

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 596 827**

51 Int. Cl.:

**A61P 3/00** (2006.01)

**A61K 31/519** (2006.01)

**C07D 475/04** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.11.2004 PCT/US2004/038296**

87 Fecha y número de publicación internacional: **02.06.2005 WO05049000**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.11.2004 E 04819152 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.07.2016 EP 1708690**

54 Título: **Tratamiento de la fenilcetonuria con BH4**

30 Prioridad:

**17.11.2003 US 520767 P**

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

**12.01.2017**

73 Titular/es:

**BIOMARIN PHARMACEUTICAL INC. (100.0%)  
105 DIGITAL DRIVE  
NOVATO, CA 94949, US**

72 Inventor/es:

**OPPENHEIMER, DANIEL I;  
KAKKIS, EMIL, D.;  
PRICE, FREDRIC, D. y  
DORENBAUM, ALEJANDRO**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

**Observaciones:**

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

ES 2 596 827 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**

Tratamiento de la fenilcetonuria con BH4

5 Referencia cruzada a solicitudes relacionadas

Esta solicitud reivindica el beneficio según el punto 119(e) del artículo 35 del Código de Comercio de los Estados Unidos respecto de la solicitud provisional de patente estadounidense con n.º de serie 60/520.767, presentada el 17 de noviembre de 2003.

10 Antecedentes

Campo

15 La presente invención se refiere, de forma general, a la intervención terapéutica de trastornos metabólicos, especialmente los que implican el metabolismo de aminoácidos. Más particularmente, la presente invención se dirige a la tetrahidrobiopterina (BH4), u opcionalmente una forma de sal de la misma, para su uso en el tratamiento de un sujeto con fenilcetonuria (PKU), en la que BH4 es para administrarse por vía oral una vez al día a una dosis diaria de 5 mg/kg a 30 mg/kg, y en el que la BH4 es para administrarse en combinación con una dieta restringida en proteínas.

20 Antecedentes de la tecnología relacionada

25 La fenilcetonuria (PKU) es un trastorno metabólico heredado que se identificó por primera vez en la década de los 30 del siglo pasado. En la mayor parte de casos, y hasta la mitad de la década de los 90 del siglo pasado, se pensaba que era un trastorno del metabolismo de los aminoácidos resultando de una deficiencia en la enzima hepática fenilalanina hidoxilasa (PAH). Las deficiencias en la PAH, a su vez, dan como resultado un exceso de fenilalanina (Phe) en el cerebro y el plasma. La deficiencia en PAH finalmente se manifiesta en una carencia de tirosina, que es un precursor de neurotransmisores.

30 Si queda sin detectar y sin tratar al principio de la vida del bebé, la PAH lleva a una lesión irreversible del sistema nervioso, retraso mental grave y escaso desarrollo del cerebro. Los rasgos diferentes a retraso mental en pacientes no tratados incluyen calcificación cerebral, pigmentación escasa, peculiaridades en la deambulación, postura, y postura estando sentado, eczema, y epilepsia. Se ha notificado que un bebé padece una pérdida de 50 puntos de CI dentro del primer año de su infancia, y la PKU está invariablemente acompañada por algo de pérdida de CI. Una vez detectada, la dolencia se trata proporcionando al bebé, y posteriormente al niño, una dieta baja en Phe. En adultos, los suplementos proteínicos tomados normalmente por los pacientes clásicos de PKU pueden estar exentos de Phe con la suposición de que tales adultos recibirán suficiente Phe mediante el resto de la dieta, controlada según un régimen estricto, de forma que la dieta globalmente es una dieta baja en Phe. Asimismo, las mujeres embarazadas que padecen esta enfermedad reciben la recomendación de seguir una dieta que sea baja en Phe para evitar el riesgo de deterioro del feto y malformación congénita (síndrome de PKU materna).

45 En los últimos años se ha demostrado que los síntomas patológicos que se manifiesta por la dolencia de un exceso de Phe, denominados colectivamente hiperfenilalaninemia (HPA), se pueden clasificar en varios trastornos individuales, que se diagnostican de acuerdo con las concentraciones plasmáticas de Phe y la sensibilidad a un cofactor de PAH. A un nivel inicial, Las HPA se puede dividir en HPA causada como resultado de una deficiencia en el cofactor 6R-L-eritro-5,6,7,8, tetrahidrobiopterina (BH4; PKU maligna) y HPA resultado de una deficiencia de PAH. Esta última categoría se subdivide a su vez en al menos tres categorías dependiendo de la concentración plasmática de Phe en ausencia de intervenciones en la dieta o cualquier otra intervención terapéutica (denominada en el presente documento como "concentración plasmática de Phe no restringida").

50 La homeostasia normal de la Phe en plasma está estrechamente controlada, dando como resultado una concentración plasmática de Phe de 60 µmol/l ± 15 µmol/l. La PKU clásica (OMIM N.º 261600) es la forma más grave de la PKU y es resultado de mutaciones en PAH completas o graves, que conducen a concentraciones plasmáticas de Phe no restringidas mayores de 1200 µmol/l cuando se deja sin tratamiento. Los individuos con la PKU clásica (o grave) se pueden tratar con un régimen dietético estricto que se basa en una dieta muy baja en Phe para reducir las concentraciones de Phe a un intervalo seguro. Las formas más leves de HPA también se han caracterizado. Una forma menos grave de la PKU es una que se manifiesta por concentraciones plasmáticas de Phe de 10-20 mg/dl (600-1200 µmol/l), y se denomina por lo general "PKU leve". Esta forma moderada de la PKU se gestiona mediante el uso moderado de restricciones dietéticas, por ejemplo, una dieta baja en proteínas totales, pero por otra parte no necesariamente exenta de Phe. Finalmente, la HPA leve, también denominada benigna o HPA no PKU se caracteriza por concentraciones plasmáticas de Phe de entre 180-600 µmol/l. Los individuos con HPA no PKU no se tratan de forma rutinaria ya que se considera que tienen niveles plasmáticos de Phe que se encuentran dentro del intervalo "seguro". Sin embargo, como se ha mencionado anteriormente, estos niveles de Phe siguen siendo significativamente elevados en estos individuos en comparación con los sujetos normales no PKU y pueden presentar secuelas perjudiciales al menos en mujeres embarazadas y pacientes muy jóvenes. Para una revisión más

detallada de la HPA resultado de la deficiencia en PAH, los expertos en la materia en la materia deben dirigirse a Scriver et al., 2001 (Hyperphenylalaninemia: Phenylalanine Hydroxylase Deficiency, En: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, Childs B, Vogelstein B, eds. *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. 8ª ed. New York: McGraw-Hill, 2001: 1667-1724). Las directrices de los NIH indican que, para los niños con PKU, es preferible reducir la Phe plasmática a 360-420  $\mu\text{mol/l}$ .

HPA también da como resultado defectos en el metabolismo de BH4. BH4 es un cofactor fundamental tanto de tirosina como de triptófano hidroxilasa, las enzimas limitantes de la velocidad en la biosíntesis de los neurotransmisores dopamina y serotonina. Los efectos de las deficiencias de serotonina y dopamina se denominan colectivamente como HPA "atípica" o "maligna". Por tanto, el diagnóstico tradicional de la HPA ha implicado una determinación de si la HPA es el resultado de una deficiencia de BH4 o una deficiencia de PAH. Normalmente, el diagnóstico de la PKU se establece sobre la base de una concentración elevada persistente de Phe en sangre. Después de un cribado positivo para Phe elevada en sangre (Phe plasmática  $>120 \mu\text{mol/l}$ ; Weglage et al., *J. Inherit. Metab. Dis.*, 25:321-322, 2002), se realiza un cribado diferencial en el que se determina si la Phe elevada es resultado de una deficiencia de BH4 o una deficiencia de PAH. El diagnóstico diferencial implica determinar si la concentración elevada de Phe disminuye como resultado de la administración de BH4 (ensayo de carga de BH4). El ensayo de carga de BH4 implica de forma típica una carga de una sola vez de BH4, por ejemplo, 5-20 mg/kg que se administran al sujeto que sigue una dieta normal (es decir, no restringida) y determinar si el sujeto experimenta una disminución en los niveles de Phe (véase, por ejemplo, Ponzzone et al., *Eur. J. Pediatr.* 152:655-661, 1993; Weglage et al., *J. Inherit. Metab. Dis.*, 25:321-322, 2002.)

