido-2-metil-1-ácido propanosulfónico)] (M_w por ejemplo, aproximadamente 7000-12000), sulfatos de condroitina, ciclodextrinas sulfatadas, sulfato de laminarina (Alban, S. en Carbohydrates in Drug Design (Ed. Z.J. Witczak, K.A. Nieforth) Dekker, Nueva York, 1997, pp 209.), sulfatos de poliglicerina (Turk, H., Haag, R., Alban, S. Bioconjugate Chem. 2004, 15, 162;) polisulfatos de pentosana (PPS) y derivados de estos tales como polisulfatos de pentosana modificados con lactosa, PPS fraccionados/PPS de bajo peso molecular, o Fucoidan.

Los análogos de la heparina de bajo peso molecular tales como Enoxaparina, Dalteparina, Fragmina, Nadroparina, Tinzaparina, Fondaparina, Bemiparina, Reviparina, Ardeparina, Certoparina, y/o Parnaparina, es decir, Lovenox[®], Fraxiparina[®], Sandoparina[®] o Arixtra[®], son ejemplos preferidos de polímeros adecuados. Estos se obtienen por fraccionamiento y/o digestión química o enzimática limitada de la heparina, y tienen un peso molecular promedio de preferentemente aproximadamente 3000 a aproximadamente 7000 Dalton (Weitz 1997 más arriba).

5 En los esquemas de tratamiento para enfermedades o afecciones donde no se requiere la regulación farmacéutica de la coagulación, la actividad anticoagulante de un aditivo o excipiente debe ser una característica no deseada. Por lo tanto, para el propósito de incrementar la biodisponibilidad de la neurturina, se prefiere para algunas modalidades de la invención usar polímeros polianiónicos que están completamente desprovistos de actividad anticoagulante.

10 La heparina tiene un efecto antiinflamatorio debido a su capacidad para inhibir la adhesión de los leucocitos (Wang y otros, 2002, más arriba) y posiblemente debido a su unión a ciertas citocinas (Kuschert y otros Biochemistry. 1999;38(39):12959-12968.). Pueden prepararse derivados modificados de la heparina que retengan alguna actividad antiinflamatoria mientras están desprovistos de actividad anticoagulante o que carezcan de ambas actividades (Wang y otros, 2002, más arriba). Por lo tanto, puede ser ventajoso combinar un agente antidiabético regenerador de las células beta tal como la neurturina con tal derivado antiinflamatorio de la heparina, ya que tanto la diabetes tipo I como la tipo II se han relacionado con procesos inflamatorios. (Eisenbarth Adv Exp Med Biol. 2004;552:306-310; Donath y otros Diabetes. 2005;54 Suppl 2:S108-13).

15 Alternativamente, puede ser ventajoso combinar neurturina con un compuesto similar a la heparina no antiinflamatorio y no anticoagulante para obtener un aditivo farmacéuticamente neutro solamente con propiedades de incremento en la distribución.

20 Un ejemplo preferido del compuesto relacionado con la heparina con propiedades farmacológicas distintas es el polisulfato de pentosana (PPS). El PPS es un polímero aniónico preferentemente derivado de material vegetal. Es estructuralmente similar a la heparina con un peso molecular de preferentemente aproximadamente 4000 a aproximadamente 6000 Dalton. En comparación con la heparina, tiene significativamente una actividad anticoagulante inferior, y es un fármaco aprobado para el tratamiento de enfermedades inflamatorias del epitelio de la vejiga. Se usa además como fármaco antiinflamatorio para el tratamiento de la artritis en animales.

25 La formulación farmacéutica de la presente invención tiene una alta biodisponibilidad del ingrediente activo en comparación con una formulación farmacéutica que no contenga el polímero polianiónico. Preferentemente, el polímero polianiónico está presente en una cantidad para proporcionar un incremento de al menos 2 veces, preferentemente al menos 5 veces, y con mayor preferencia al menos 10 veces en la biodisponibilidad del ingrediente activo.