Normalmente, los individuos que responde a un ensayo de carga de BH4 con una disminución en los niveles plasmáticos de Phe reciben el diagnóstico de tener un defecto en la homeostasia de BH4. Sin embargo, existen varios informes de pacientes con un tipo de sensibilidad a BH4 típica de la deficiencia en PAH (Kure et al., *J. Pediatr.* 135:375-378, 1999; Lassker et al., *J. Inherit. Metab. Dis.* 25:65-70, 2002; Linder et al., *Mol. Genet. Metab.* 73:104-106, 2001; Spaapen et al., *Mol. Genet. and Metabolism*, 78:93-99, 2003; Trefz et al., 2001). Estos sujetos tienen niveles plasmáticos de Phe que son típicos de la PKU moderada, es decir, menos de 1000  $\mu\text{mol/l}$  y típicamente menores de 600  $\mu\text{mol/l}$ . Los pacientes que tienen la PKU clásica grave no son sensibles a un ensayo de carga de BH4 típico de 24 horas (Ponzzone et al., *N. Engl. J. Med* 348(17):1722-1723, 2003).

Se ha sugerido que los individuos que son sensibles a BH4 que no requiere intervención dietética, sino que en su lugar deben tratarse con BH4. Del mismo modo, se ha sugerido lo contrario para los sujetos que han sido diagnosticados como no sensibles al ensayo de carga de BH4, es decir, dichos sujetos deberían tratarse con restricción dietética y no con tratamiento de BH4. Ponzzone et al. notaron especialmente que los individuos que tenían fenilcetonuria grave no responden al tratamiento con BH4 y dicho tratamiento no debería usarse en dichos pacientes (Ponzzone et al., *N. Engl. J. Med* 348(17):1722-1723, 2003). Por tanto, en la actualidad existen diferentes enfoques terapéuticos para el tratamiento de la HPA dependiendo de si el individuo es sensible o no a BH4. Además, se ha sugerido que muy pocos pacientes se beneficiarán del tratamiento con BH4. De hecho, se cree que los únicos individuos con una forma de HPA deficiente en PAH que se beneficiarían de la terapia con BH4 son los que tienen una PKU leve. Como estos individuos tenderán normalmente niveles de Phe en el intervalo seguro (es decir, menos de 600  $\mu\text{M}$ ), la patología se puede controlar usando una restricción dietética moderada (véase Hanley, *N. Engl. J. Med* 348(17):1723, 2003). Por tanto, El tratamiento con BH4 bien solo, o combinado con cualquier otra intervención terapéutica, no se ha considerado como una intervención terapéutica viable para para la gran mayoría de los individuos con HPA.

BH4 es una amina biogénica de la familia de pterina natural. Las pterinas se encuentran en los fluidos y tejidos fisiológicos en formas oxidadas y reducidas, sin embargo, solamente la 5,6,7,8, tetrahidrobiopterina es biológicamente activa. Se trata de una molécula quiral, y el enantiómero 6R del cofactor se sabe que es el enantiómero biológicamente activo. Para una revisión detallada de la síntesis y los trastornos de BH4 véase Blau et al., 2001 (Disorders of tetrahydrobiopterin and related biogenic amines. En: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, Childs B, Vogelstein B, eds. *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. 8ª ed. New York: McGraw-Hill, 2001: 1275-1776). A pesar de la elucidación del papel de la deficiencia de BH4 en la HPA, no se ha sugerido un tratamiento con BH4 porque dicho tratamiento es muy caro, tanto como 30.000 dólares estadounidenses anuales por adolescente o adulto, en comparación con los 6.000 dólares estadounidenses de la terapia dietética con restricción de fenilalanina (Hanley, *N. Engl. J. Med* 348(17):1723, 2003). Otro problema significativo de BH4 es que dicho compuesto es inestable y experimenta fácilmente oxidación aerobia a temperatura ambiente (Davis et al., *Eur. J. Biochem.*, vol. 173, 345-351, 1988; patente de Estados Unidos n.º 4.701.455) y tiene una semivida inferior a 0 horas a temperatura ambiente (Bernegger y Blau, *Mol. Genet. Metabol.* 77:304-313, 2002).

Por tanto, hasta la fecha, la intervención dietética es la intervención terapéutica típica utilizada para todos los pacientes con PKU clásica grave y en muchos pacientes con PKU moderada. Dicha intervención dietética normalmente implica que el paciente se limite a alimentos que estén compuestos por alimentos naturales que estén exentos de, o tengan un contenido bajo en Phe. Sin embargo, además de eliminar la Phe, dicho régimen alimenticio elimina muchas de las fuentes de otros aminoácidos esenciales, vitaminas y minerales. En consecuencia, sin suplementos, dicha dieta proporciona una cantidad inadecuada de proteínas, energía, vitaminas y minerales para soportar el crecimiento y desarrollo normales. Como la PKU es una manifestación de falta de tirosina, que surge de

la falta de hidroxilación de la fenilalanina, la tirosina se convierte en un aminoácido esencial y los suplementos dietéticos de la PKU deben incluir un suplemento de tirosina. Por tanto, es habitual utilizar fórmulas nutricionales para complementar las dietas de los pacientes con PKU. Asimismo, para los bebés, es habitual utilizar fórmulas para lactantes que tengan un contenido bajo en Phe como la única o la principal fuente de alimentos.

5 Sin embargo, una restricción proteínica en la dieta es, como máximo, una forma ineficaz de controlar la PKU en muchos tipos de pacientes. Por ejemplo, el tratamiento es de suma importancia durante el embarazo ya que los elevados niveles de Phe pueden dar como resultado un retraso intrauterino del desarrollo del cerebro. Sin embargo, una dieta baja en proteínas durante el embarazo puede dar como resultado un retraso de desarrollo renal y por tanto se cree que ocasiona una reducción posterior en el número de nefronas y potencialmente conduce a la hipertensión en el adulto. (D'Agostino, N. Engl. J. Med. 348(17)1723-1724, 2003).

15 El mal cumplimiento del paciente de una dieta con restricción de proteínas resulta también un problema. Las fórmulas de proteínas exentas de Phe que están disponibles tienen un gusto algo amargo, lo que dificulta garantizar que el paciente consume cantidades suficientes para mantener la necesaria la ingesta diaria de proteína, aminoácidos, vitaminas, minerales, y similares. Este es un problema particular con los niños mayores que pueden requerir hasta 70 g, en peso en seco, de las fórmulas por día. Por ejemplo, Schuett, V. E.; 1990; Publicación DHHS n.º HRS-MCH-89-5, informa que más del 40 % de pacientes de PKU de ocho años de edad o mayores no consiguen cumplir el tratamiento dietético. (patente de Estados Unidos n.º 6.506.422). Muchos pacientes adolescentes no logran seguir rigurosamente la dieta con restricción de proteínas debido al temor por la respuesta de sus iguales.

Steinfeld et al., Amino Acids 25:63-68, 2003 debaten una hipótesis sobre el mecanismo bioquímico de la sensibilidad a BH4 en la deficiencia de fenilalanina hidrolasa.

25 Hennerman et al., Journal of Inherited Metabolic Disease 25 (Supl. 1):21, 2002 debaten la sensibilidad a tetrahydrobiopterina parcial y total en la fenilcetonuria clásica y leve (PKU).

Muntau et al., N. Engl. J. Med 347(26):2122-2132, 2002 debaten la tetrahydrobiopterina como un tratamiento alternativo a la fenilcetonuria leve.

30 Lindner et al., Molecular Genetics and Metabolism 73(1):104-106, 2001 debate que la sensibilidad a la tetrahydrobiopterina en la fenilcetonuria difiere entre los pacientes con el mismo genotipo.

35 Bernegger et al., Molecular Genetics and Metabolism 77(4):304-313, 2002 debaten una elevada frecuencia de sensibilidad a tetrahydrobiopterina entre las hiperdenilalaninemias: un estudio de 1919 observados desde 1988 hasta 2002.

40 Por tanto, sigue existiendo una necesidad de un medicamento terapéutico para sustituir o complementar y aliviar las restricciones dietéticas que padece un paciente con PKU. La presente invención se dirige a resolver dicha necesidad.

#### Sumario de la invención

45 La invención describe la intervención en trastornos metabólicos, especialmente los que implican el metabolismo de aminoácidos. La invención se define mediante las reivindicaciones adjuntas. Más particularmente, la presente invención se dirige a la tetrahydrobiopterina (BH4), u opcionalmente una forma de sal de la misma, para su uso en el tratamiento de un sujeto con fenilcetonuria (PKU), en la que BH4 es para administrarse por vía oral una vez al día a una dosis diaria de 5 mg/kg a 30 mg/kg, y en el que la BH4 es para administrarse en combinación con una dieta restringida en proteínas. También se describen métodos y composiciones para el tratamiento de sujetos que muestran niveles de fenilalanina elevados, por ejemplo, sujetos que padecen hiperfenilalanemia, fenilcetonuria leve o fenilcetonuria clásica grave.

55 En un aspecto, la invención describe métodos para tratar la fenilcetonuria (PKU) clásica grave en un sujeto que comprende administrar al sujeto una dieta con restricción de proteínas junto con una composición que comprende tetrahydrobiopterina (BH4), en la que la administración combinada de la dieta con restricción de proteínas y BH4 es eficaz para disminuir la concentración de fenilalanina en el plasma del sujeto en comparación con la concentración en ausencia de la administración combinada. En realizaciones específicas, el sujeto es uno que no manifiesta una deficiencia en la homeostasia de BH4. El sujeto puede ser un individuo que no manifiesta síntomas de deficiencia del neurotransmisor L-dopa.

60 Un sujeto seleccionado para el tratamiento de acuerdo con la invención tendrá una elevada concentración plasmática de Phe, dicha concentración puede ser superior a 1800 µM/l en ausencia del tratamiento. Otras realizaciones contemplan que el sujeto tenga una concentración de fenilalanina en plasma mayor de 1000 µM en ausencia de un régimen terapéutico. En realizaciones preferidas, la administración combinada de acuerdo con la invención disminuye la concentración de fenilalanina en plasma del sujeto a menos de 600 µM. Más preferentemente, se disminuye a menos de 500 µM. Incluso más preferiblemente, la administración combinada

disminuye la concentración de fenilalanina en plasma del sujeto a  $360 \mu\text{M} \pm 15 \mu\text{M}$ .

La BH4 se puede administrar en una cantidad comprendida entre aproximadamente 1 mg/kg y aproximadamente 30 mg/kg, o entre aproximadamente 5 mg/kg a aproximadamente 30 mg/kg. La BH4 se puede administrar en una única dosis diaria o en múltiples dosis diariamente. En algunas realizaciones, el tratamiento con BH4 no es continuo, sino en su lugar, la BH4 se administra diariamente hasta que la concentración de fenilalanina en plasma del sujeto disminuye a menos de  $360 \mu\text{M}$ . Preferentemente, en la que la concentración de fenilalanina en plasma del sujeto se controla diariamente y la BH4 se administra cuando se observa un aumento del 10 % de la concentración de fenilalanina en plasma. Preferentemente, la BH4 a administrar es una forma cristalizada estabilizada de BH4 que tiene mayor estabilidad que la BH4 no cristalina estabilizada. Más preferentemente, la forma cristalina estabilizada de BH4 comprende al menos un 99,5 % de BH4 6R pura. Los precursores tales como la dihidrobiopterina (BH2), y sepiapterina también se pueden administrar. BH4 se puede administrar por vía oral.

La dieta con restricción de proteínas administrada de acuerdo con la invención es aquella dieta en la que la fenilalanina está restringida, en la que la ingesta total de fenilalanina del sujeto se restringe a menos de 600 mg por día. En otras realizaciones, la dieta con restricción de proteínas es una dieta en la que la fenilalanina total está restringida a menos de 300 mg por día. En otras realizaciones adicionales, la dieta con restricción de proteínas es una dieta complementada con aminoácidos, tales como tirosina, valina, isoleucina y leucina. En determinadas realizaciones, la dieta con restricción de proteínas comprende un suplemento de proteínas y la BH4 se proporciona en la misma composición que el suplemento de proteínas.

En realizaciones específicas, el sujeto es aquel que ha recibido un diagnóstico de tener una fenilalanina hidroxilasa (PAH) mutante. La PAH mutante puede comprender una mutación en el dominio catalítico de PAH. Dichas mutaciones ilustrativas incluyen una o más mutaciones seleccionadas entre el grupo que consiste de F39L, L48S, I65T, R68S, A104D, S110C, D129G, E178G, V190A, P211T, R241C, R261Q, A300S, L308F, A313T, K320N, A373T, V388M, E390G, A395P, P407S, y Y414C,

También se contempla en el presente documento un método para tratar una mujer embarazada que tiene hiperfenilalaninemia (HPA) que comprende administrar al sujeto una dieta con restricción de proteínas junto con una composición que comprende tetrahidrobiopterina (BH4), en la que la administración combinada de la dieta con restricción de proteínas y BH4 es eficaz para disminuir la concentración de fenilalanina en el plasma del sujeto en comparación con la concentración en ausencia de la administración combinada. En determinadas realizaciones, el sujeto tiene una concentración de fenilalanina en plasma sin restricción mayor de  $180 \mu\text{M}$ , pero inferior a  $600 \mu\text{M}$ . En otras realizaciones, el sujeto tiene una concentración de fenilalanina en plasma sin restricción mayor de  $500 \mu\text{M}$ , pero inferior a  $1200 \mu\text{M}$ . En otras realizaciones adicionales, el sujeto tiene una concentración de fenilalanina en plasma sin restricción mayor de  $1000 \mu\text{M}$ .

También se contempla un método para tratar un paciente que tiene una concentración de fenilalanina en plasma superior a la normal (por ejemplo, mayor de  $180 \mu\text{M/l}$  y más preferentemente, mayor de  $360 \mu\text{M/l}$ ) que comprende administrar al paciente una composición de BH4 estabilizada en una cantidad efectiva para producir una disminución de la concentración de fenilalanina en plasma del paciente. Preferentemente, la composición de BH4 estabilizada es estable a temperatura ambiente durante más de 8 horas. El paciente probablemente tendrá una concentración de fenilalanina en plasma mayor de  $180 \mu\text{M}$  antes de administrar la BH4. Más particularmente, el paciente tiene una concentración de fenilalanina en plasma entre  $120 \mu\text{M}$  y  $200 \mu\text{M}$ . En otras realizaciones, el paciente tiene una concentración de fenilalanina en plasma entre  $200 \mu\text{M}$  y  $600 \mu\text{M}$ . En otras realizaciones adicionales, el paciente tiene una concentración de fenilalanina en plasma entre  $600 \mu\text{M}$  y  $1200 \mu\text{M}$ . Otra clase adicional de pacientes a tratar son los que tienen una mayor concentración de fenilalanina en plasma no restringida mayor de  $1200 \mu\text{M}$ . En realizaciones específicas, el paciente es un bebé, más en concreto, un bebé que tiene una concentración de fenilalanina en plasma mayor de  $1200 \mu\text{M}$ . En otras realizaciones, la paciente está embarazada y la paciente embarazada tiene una concentración de fenilalanina en plasma entre aproximadamente  $200 \mu\text{M}$  y aproximadamente  $600 \mu\text{M}$ . Las pacientes embarazadas con una concentración de fenilalanina en plasma mayor de  $1200 \mu\text{M}$  son candidatos especialmente atractivos para este tipo de tratamiento, así como aquellos pacientes que sean mujeres en edad de procrear que están pensando en quedarse embarazadas. En estas realizaciones, en las que el paciente tiene una concentración de fenilalanina en plasma mayor de  $1200 \mu\text{M}$ , y el método comprende además administrar una dieta con restricción de proteínas al paciente.

La invención también contempla tratar un paciente que tiene fenilcetonuria, que comprende administrar al paciente una composición de BH4 estabilizada en una cantidad efectiva para producir una disminución de la concentración de fenilalanina en plasma del paciente en el que el paciente ha recibido un diagnóstico de insensibilidad a un ensayo de carga de BH4 en una sola dosis. Preferentemente, el paciente es insensible en las 24 horas posteriores a la carga de BH4.

Otro aspecto relacionado de la divulgación proporciona un ensayo de carga de múltiples dosis que implica la administración de más de una dosis de BH4. Los datos descritos en el presente documento demuestran que los sujetos que se consideran "insensibles" en el ensayo de carga de BH4 de una sola dosis pueden responder a varias dosis de BH4 con una reducción significativa en los niveles de fenilalanina. En una realización, al menos dos dosis

de BH4 que pueden estar entre aproximadamente 5 mg y 40 mg se administran a un sujeto durante un periodo de más de un día, preferentemente 7 días.

El método de tratamiento de acuerdo con la presente divulgación puede comprender administrar entre aproximadamente 10 mg de BH4/kg de peso corporal a aproximadamente 200 mg de BH4/kg de peso corporal. La BH4 se puede administrar mediante cualquier ruta normalmente utilizada en la práctica, por ejemplo, por vía oral. La BH4 se puede administrar diariamente o en cualquier otro intervalo, por ejemplo, en días alternos o incluso semanalmente. La BH4 preferentemente se administra junto a una dieta con restricción de proteínas, y opcionalmente en paralelo con folatos, incluyendo precursores de folato, ácidos fólicos, y derivados de folato.