30 El incremento en la biodisponibilidad puede determinarse como se muestra en los Ejemplos de la presente solicitud. Más particularmente, una formulación que contiene el ingrediente activo en una dosis dada y el polímero polianiónico se compara con una formulación farmacéutica que contiene el ingrediente activo en la misma dosis pero sin el polímero polianiónico. La biodisponibilidad de ambas formulaciones puede determinarse a partir de la concentración plasmática después de la administración subcutánea en animales experimentales, por ejemplo, el ratón. Preferentemente, la concentración plasmática se mide durante un período de tiempo de 240 min, con mayor preferencia de 24h.

35 La formulación farmacéutica de la presente invención puede adaptarse para la administración por cualquier vía eficaz, por ejemplo, por vías de administración oral, nasal, rectal, pulmonar, tópica, transdérmica o parenteral. Por lo tanto, la formulación puede ser una formulación sólida o líquida, por ejemplo, tableta, cápsula, polvo, gel, pomada, solución, emulsión suspensión, liofilizado, etc. Preferentemente, sin embargo la formulación se administra por inyección o infusión, con mayor preferencia por inyección, por ejemplo, por inyección subcutánea o intravenosa. Por lo tanto, la formulación farmacéutica es preferentemente una solución acuosa.

40 En adición al ingrediente activo y al polímero polianiónico, la formulación farmacéutica puede comprender cualquier otro portadores, diluyentes y/o adyuvantes farmacéuticamente aceptables, tales como tampones, agentes para ajustar la tonicidad, estabilizadores, rellenos, desintegrantes, espesantes, etc.

45 La formulación farmacéutica contiene el ingrediente activo en una dosis eficaz. La dosis terapéuticamente eficaz depende del tipo de ingrediente activo, el tipo o variedad de la enfermedad a tratar y el tipo de administración. Para formulaciones parenterales que contienen neurturina como ingrediente activo, la dosis eficaz está preferentemente en el intervalo de aproximadamente 0.001 mg a 500 mg, con mayor preferencia de aproximadamente 0.05 mg a aproximadamente 100 mg, con mayor preferencia de aproximadamente 0.01 a aproximadamente 5 mg por día.

50 La formulación se administra preferentemente a un mamífero, particularmente un humano. Por lo tanto, la formulación es adecuada para medicina humana y veterinaria. La formulación es particularmente adecuada para la prevención y/o tratamiento de trastornos neurodegenerativos y pancreáticos, particularmente trastornos autoinmunes pancreáticos tales como la diabetes tipo I y LADA, o diabetes tipo II.

55 El producto neurturina puede administrarse por cualquier medio adecuado, preferentemente enteralmente o parenteralmente o tópicamente directamente en el páncreas, como se conoce por los expertos en la técnica. La dosis específica puede calcularse considerando el peso corporal, el área de superficie corporal o el tamaño del órgano. Otros

ajustes de los cálculos necesarios para la dosificación apropiada del tratamiento se realizan de rutina por los expertos ordinarios en la técnica y está dentro del ámbito de las tareas que se desarrollan de rutina. Las dosificaciones adecuadas pueden determinarse a través del uso de ensayos establecidos para la determinación de dosificaciones utilizadas en conjunto con los datos de dosis-respuesta adecuados. El régimen de dosificación final implicado en un método para el tratamiento de las afecciones anteriormente descritas se determinará por los médicos tratante considerando varios factores que modifican la acción de los fármacos, por ejemplo, la edad, afección, peso corporal, sexo y dieta del paciente, la severidad de cualquier infección, tiempo de administración y otros factores clínicos. A medida que los estudios se desarrollen, emergerá información adicional respecto a los niveles de dosificación adecuada para el tratamiento de varias enfermedades y afecciones.

Se avizora que la administración continua o la liberación sostenida de un producto de neurturina pueden ser ventajosas para un tratamiento dado. Aunque la administración continua se puede lograr a través de medios mecánicos, tales como bombas de infusión, se contempla que pueden practicarse otras formas de administración continua o cercanas a la administración continua. Por ejemplo, la derivatización química o la encapsulación pueden resultar en formas de liberación sostenida de la proteína que tienen el efecto de la presencia continua, en cantidades previsibles, con base en un régimen determinado de dosificación. De esta forma, los productos de la proteína neurturina incluyen proteínas derivatizadas o formuladas para efectuar tal administración continua.

En otra modalidad preferida, el producto de la proteína neurturina puede suministrarse directamente al progenitor, por ejemplo, células madres para estimular la diferenciación de las células productoras de insulina in vivo. En esta modalidad de la invención, la neurturina puede añadirse preferentemente a concentraciones entre 0.1 ng/ml y 500 ng/ml, con mayor preferencia entre 1 y 100 ng/ml, con mayor preferencia 50 ng/ml.

La proteína neurturina puede administrarse como monoterapia o como terapia combinada con otros agentes terapéuticos. Por ejemplo, estos pueden administrarse juntos con otros agentes farmacéuticos adecuados para el tratamiento o prevención de enfermedades pancreáticas y/o obesidad y/o síndrome metabólico, particularmente con otros agentes farmacéuticos adecuados para estimular y/o inducir la diferenciación de las células productoras de insulina a partir de células progenitoras. Además, pueden administrarse junto con agentes farmacéuticos que tienen una actividad inmunosupresora, por ejemplo, anticuerpos, polipéptidos y/o sustancias de bajo peso molecular peptídicas o no peptídicas como se muestran en WO 2005/051415.

Las figuras ilustran la invención:

Fig. 1 muestra la concentración plasmática de neurturina después de la aplicación subcutánea de 0.05mg/kg de neurturina formulada en solución NaCl al 0.9%
En comparación con la cantidad de neurturina inyectada, la biodisponibilidad es muy baja a aproximadamente 5 %.

Fig. 2 muestra la concentración plasmática de neurturina después de la aplicación subcutánea de 0.25mg/kg de neurturina formulada en solución de NaCl al 0.9% sola y conjugada con heparina. La figura muestra que en comparación con la biodisponibilidad de la neurturina formulada en solución salina fisiológica la disponibilidad de la formulación de neurturina/heparina de 12.5 U se incrementa sólo 2 veces.

Fig. 3 muestra las concentraciones plasmáticas de neurturina después de la aplicación subcutánea de 0.25mg/kg de neurturina formulada en solución de NaCl al 0.9% sola o junto con heparina o una heparina de bajo peso molecular (LMWH). En comparación con la biodisponibilidad de la neurturina formulada en solución salina fisiológica la biodisponibilidad de una formulación de neurturina que contiene 12.5 unidades de una LMWH como un excipiente aumenta significativamente aproximadamente 10 veces.

Fig. 4 muestra las concentraciones plasmáticas de neurturina después de la aplicación subcutánea de 0.05mg/kg de neurturina formulada en una solución de NaCl al 0.9%, sola o junto con una heparina de bajo peso molecular (LMWH). La adición de una LMWH a la neurturina inyectada incrementa la concentración plasmática de la neurturina dependientemente de la dosis.

Fig. 5 muestra las concentraciones plasmáticas de neurturina después de la aplicación subcutánea de 0.05mg/kg de neurturina formulada en solución de NaCl al 0.9% sola o junto con polisulfato de pentosana (PPS). El PPS en comparación con la heparina o una LMWH incrementa las concentraciones plasmáticas de neurturina más eficazmente cuando se administra en la misma relación molar.

Fig. 6 muestra las concentraciones plasmáticas de neurturina después de la aplicación subcutánea de 0.05mg/kg de neurturina formulada en solución de NaCl al 0.9% junto con carboximetilcelulosa (CMC). La adición de CMC a la solución de neurturina no incrementa la biodisponibilidad de la neurturina.

EJEMPLOS.

Ejemplo de Referencia 1

Concentración plasmática de neurturina después de la aplicación subcutánea de 0.05mg/kg de neurturina formulada en solución de NaCl al 0.9%.

5

100 µl de una solución que contiene neurturina a una concentración de 12.5 µg/ml formulada en solución salina fisiológica se inyectaron en la región del cuello del ratón. Para cada punto de tiempo se graficó el valor promedio de 3 concentraciones plasmáticas de neurturina medidas mediante un ELISA específico para neurturina. Las concentraciones plasmáticas de neurturina permanecen bajas, en el intervalo de 1-2ng/ml. En comparación con la cantidad total de neurturina inyectada, la biodisponibilidad es aproximadamente 5%. Los resultados se muestran en la Fig. 1.