Se contempla que BH4 se administrará como parte de un componente de una formulación terapéutica de proteínas. La dieta con restricción de proteínas puede comprender una dieta de alimento que contiene un bajo contenido en proteínas. Como alternativa, la dieta con restricción de proteínas comprende una ingesta de fórmula de proteína que es una dieta de proteínas exenta en fenilalanina, y el sujeto obtiene su cantidad esencial de Phe del resto de componentes de una dieta muy baja en proteínas. En determinadas realizaciones, la dieta con restricción de proteínas está complementada con suplementos proteicos que no contienen fenilalanina. Más particularmente, los suplementos proteicos que no contienen fenilalanina comprenden tirosina u otros aminoácidos esenciales. En otras realizaciones, los suplementos de proteína pueden comprender también folatos, incluyendo precursores de folato, ácidos fólicos, y derivados de folato.

La invención que se describe en el presente documento se puede usar para tratar un bebé que tiene fenilcetonuria, que comprende administrar una composición estabilizada de BH4 al paciente en una cantidad eficaz para producir una disminución de la concentración de fenilalanina en plasma del bebé en la que el bebé tiene entre 0 y 3 años de edad y el bebé tiene una concentración de fenilalanina en plasma de entre aproximadamente 360  $\mu$ M y aproximadamente 4800  $\mu$ M. Antes de administrar la BH4, el bebé tiene una concentración de fenilalanina de aproximadamente 1200  $\mu$ M y la administración de BH4 disminuye la concentración de fenilalanina en plasma a aproximadamente 1000  $\mu$ M. En otras realizaciones, antes de administrar la BH4, el bebé tiene una concentración de fenilalanina de aproximadamente 800  $\mu$ M y la administración de BH4 disminuye la concentración de fenilalanina en plasma a aproximadamente 600  $\mu$ M. En otras realizaciones adicionales, antes de administrar la BH4, el bebé tiene una concentración de fenilalanina de aproximadamente 400  $\mu$ M y la administración de BH4 disminuye la concentración de fenilalanina en plasma a aproximadamente 300  $\mu$ M. La invención debería reducir preferentemente la concentración de fenilalanina en plasma del bebé a  $360 \pm 15 \mu$ M.

También se contempla una composición que comprende una forma cristalina estabilizada de BH4 que es estable a temperatura ambiente durante más de 8 horas y un transportador, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable. La composición puede comprender además un suplemento de proteína médica. La composición de BH4 puede ser parte de una fórmula para bebés. El suplemento proteico puede estar exento de fenilalanina. El suplemento proteico puede estar reforzado con L-tirosina, L-glutamina, L-carnitina a una concentración de 20 mg/100 g de suplemento, L-aurina a una concentración de 40 mg/100 g de suplemento y selenio. Puede comprender además las dosis diarias recomendadas de minerales, por ejemplo, calcio, fósforo y magnesio. El suplemento puede además la dosis diaria recomendada de uno o más aminoácidos seleccionados entre el grupo que consiste de L-leucina, L-prolina, L-lisina acetato, L-valina, L-isoleucina, L-arginina, L-alanina, glicina, L-asparagina monohidrato, L-triptófano, L-serina, L-treonina, L-histidina, L-metionina, ácido L-glutámico, y ácido L-aspártico. Además, el suplemento puede estar reforzado con la dosis diaria recomendada de vitaminas A, D y E. El suplemento puede comprender un contenido en grasa que proporciona al menos el 40 % de la energía del suplemento. Dicho suplemento se puede proporcionar en la forma de un suplemento en polvo o en forma de una barra de proteínas.

Otras características y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada. Deberá entenderse, sin embargo, que la descripción detallada y los ejemplos específicos, aunque indican realizaciones preferidas de la invención, se proporcionan con fines meramente ilustrativos, ya que varios cambios y modificaciones serán evidentes para los expertos en la técnica a partir de esta descripción detallada.

#### Descripción de las realizaciones preferidas

La intervención dietética es la intervención terapéutica utilizada para todos los pacientes con PKU clásica grave y en muchos pacientes con PKU moderada. Sin embargo, dicha restricción de proteínas de la dieta conduce a un suministro inadecuado de proteínas, energía, vitaminas y minerales para soportar el crecimiento y desarrollo normales. Por tanto, la restricción proteínica en la dieta es, como máximo, una forma ineficaz de controlar la PKU en muchos tipos de pacientes, especialmente en mujeres embarazadas y en los niños jóvenes, categorías ambas de sujetos que requieren grandes cantidades de proteínas en comparación con individuos adultos normales. El uso de la restricción dietética también se ve obstaculizada por el mal cumplimiento del paciente de una dieta con restricción de proteínas. En octubre de 2000, los National Institutes of Health emitió una declaración de consenso sobre el cribado y la gestión de la PKU en la que "se alentaba decididamente la investigación sobre alternativas no dietéticas para el tratamiento de la PKU". Por tanto, existe una necesidad reconocida en la técnica de un medicamento terapéutico para sustituir y/o complementar y aliviar las restricciones dietéticas que padece un paciente con PKU.

La presente invención describe, por primera vez, una intervención farmacéutica de la PKU basada en la administración de una forma estabilizada de BH4. Los métodos y composiciones para producir dichas composiciones estabilizadas de BH4 se describen con mayor detalle en el Ejemplo 2. Las composiciones de BH4 estabilizadas para su uso de acuerdo con la presente invención comprenden cristales de BH4 que son estables a temperatura ambiente durante más de 8 horas. La presente invención contempla el uso de composiciones farmacéuticas de la BH4 estabilizada sola que se puede suministrar mediante administración oral. Las composiciones pueden comprender además composiciones de BH4 junto con un antioxidante que ayuda a prolongar la estabilidad de la composición de BH4. Además, tal como se analiza en detalle a continuación, los alimentos pueden comprender BH4. Por ejemplo, composiciones de proteínas en polvo convencionales tales como PHENEX, LOFENALAC, PHENYL-FREE y similares que se han modificado mediante la adición de BH4.

La presente invención contempla la intervención terapéutica de varios fenotipos de PKU mediante la administración de BH4 junto con una dieta con restricción de proteínas. La BH4 a administrar junto con la diete puede ser, aunque no necesariamente, una composición de BH4 estabilizada descrita en el presente documento. Los expertos en la materia conocen los métodos para producir una composición de BH4 que es inestable a temperatura ambiente y en presencia de luz. Aunque los tratamientos que utilizan dicha composición están obstaculizadas por la inestabilidad de la composición de BH4, su uso se sigue contemplando en determinados tratamientos combinados donde los pacientes no sensibles a BH4 que padecen BH4 clásica grave se tratan con un ciclo de tratamiento de BH4 y una restricción proteínica en la dieta.

Los métodos y composiciones para realizar el tratamiento de trastornos metabólicos, incluyendo la PKU, se describen con más detalle a continuación en el presente documento.

#### I. Pacientes a tratar

La presente invención se dirige a tratamiento de una variedad de poblaciones de pacientes de HPA donde los métodos comprenden el uso de composiciones de BH4 estabilizadas, o composiciones de BH4 no estabilizadas, tanto solas como combinadas con otros regímenes terapéuticos, para gestionar la HPA y/o la PKU. En particular, se contempla que cualquier tipo de BH4, en una forma estabilizada o de otra forma se pueda utilizar para tratar dicha población de pacientes que tienen concentraciones de fenilalanina que son lo suficientemente bajas para que no se utilice normalmente la intervención en la dieta (es decir, pacientes con HPA leve). Dichos pacientes que son adecuados para todas las formas de tratamiento con composiciones de BH4 para mejorar los efectos de la HPA leve, incluyen las mujeres embarazadas y los bebés con concentraciones séricas inferiores a 200  $\mu\text{M}$ . Las diferentes poblaciones de pacientes, y sus diferentes necesidades terapéuticas, se describen con más detalle en la presente sección.

Algunas realizaciones de la presente invención se dirigen a tratar la PKU clásica grave mediante administración al sujeto de una dieta con restricción de proteínas junto con una composición que comprende BH4, en la que la administración combinada de la dieta con restricción de proteínas y BH4 es eficaz para disminuir la concentración de fenilalanina en el plasma de dicho sujeto en comparación con la concentración en ausencia de dicha administración combinada. Además, la invención también contempla el tratamiento de una mujer embarazada que tiene HPA mediante la administración a la mujer de la dieta con restricción de proteínas junto con BH4, de tal forma que la administración combinada de la dieta con restricción de proteínas y BH4 es eficaz para disminuir la concentración de fenilalanina en el plasma de la mujer embarazada en comparación con dicha concentración en ausencia de dicha administración combinada. En realizaciones específicas, se contempla un tratamiento para pacientes que manifiestan niveles de Phe mayores de 420  $\mu\text{M}$ .

Otras realizaciones de la invención conllevan la administración de una composición de BH4 estabilizada a cualquier individuo que tenga HPA, caracterizado por una concentración plasmática de Phe mayor de 180  $\mu\text{M}$  antes de administrar la BH4, en una cantidad eficaz para producir una disminución en dicha concentración plasmática de Phe del paciente. La invención también se puede usar en el tratamiento de pacientes de PKU que han recibido un diagnóstico de insensibilidad a un ensayo de carga de BH4. La invención se utilizará en el tratamiento de un bebé que tiene una PKU caracterizada por concentraciones elevadas de Phe o mayores de 300  $\mu\text{M/l}$  con las composiciones de BH4 estabilizadas descritas en el presente documento. Por "bebé", la presente solicitud se refiere a un paciente que tiene una edad comprendida entre 0 y a aproximadamente 36 meses.

Los datos descritos en el presente documento demuestran que los sujetos que se consideran "insensibles" en el ensayo de carga de BH4 de una sola dosis pueden responder, de hecho, a varias dosis de BH4 con una reducción significativa en los niveles de fenilalanina. Por tanto, un ensayo de carga de múltiples dosis puede implicar la administración de más de una dosis de BH4. Los ensayos de carga de múltiples dosis incluyen la administración de entre 5 y 40 mg/kg de tetrahidrobiopterina, o más preferentemente de 0 a 20 mg/kg, durante un período de tiempo de al menos 1 día, o al menos 2 días, o al menos 3, 4, 5, 6, 7, 10 o 14 días, preferentemente 2-14, 3-14, o 5-10 días, y lo más preferentemente 7 días.

La invención proporciona el uso, de acuerdo con la invención, de cualquiera de los polimorfos de tetrahidrobiopterina descritos en el presente documento, o preparaciones farmacéuticamente estables que comprenden cualquiera de

dichos polimorfos, para el tratamiento de dolencias asociadas con niveles elevados de fenilalanina o niveles disminuidos de tirosina, que pueden estar causados, por ejemplo, por una actividad reducida de la fenilalanina hidroxilasa, tirosina hidroxilasa o triptófano hidroxilasa. Las dolencias asociadas con niveles de fenilalanina elevados incluyen específicamente la fenilcetonuria, tanto leve como clásica, y la hiperfenilalaninemia tal como se describe en otra parte del presente documento, como poblaciones de pacientes ilustrativas se incluyen los subgrupos de pacientes descritos en el presente documento, así como cualquier otro paciente que muestre niveles de fenilalanina por encima de lo normal.

#### A. Características de la PKU clásica grave y tratamiento de la misma de acuerdo con la presente invención.

Tal como se ha mencionado anteriormente en la sección de antecedentes, la PKU grave se manifiesta por una concentración plasmática de Phe mayor de 1200  $\mu\text{M/l}$  y puede ser incluso tan alta como 4800  $\mu\text{M/l}$ . Los pacientes que tienen este trastorno deben tratarse con una dieta exenta de Phe para poder disminuir sus concentraciones plasmáticas de Phe hasta un nivel que sea clínicamente aceptable (normalmente, inferior a 600  $\mu\text{M/l}$ , y preferentemente inferior a 300  $\mu\text{M/l}$ ). Estos pacientes solamente pueden tolerar un máximo de entre 250-350 mg de Phe en la dieta por día (Spaapen et al., Mol. Genet and Metab. 78:93-99, 2003). De este modo, estos pacientes inician una fórmula dietética restringida en Phe de 7 a 10 días después de su nacimiento y deben soportar esta restricción dietética para el resto de su vida. Cualquier alivio de las estrictas restricciones dietéticas que estos individuos soportan se consideraría un beneficio.

Los ensayos utilizados para el diagnóstico de individuos con la Phe clásica se describen con más detalle a continuación en la Sección III. Estos ensayos han revelado que los pacientes con la PKU clásica grave no son sensibles a BH4 y necesitan una dieta baja en fenilalanina (Lucke et al., Pediatr. Neurol. 28:228-230, 2003). Sin embargo, en la presente invención, se contempla que esta clase de pacientes de PKU se deberían tratar con BH4 como se reivindica para que se pueda aliviar la necesidad de una estricta dieta exenta de fenilalanina.

Por tanto, se contempla que la invención conlleve determinar que el paciente padece PKU clásica mediante un seguimiento de la concentración plasmática de Phe del individuo. A continuación, el paciente se trata mediante la administración de un régimen combinado de una dieta baja en proteínas y BH4 de tal forma que se produzca al menos una disminución del 25 % en las concentraciones plasmáticas de Phe del paciente. Preferentemente, la invención producirá una disminución de un 30 % en la concentración plasmática de Phe. Incluso más preferiblemente, la invención producirá una disminución del 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o más en la concentración plasmática de Phe del individuo (por ejemplo, donde un paciente con PKU clásica grave tiene una concentración de Phe de 4800  $\mu\text{M/l}$ , una disminución del 90 % en la concentración de Phe producirá una concentración de Phe en plasma de 480  $\mu\text{M/l}$ , una concentración que es suficientemente baja para necesitar poca restricción dietética). Por supuesto, se deberá entender que el tratamiento de acuerdo con la presente invención (tanto para tratar la PKU clásica grave o cualquier otra HPA descrita en el presente documento), deberá intentar disminuir las concentraciones plasmáticas de Phe del paciente hasta niveles cercanos a 360  $\mu\text{M/l} \pm 15 \mu\text{M/l}$  tanto como sea posible.

En realizaciones preferidas, las concentraciones plasmáticas de Phe del paciente de PKU clásica en tratamiento se reduce desde cualquier cantidad de concentración plasmática de Phe no restringida que es mayor de 1000  $\mu\text{M/l}$  a cualquier nivel plasmático de Phe que sea inferior a 600  $\mu\text{M/l}$ . Por supuesto, incluso si el tratamiento combinado con la BH4 y la dieta con restricción de proteínas produce una menor disminución en la concentración plasmática de Phe, *por ejemplo*, a un nivel entre 800  $\mu\text{M/l}$  y aproximadamente 1200  $\mu\text{M/l}$ , esto se considerará un resultado clínicamente útil del tratamiento porque los pacientes que tienen una concentración plasmática de Phe que está en dicho intervalo pueden gestionar la enfermedad simplemente restringiendo la cantidad de proteína en la dieta, en oposición a ingerir una dieta restringida en Phe, dando por tanto como resultado una notable mejora en la calidad de vida del individuo, así como conduciendo a un mayor cumplimiento del paciente con la restricción dietética.

Cualquier aumento en la cantidad de niveles de Phe en la dieta que el paciente pueda tolerar como resultado del tratamiento se considerará un resultado terapéuticamente eficaz. Por ejemplo, se contempla que como resultado de administrar el tratamiento basado en BH4, el paciente podrá aumentar su ingesta de Phe de la dieta desde 250-350 mg/día hasta 350-400 mg/día (es decir, es decir, el fenotipo de tolerancia a Phe del paciente se altera desde un paciente de PKU clásico a un paciente de PKU moderado). Por supuesto, sería preferible que la intervención terapéutica enseñada en el presente documento permitiera al paciente aumentar su ingesta de Phe en la dieta desde 250-350 mg/día a 400-600 mg/día, (es decir, el fenotipo de tolerancia a Phe del paciente se altera desde un paciente de PKU clásico a un paciente de PKU leve), o incluso más preferiblemente, para permitir al paciente tener una ingesta superior a 600 mg/día de Phe/día (es decir, una ingesta dietética normal).

#### B. Características de los pacientes de PKU no sensibles a BH4 y tratamiento de los mismos de acuerdo con la presente invención.

Un segundo grupo de pacientes que se puede tratar con los métodos de la presente invención son aquellos individuos para los que se ha determinado que tienen concentraciones plasmáticas de Phe elevadas, es decir, cualquier concentración que sea mayor de 200  $\mu\text{M/l}$ , pero que se han diagnosticado como no sensibles al

tratamiento con BH4 (como se determina mediante el ensayo de carga de BH4 descrito a continuación). Dichos pacientes pueden incluir aquellos individuos que tienen una pK leve (es decir, concentraciones plasmáticas de Phe de hasta 600  $\mu\text{M/l}$ ), individuos que tienen una PKU moderada (es decir, concentraciones plasmáticas de Phe de entre 600  $\mu\text{M/l}$  a aproximadamente 1200  $\mu\text{M/l}$ ), así como pacientes que tienen la PKU clásica grave (es decir, concentraciones plasmáticas de Phe que son mayores de 1200  $\mu\text{M/l}$ ).