10

Ejemplo de Referencia 2

Concentraciones plasmáticas de neurturina después de la aplicación subcutánea de 0.25mg/kg de neurturina formulada en solución de NaCl al 0.9% sola o junto con heparina.

15

100 µl de una solución que contiene neurturina a la concentración de 62.5 µg/ml formulada en solución salina fisiológica sola o junto con heparina se inyectaron subcutáneamente en la región del cuello del ratón. Para probar el efecto de la formulación de heparina se añadieron dos concentraciones diferentes de heparina a la solución de neurturina. Para cada punto de tiempo se graficó el valor promedio de 3 concentraciones plasmáticas de neurturina medidas mediante un ELISA específico para neurturina. Las concentraciones plasmáticas de neurturina permanecieron bajas después de la inyección de neurturina en solución salina sola o formulada con heparina de 6.5 unidades. La adición de 12.5 unidades a la neurturina inyectada incrementó significativamente la concentración plasmática. En comparación con la biodisponibilidad de la neurturina formulada en solución salina fisiológica, la biodisponibilidad de la formulación de neurturina/heparina de 12.5 U se incrementa aproximadamente dos veces. Los resultados se muestran en la Fig. 2.

20

25

Ejemplo 3

Concentración plasmática de neurturina después de la aplicación subcutánea de 0.25mg/kg de neurturina formulada en solución de NaCl al 0.9% sola o junto con heparina o heparina de bajo peso molecular (LMWH).

30

100 µl de una solución que contiene neurturina a la concentración de 62.5 µg/ml formulada en solución salina fisiológica sola o junto con heparina o una LMWH (Fragmina) se inyectaron subcutáneamente en la región del cuello del ratón. Para probar el efecto de la formulación de LMWH se añadieron dos concentraciones diferentes a la solución de neurturina. Para cada punto de tiempo se graficó el valor promedio de 3 concentraciones plasmáticas de neurturina medidas mediante un ELISA específico para neurturina. Las concentraciones plasmáticas de neurturina permanecieron bajas después de la inyección de neurturina en salina sola. La adición de 6.5 unidades de LMWH a la neurturina inyectada incrementó significativamente la concentración plasmática. Además, al incrementar la cantidad de LMWH en la formulación hasta 12.5 unidades se incrementó aún más la neurturina en el plasma. En comparación con la biodisponibilidad de la neurturina formulada en solución salina fisiológica, la biodisponibilidad de la formulación de neurturina que contiene 12.5 unidades de una LMWH como un excipiente se incrementó aproximadamente 10 veces. Los resultados se muestran en la Fig. 3.

35

40

Ejemplo 4

Concentraciones plasmáticas de neurturina después de la aplicación subcutánea de 0.05mg/kg de neurturina formulada en una solución de NaCl al 0.9% sola o junto con heparina de bajo peso molecular (LMWH).

45

100 µl de una solución de neurturina que contiene neurturina a la concentración de 12.5 µg/ml formulada en solución salina fisiológica sola o junto con una LMWH (Fragmina) se inyectaron subcutáneamente en la región del cuello del ratón. Para probar el efecto de la dosis de la formulación de LMWH se añadieron cuatro concentraciones diferentes a la solución de neurturina. Para cada punto de tiempo se graficó el valor promedio de 3 concentraciones plasmáticas de neurturina medidas mediante un ELISA específico para teurturina. Las concentraciones plasmáticas de neurturina permanecieron bajas después de la inyección de neurturina en salina sola. La adición de una LMWH a la neurturina inyectada incrementó la concentración plasmática de la neurturina dependiente de la dosis. Los resultados se muestran en la Fig. 4.

50

Ejemplo 5

Concentraciones plasmáticas de neurturina después de la aplicación subcutánea de 0.05mg/kg de neurturina formulada en solución de NaCl al 0.9% sola o junto con un polisulfato de pentosana (PPS).

- 5 100 µl de una solución de neurturina que contiene neurturina a la concentración de 12.5 µg/ml formulada en solución salina fisiológica sola o junto con PPS se inyectaron subcutáneamente en la región del cuello del ratón. Para cada punto de tiempo se graficó el valor promedio de 3 concentraciones plasmáticas de neurturina medidas mediante un ELISA específico para teurturina. Las concentraciones plasmáticas de neurturina permanecieron bajas después de la inyección de neurturina en salina sola. Además la adición de PPS a la neurturina inyectada incrementó la concentración plasmática. En comparación con la heparina o una LMWH el PPS incrementó las concentraciones de neurturina plasmáticas más eficazmente cuando se administraron en la misma relación molar. Los resultados se muestran en la Fig. 5.

Ejemplo de Referencia 6

- 15 Concentraciones plasmáticas de neurturina después de la aplicación subcutánea de 0.05mg/kg de neurturina formulada en solución de NaCl al 0.9% sola o junto con carboximetilcelulosa (CMC).

- 20 100 µl de una solución de neurturina que contiene neurturina a la concentración de 12.5 µg/ml formulada en solución salina fisiológica sola o junto con CMC se inyectaron subcutáneamente en la región del cuello del ratón. Para probar el efecto de la dosis de la formulación de CMC se añadieron cuatro concentraciones diferentes a la solución de neurturina. Para cada punto de tiempo se graficó el valor promedio de 3 concentraciones plasmáticas de neurturina medidas mediante un ELISA específico para teurturina. Las concentraciones plasmáticas de neurturina permanecieron bajas después de la inyección de una solución de neurturina de salina junto con CMC. Además la adición de CMC a la neurturina inyectada no incrementó la biodisponibilidad de la neurturina. Los resultados se muestran en la Fig. 6.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una formulación farmacéutica que comprende neurturina como un ingrediente activo y un polímero polianiónico de bajo peso molecular que tiene un peso molecular promedio (M_w) de hasta 8000 Da junto con un portadores, diluyentes y/o adyuvantes farmacéuticamente aceptables, donde el polímero polianiónico es un polímero que contiene grupo sulfato y en donde:
- 10 la formulación es para usar en inyección subcutánea o intravenosa, en ambos casos para usar en medicina humana o veterinaria;
y/o
la formulación es para usar en la prevención o tratamiento de trastornos pancreáticos.
- 15 2. La formulación para usar de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la neurturina es neurturina humana o un fragmento farmacéuticamente activo de esta.
- 20 3. La formulación para usar de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2 en donde la neurturina está unida a propilenglicol.
- 25 4. La formulación para usar de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el polímero polianiónico es seleccionado de sacáridos sulfatados, ciclodextrinas sulfatadas, polímeros acrílicos sulfatados, y/o polímeros aromáticos sulfatados, polialcoholes sulfatados.
- 30 5. La formulación para usar de acuerdo con la reivindicación 4, en donde el polímero polianiónico es seleccionado de heparinas de bajo peso molecular, o derivados de la heparina antiinflamatorios desprovistos de actividad anticoagulante, sulfatos de heparina, sulfatos de condroitina, sulfatos de dextrano, polisulfatos de pentosana o combinaciones de estos.
- 35 6. La formulación para usar de acuerdo con la reivindicación 5, en donde las heparinas y derivados de la heparina de bajo peso molecular son Enoxaparina, Dalteparina, Nadroparina, Tinzaparina, Fondaparina, Bemiparina, Reviparina, Ardeparina, Certoparina, y/o Parnaparina.
- 40 7. La formulación para usar de acuerdo con la reivindicación 4, en donde el polímero polianiónico es un polisulfato de pentosana con un peso molecular promedio ponderado (M_w) de 4000 a 6000 Da.
- 45 8. La formulación para usar de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes para usar en inyección subcutánea o intravenosa.
9. La formulación para usar de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes para usar en la prevención y tratamiento de trastornos pancreáticos.
10. La formulación para usar de acuerdo con la reivindicación 9 para usar en la prevención o tratamiento de la diabetes tipo I, diabetes autoinmune latente en adultos (LADA) o diabetes tipo II.
11. La formulación para usar de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 para la administración a un mamífero, particularmente un humano.