Los pacientes que no son sensibles al tratamiento con BH4 reciben BH4 junto con una cantidad reducida de proteína en su dieta para disminuir las concentraciones plasmáticas de Phe del paciente. Los métodos de la presente invención son tales que la administración del tratamiento con BH4 produce una gran disminución en las concentraciones plasmáticas de Phe del paciente en comparación con la disminución que se produce con el mismo protocolo dietético administrado en ausencia del tratamiento con BH4.

En realizaciones preferidas, los pacientes reciben una composición que comprende una forma cristalina estabilizada de BH4 caracterizada en el Ejemplo 2 que se describe más adelante en el presente documento. Esta composición de BH4 se diferencia de las anteriormente disponibles en la técnica en que es más estable a temperatura ambiente que las preparaciones anteriormente conocidas de los expertos en la técnica, por ejemplo, las disponibles en los kits de carga de BH4 (Schircks Laboratories, Jona, Suiza). Por tanto, la formulación de BH4 se puede almacenar tanto a temperatura ambiente o refrigerada y retiene mayor potencia que las composiciones de BH4 anteriormente disponibles. De este modo, se contempla que esta forma de BH4 tendrá mayor eficacia terapéutica que una concentración similar de las composiciones de BH4 anteriormente disponibles. Esta mayor eficacia se puede utilizar para producir un resultado terapéuticamente eficaz incluso en los pacientes que previamente se identificaron como no sensibles a BH4.

Como en el caso de los pacientes descritos en la Sección IA anterior, los pacientes no sensibles a BH4 descritos en la presente sección se pueden tratar mediante las composiciones de BH4 estabilizadas tanto solas o junto con restricciones dietéticas. Las restricciones dietéticas pueden ser una dieta que restringe la ingesta de Phe proporcionando una fórmula proteica médica sintética que tiene una cantidad disminuida de Phe o, alternativamente, la restricción dietética puede ser una que simplemente requiera que el paciente limite su ingesta de proteínas total pero que sin embargo permite al paciente comer alimentos normales en cantidades limitadas.

Los resultados terapéuticos preferidos para los pacientes de PKU clásica en la sección IA anterior se incorporan en la presente sección como referencia. Los resultados terapéuticos preferidos para los pacientes con PKU moderada (es decir, pacientes que tienen una concentración plasmática de Phe no restringida de 600  $\mu\text{M/l}$  a 1200  $\mu\text{M/l}$ ) incluyen al menos una disminución del 25 % en las concentraciones plasmáticas de Phe del paciente. Preferentemente, el método producirá una disminución de un 30 % en la concentración plasmática de Phe. Incluso más preferiblemente, el método producirá una disminución del 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o más en la concentración plasmática de Phe del individuo (por ejemplo, donde un paciente con PKU clásica moderada tiene una concentración de Phe de 1000  $\mu\text{M/l}$ , una disminución del 90 % en la concentración de Phe producirá una concentración de Phe en plasma de 100  $\mu\text{M/l}$ , una concentración que es suficientemente baja para necesitar poca restricción dietética).

En realizaciones preferidas, las concentraciones plasmáticas de Phe del paciente de PKU moderada en tratamiento se reduce desde cualquier cantidad de concentración plasmática de Phe no restringida que está entre 600  $\mu\text{M/l}$  y 1200  $\mu\text{M/l}$  a cualquier nivel plasmático de Phe que sea inferior a 300  $\mu\text{M/l}$ . Un tratamiento especialmente preferido con la BH4 (tanto en solitario como junto con una restricción dietética) produce una disminución en la concentración plasmática de Phe, por ejemplo, a un nivel entre 200  $\mu\text{M/l}$  y aproximadamente 400  $\mu\text{M/l}$ , que se considerará un resultado clínicamente útil del tratamiento porque los pacientes que tienen una concentración plasmática de Phe que está en dicho intervalo pueden gestionar la enfermedad simplemente restringiendo la cantidad de proteína en la dieta, en oposición a ingerir una dieta restringida en Phe. De hecho, en muchos estudios, se enseña que estos pacientes pueden incluso tomar una dieta normal.

Cualquier aumento en la cantidad de niveles de Phe en la dieta que el paciente pueda tolerar como resultado del tratamiento se considerará un resultado terapéuticamente eficaz. Por ejemplo, se contempla que, como resultado de administrar el tratamiento basado en BH4 (tanto solo como junto con otra intervención terapéutica), el paciente podrá aumentar su ingesta de Phe de la dieta desde 350-400 mg/día hasta 400-600 mg/día (es decir, el fenotipo de tolerancia a Phe del paciente se altera desde un paciente de PKU moderado a un paciente de PKU leve). Por supuesto, sería preferible que la intervención terapéutica enseñada en el presente documento permitiera al paciente aumentar su ingesta de Phe en la dieta desde 350-400 mg/día a 400 para permitir que el paciente pueda tener una ingesta mayor de 600 mg de Phe por día (es decir, una ingesta dietética normal).

Incluso si el paciente que va a tratarse es uno que manifiesta solamente una PKU leve, es decir, tiene una admisión dietética de 400-600 mg de ingesta de Phe/día) se beneficiará de los tratamientos basados en BH4 de la presente invención porque es deseable producir una concentración plasmática de Phe normalizada tan cercana a 360  $\mu\text{M/l} \pm 15 \mu\text{M/l}$  como sea posible. Para este tipo de pacientes, un resultado terapéutico preferido incluirá al menos una disminución del 25 % en las concentraciones plasmáticas de Phe del paciente. Preferentemente, el método

producirá una disminución de un 30 % en la concentración plasmática de Phe. Incluso más preferiblemente, el método producirá una disminución del 40 %, 50 %, 60 %, o más en la concentración plasmática de Phe del individuo (por ejemplo, donde un paciente con PKU leve tiene una concentración de Phe de 600 µM/l, una disminución del 60 % en la concentración de Phe producirá una concentración de Phe en plasma de 360 µM/l, es decir, una concentración plasmática de Phe normal y aceptable).

En realizaciones preferidas, las concentraciones plasmáticas de Phe del paciente de PKU leve en tratamiento se reduce desde cualquier cantidad de concentración plasmática de Phe sin restringir que está entre 400 µM/l y 600 µM/l a cualquier nivel plasmático de Phe que sea inferior a 100 µM/l. Por supuesto, incluso si el tratamiento con la BH4 (tanto en solitario como junto con una restricción dietética) produce una disminución en la concentración plasmática de Phe menor, por ejemplo, a un nivel entre 200 µM/l y aproximadamente 400 µM/l, esto se considerará un resultado clínicamente útil del tratamiento.

Cualquier aumento en la cantidad de niveles de Phe en la dieta que el paciente pueda tolerar como resultado del tratamiento se considerará un resultado terapéuticamente eficaz. Por ejemplo, se contempla que, como resultado de administrar el tratamiento basado en BH4 (tanto solo como junto con otra intervención terapéutica), el paciente podrá aumentar su ingesta de Phe de la dieta desde 400-600 mg/día (es decir, el fenotipo de tolerancia del paciente se altera desde un paciente con PKU leve a un paciente con HPA leve) que permite al paciente tener una ingesta superior a 600 mg de Phe/día (es decir, una ingesta dietética normal).

Adicionalmente, incluso si el paciente es uno que solamente manifiesta los síntomas de HPA no PKU, es decir, tiene una concentración plasmática de Phe elevada de hasta 600 µM/l, pero por otra parte puede comer una dieta normal en proteínas, se beneficiará de los tratamientos con de la invención porque se ha demostrado que concentraciones de Phe elevadas tienen efectos significativos sobre el CI de dichos individuos. Además, tal como se analiza más adelante, la intervención terapéutica basada en BH4 de los sujetos con necesidades especiales, por ejemplo, mujeres embarazadas y bebés, es especialmente importante incluso si los niveles plasmáticos de Phe del paciente está en el nivel considerado "seguro" inferior a 200 µM/l.

C. PKU materna y tratamiento de la misma de acuerdo con la presente invención.

El control metabólico de los niveles plasmáticos de Phe en mujeres con PKU que planifican la concepción y aquellas embarazadas es importante debido a las graves consecuencias para el feto expuesto incluso a niveles moderadamente elevados de Phe *in utero*, independientemente el estado de PAH del feto. El control terapéutico de la concentración plasmática de Phe es especialmente importante en el primer trimestre del embarazo, ya que, si no se consigue un control adecuado, esto dará como resultado trastornos incluyendo microcefalia, deficiencia mental y cardiopatía congénita.

Por ejemplo, la declaración de consenso de los NIH (Vol 17 n.3, octubre de 2000) sobre la fenilcetonuria notificó que la exposición de un feto a niveles de Phe maternos de 3-10 mg/dl produjo una incidencia del 24 % de microcefalia, mientras que los expuestos a más de 20 mg/dl (es decir, más de 1200 µM/l) tuvieron un 73 % de incidencia de microcefalia. Del mismo modo, se descubrió la cardiopatía congénita en el 10 % de niños expuestos a niveles de Phe maternos mayores de 20 mg/dl. De forma importante, se ha demostrado que los niveles de Phe superiores a 6 mg/dl disminuyen significativamente el CO del niño. Por tanto, es obligatorio garantizar que la concentración plasmática de Phe de la mujer con todas las formas de la fenilcetonuria, incluso las que manifiestan la HPA más leve, debe estar rigurosamente controlada para evitar el riesgo se síndrome de PKU materna. Sin embargo, los niveles diana aceptables para las concentraciones plasmáticas de Phe de mujeres con PKU que se han usado en las clínicas estadounidenses están comprendidas entre 10 mg/dl y 15 mg/dl, que son mucho más elevados que los niveles de 2-6 mg/dl recompensados para las mujeres embarazadas o los 1-4 mg/dl que se utilizan en las clínicas británicas y alemanas para disminuir el riesgo de desarrollar el síndrome de PKU materno.

Otra consideración importante para las mujeres embarazadas es su ingesta de proteínas totales. Durante el embarazo, es importante que la mujer tome proteínas suficientes porque se ha sugerido que una dieta baja en proteínas durante el embarazo dará como resultado un retraso en el desarrollo renal y la consiguiente reducción en el número de nefronas y potencialmente conduce a la hipertensión en el adulto. (D'Agostino, N. Engl. J. Med. 348(17)1723-1724, 2003). La siguiente tabla proporciona directrices ilustrativas para la ingesta recomendada de proteínas totales en la dieta para diferentes individuos.

Tabla: Directrices estadounidenses para los requisitos de proteínas en la dieta

	Edad	Ingesta recomendada de proteínas totales (g)
Bebé	6 meses o menos	13
	6 meses-1 año	14
	1-3 años	16
Niños	4-6 años	24
	7-10 años	28
Hombres	11-14 años	45

	Edad	Ingesta recomendada de proteínas totales (g)
	15-18 años	59
	19-24	58
	25-50	63
	51+	63
Mujeres	11-14 años	46
	15-18 años	44
	19-24	46
	25-50	50
	51+	50
Embarazadas		60
Lactantes		65

La cantidad real de proteínas ingeridas depende del contenido en Phe de la proteína. Los perfiles de aminoácidos de las proteínas de origen vegetal son diferentes de las proteínas de origen animal. Por ejemplo, centrándose el almidones y hortalizas, una regla general de 45-50 mg/Phe por gramo de proteína puede ser suficiente. Sin embargo, una norma aceptada para evaluar los aminoácidos componentes de una proteína es una clara de huevo, que contiene 3,5 gramos de proteína, de los que 204 mg es Phe.

Como puede verse en las directrices ilustrativas anteriores, en Estados Unidos, la ingesta recomendada de proteínas para mujeres en edad de procrear (por ejemplo, menos de 51) es de aproximadamente 44 a 50 g/día, mientras que las mujeres embarazadas tienen una ingesta recomendada de aproximadamente 60 g/día. En Canadá y Reino Unido, la ingesta recomendada de proteínas para mujeres embarazadas es de aproximadamente 70 g/día y 52 g/día. Por tanto, la necesidad de garantizar que los niveles de concentración plasmática de Phe de las mujeres embarazadas está rigurosamente controlada se complica adicionalmente porque este grupo de pacientes de PKU requiere más proteínas que las mujeres no embarazadas con PKU de edad comparable.

A la vista de lo anterior, se contempla que los tratamientos basados en BH4 de la presente invención pueden ser especialmente útiles en las mujeres embarazadas. Se contempla que una mujer que padece de cualquier forma de HPA que está embarazada o que planea quedarse embarazada iniciará un ciclo de tratamiento con BH4 para garantizar que sus niveles de concentración plasmática de Phe se mantienen tan cercanos a de 180 µM/l a aproximadamente 360 µM/l como sea posible. Dicho ciclo de tratamiento permitirá preferentemente que la mujer aumenta su nivel de ingesta normal de proteínas.

La discusión sobre los niveles de concentraciones plasmáticas de Phe y los grados a los que dichas concentraciones de Phe se deberían disminuir analizados anteriormente en el presente documento en las Secciones IA y IB se incorporan en la presente sección para mujeres embarazadas.

D. Gestión de la PKU en bebés y tratamiento de los mismos de acuerdo con la presente invención.

Como se ha analizado detalladamente en el presente documento, se ha determinado que una elevación en la concentración plasmática de Phe en bebés (edades de cero a 3 años de edad) da como resultado una disminución significativa en el CI del niño. Sin embargo, como se ha analizado en otra parte de la memoria descriptiva, los pacientes que tienen una concentración plasmática de Phe elevada de cualquiera hasta 400 µM/l no suelen recibir ninguna intervención dietética. Por tanto, los bebés con edades de 0 a 3 años de edad padecen efectos perjudiciales significativos de los actuales tratamientos. La presente solicitud contempla el tratamiento de cualquier bebé que tenga una concentración plasmática de Phe no restringida que sea mayor de 360 µM/l ± 15 µM/l con una composición terapéutica que comprende BH4 con el fin de producir una disminución en la concentración plasmática de Phe de dicho sujeto.

En realizaciones preferidas, los bebés con edades entre cero y 3 años de edad tienen una concentración plasmática de Phe no restringida de aproximadamente 1200 µM/l antes de administrar la BH4 y dicha administración disminuye la concentración plasmática de Phe. Preferentemente, la concentración plasmática de Phe disminuye desde más de 1800 a aproximadamente 1500 µM/l, aproximadamente 1200 µM/l, aproximadamente 1100 µM/l, aproximadamente 1000 µM/l, aproximadamente 900 µM/l, aproximadamente 800 µM/l, aproximadamente 700 µM/l, aproximadamente 600 µM/l, aproximadamente 550 µM/l, aproximadamente 500 µM/l, aproximadamente 450 µM/l, 400 µM/l, aproximadamente 350 µM/l, aproximadamente 300 µM/l, aproximadamente 275 µM/l, aproximadamente 250 µM/l tras la administración. En otras realizaciones, el bebé tiene una edad entre 0 y 3 años de edad y tiene una concentración plasmática de Phe no restringida mayor de 1200 µM/l y preferentemente, esta concentración plasmática de Phe disminuye a aproximadamente 800 µM/l, o más preferiblemente a aproximadamente 500 µM/l o incluso más preferentemente a aproximadamente 360 µM/l tras administrar la BH4, tanto sola como combinada con una dieta. Los expertos en la materia entenderán que la invención contempla el tratamiento de bebés con concentraciones plasmáticas de Phe no restringidas mayores de 360 µM/l con BH4 para producir disminuciones en dichas concentraciones plasmáticas de Phe. El análisis de las reducciones terapéuticas de las concentraciones plasmáticas de Phe en las Secciones IA y IB anteriores se han incorporado como referencia en el presente

documento. Además, cualquier disminución mayor al 10 % de la concentración plasmática de Phe no restringida se considerará un resultado terapéutico para los regímenes terapéuticos de estos bebés. Se deberá entender que los tratamientos con BH4 se pueden combinar con restricciones dietéticas para conseguir la disminución terapéutica en las concentraciones plasmáticas de Phe en dichos bebés.

## II. Composiciones para uso en el tratamiento

La presente invención contempla la intervención terapéutica de PKU/HPA. Dicha intervención está basada inicialmente en el uso de BH4. La BH4 se puede usar sola o junto con restricciones dietéticas. Además, la BH4 y/o las restricciones dietéticas pueden combinarse además con otras composiciones terapéuticas que están diseñadas, por ejemplo, para combatir otras manifestaciones de la PKU, tales como, por ejemplo, aminoácidos neutros grandes para evitar la acumulación de Phe en el cerebro (véase Koch et al., Mol. Genet. Metabol. 79:110-113, 2003) o el suplemento de tirosina. La presente sección proporciona un análisis de las composiciones que se pueden utilizar en los tratamientos considerados en el presente documento.