Figura 1

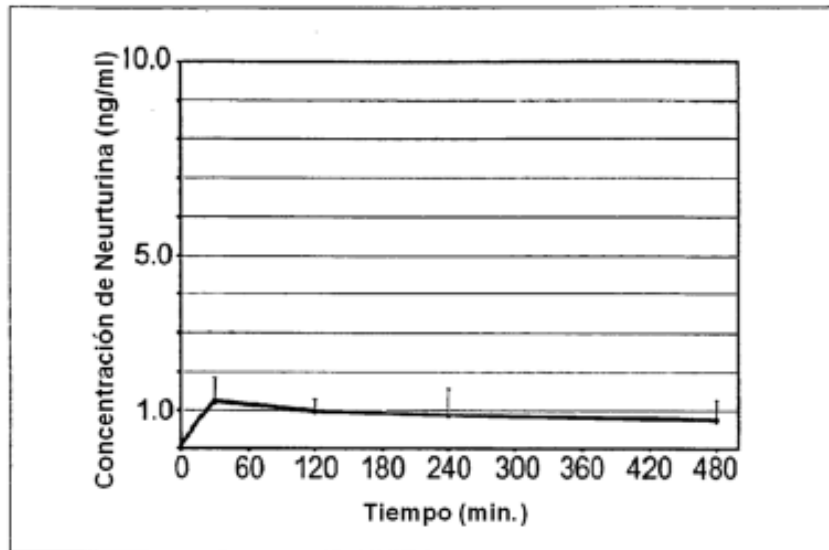


Figura 2

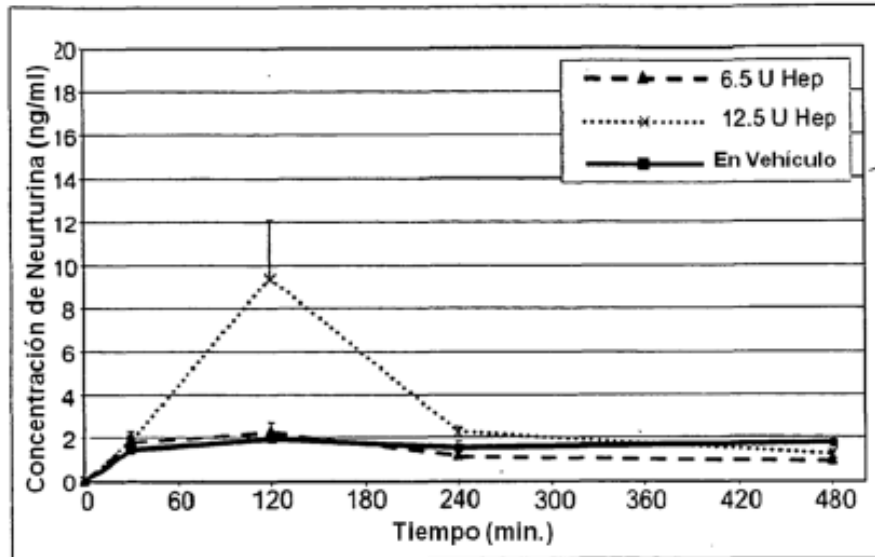


Figura 3

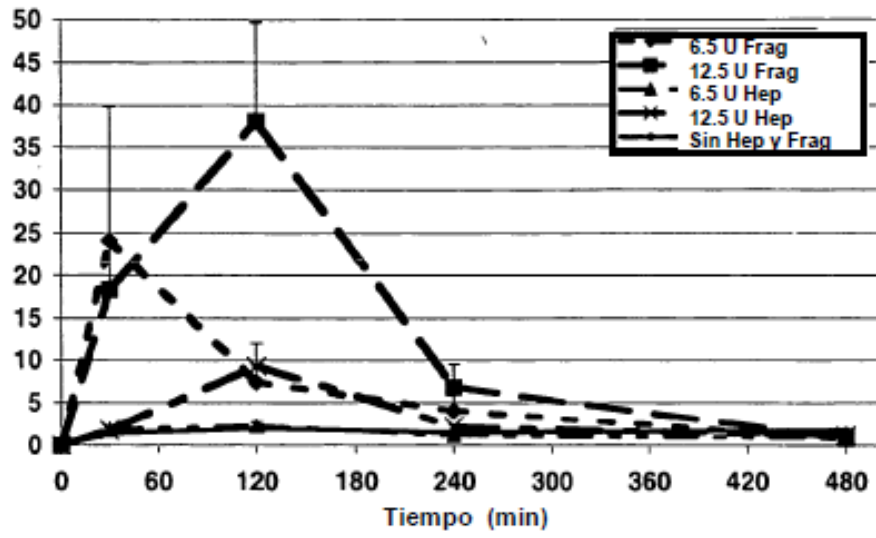


Figura 4

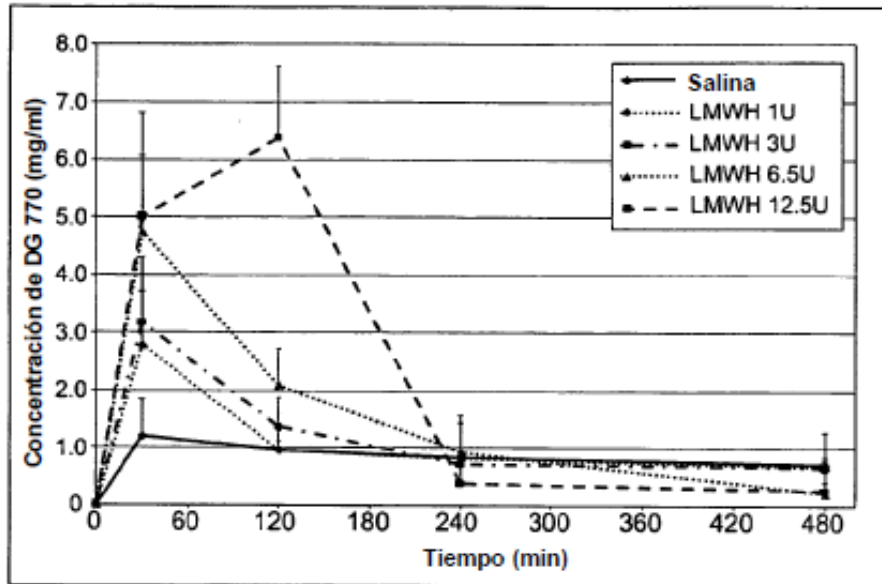


Figura 5

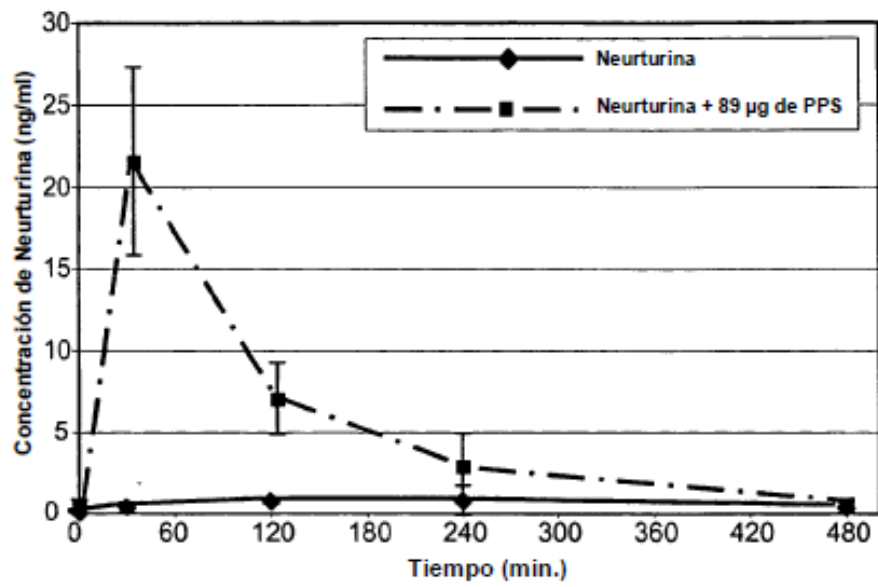


Figura 6