### A. Composiciones de BH4

BH4 es un factor de la hidroxilación de la Phe y, antes de la presente invención, se demostró que menos del 2 % de los pacientes con una cantidad elevada de Phe al nacer tienen defectos en la síntesis de BH4. Para estos individuos, que se identificaron como sensibles a la BH4, se sugirió que los pacientes no serían sensibles a una intervención dietética y, por tanto, dichos individuos se alimentaban con una dieta normal, pero se les proporcionaba solamente un tratamiento con BH4. Por tanto, antes de la presente invención, existía mucho escepticismo en la técnica sobre los beneficios terapéuticos de la administración de BH4 a pacientes de PKU/HPA. Sin embargo, como se ha analizado detalladamente en el presente documento, BH4 se puede administrar para una intervención terapéutica en pacientes que han recibido un diagnóstico de insensibilidad a BH4. Además, los presentes inventores muestran que el tratamiento con BH4 se puede combinar con restricciones dietéticas para producir un resultado terapéutico tanto en individuos que son sensibles a un ensayo de carga de BH4 como en individuos que no son sensibles a una carga de BH4.

Cada una de las patentes de Estados Unidos con números 5.698.408; 2.601.215; 3505329; 4.540.783; 4.550.109; 4.587.340; 4.595.752; 4.649.197; 4.665.182; 4.701.455; 4.713.454; 4.937.342; 5.037.981; 5.198.547; 5.350.851; 5.401.844; 5,698,408 y la solicitud canadiense CA 2420374 describe métodos para fabricar dihidrobiopterinas, BH4 y derivados de las mismas que se pueden usar de acuerdo con la presente invención. Cualquiera de dichos métodos se puede utilizar para producir composiciones de BH4 para su uso en la presente invención.

Cada una de las patentes de Estados Unidos con números 4.752.573; 4.758.571; 4.774.244; 4.920.122; 5.753.656; 5.922.713; 5.874.433; 5.945.452; 6.274.581; 6.410.535; 6.441.038; 6.544.994; y publicaciones de patentes estadounidenses US 20020187958; US 20020106645; US 2002/0076782; US 20030032616 describen métodos para administrar composiciones de BH4 para tratamientos no de PKU. Cada una de dichas patentes proporciona una enseñanza general de los métodos de administrar composiciones de BH4 conocidas de los expertos en la materia, que se pueden adaptar para el tratamiento de la PKU/HPA tal como se describe en el presente documento.

Además de los métodos generales anteriores para fabricar BH4, la presente invención contempla especialmente el uso de una composición de BH4 que es una composición de BH4 estabilizada. Preferentemente, la composición de BH4 estabilizada está en forma cristalina. Los métodos para fabricar las composiciones de BH4 estabilizadas para su uso en la invención se describen en el Ejemplo 2. Dicha forma cristalina puede demostrar su utilidad como aditivo en las fórmulas de proteína convencionales para el tratamiento de la PKU. La forma cristalina también puede conformarse convenientemente en comprimidos, polvo, o cualquier otra forma sólida para administración oral. Las formas y rutas para administración de BH4 se analizan con mayor detalle en la sección siguiente Composiciones farmacéuticas.

En realizaciones preferidas, se contempla que la invención proporcionará a un paciente que lo necesita una cantidad diaria entre aproximadamente 10 mg/kg y aproximadamente 20 mg/kg de BH4. Por supuesto, un el experto en la técnica puede ajustar esta dosis puede ajustar hacia arriba o hacia abajo dependiendo de la eficacia a conseguir mediante la administración. La dosis diaria se puede administrar en una única dosis o alternativamente se puede administrar en varias dosis en intervalos adecuadamente separados. En realizaciones ilustrativas, la dosis diaria puede ser de 5 mg/kg, 6 mg/kg, 7 mg/kg, 8 mg/kg, 9 mg/kg, 10 mg/kg, 11 mg/kg, 12 mg/kg, 13 mg/kg, 14 mg/kg, 15 mg/kg, 16 mg/kg, 17 mg/kg, 18 mg/kg, 19 mg/kg, 20 mg/kg, 22 mg/kg, 24 mg/kg, 26 mg/kg, 28 mg/kg, 30 mg/kg, 32 mg/kg, 34 mg/kg, 36 mg/kg, 38 mg/kg, 40 mg/kg, 42 mg/kg, 44 mg/kg, 46 mg/kg, 48 mg/kg, 50 mg/kg, o más mg/kg.

Independientemente de la cantidad de BH4 administrada, es deseable que la administración disminuya la concentración plasmática de Phe de los pacientes hasta las concentraciones analizadas en la Sección I para los diversos tipos de pacientes.

## B. Proteína de la dieta

Además de administrar BH4 y análogos relacionados a pacientes de HPA/PKU, se contempla que la proteína en la dieta de los pacientes también se debe restringir o modificar. Los expertos en la materia conocen las diferentes fórmulas de proteínas comercialmente disponibles para su uso en el tratamiento de la PKU. Dichas fórmulas incluyen MAXIMAID, PHENEX 1, PHENEX 2 (Ross Laboratories, Liverpool, Reino Unido), LOFENALAC, PHENYL-FREE (Mead-Johnson), y similares.

Los expertos en la técnica pueden utilizar las fórmulas de proteínas citadas, que generalmente están exentas de concentraciones de Phe. Las fórmulas de proteínas frecuentemente están complementadas con aminoácidos para los que los pacientes de PKU suelen mostrar carencias. Dichos aminoácidos incluyen, por ejemplo, L-tirosina, y L-glutamina. Se ha sugerido que puede ser deseable suplementar la dieta de los pacientes de PKU con valina, isoleucina y leucina (véase la patente de Estados Unidos n.º 4.252.822). En algunas manifestaciones clínicas, los efectos de la PKU están causados por el bloqueo de la recaptación de otros aminoácidos como la tirosina y triptófano que se produce en el cerebro. Se ha descubierto que al suplementar la dieta de un paciente de PKU con un exceso de dichos aminoácidos grandes neutros se bloquea la captación de Phe en el cerebro y se disminuyen los niveles de Phe en el cerebro. Por tanto, se contempla que, para la presente invención, el régimen dietético puede complementarse además con composiciones que comprenden uno o más de estos aminoácidos (Koch et al., Mol. Genet. Metabol. 79:110-113, 2003).

Además, es sabido que L-carnitina y taurina, que se encuentran normalmente se encuentran en la leche humana y en otros alimentos de origen animal también deben suplementarse además de la restricción de proteínas. En determinadas realizaciones, la L-carnitina se puede suministrar a 20 mg/100 g de suplemento de proteínas, y la taurina se puede suministrar a 40 mg/100 g de suplemento de proteínas para ayudar a complementar las cantidades de estos factores que normalmente se encuentran en la leche y alimentos de origen animal.

Además, los expertos en la materia deben consultar las ingestas dietéticas de referencia del 2000 National Academy of Sciences-National Research Council para un listado adicional de otros componentes, tales como vitaminas y minerales esenciales que deben suministrarse al paciente para garantizar que se proporcionan otros suplementos a pesar de la restricción de proteínas en la dieta.

Consultando la Tabla presentada en la Sección IC anterior para las cantidades totales de proteínas y las cifras presentadas en la Sección de forma general para las concentraciones plasmáticas de Phe deseadas, el experto en la técnica podrá determinar la cantidad de restricción de proteínas en la dieta que se necesita y, por tanto, ajustar de acuerdo con ello la dieta del paciente. Tomando, por ejemplo, un varón de aproximadamente 11-14 años de edad, el individuo debería recibir preferentemente 45 g de proteína/día. En el caso en que el individuo sea una persona que tiene la PKE clásica grave, su concentración plasmática de Phe no restringida será mayor de 1200 µM/l, y es probable que la mayoría, sino la totalidad de las fuentes de proteínas de la dieta de dicho individuo, provenga de un suplemento de proteínas en polvo, lo que preferiblemente disminuye sus concentraciones plasmáticas de Phe a menos de 600 µM/l. Mediante la administración de BH4 a dicho sujeto, un resultado terapéutico será uno que produce una mayor disminución en las concentraciones plasmáticas de Phe del paciente o, alternativamente, el resultado terapéutico es uno en que las concentraciones plasmáticas de Phe del individuo se disminuyen en un grado similar, pero dicho individuo puede tolerar las proteínas de una dieta normal en lugar de una fórmula dietética.

De manera similar, un varón de aproximadamente 11-14 años de edad, es uno que tiene una PKU moderada, puede ser posible utilizar la presente invención para proporcionarle los 45 g proteínas/día asignados mediante una ingesta proteica normal en lugar de una fórmula restringida. Determinar si la invención es eficaz conllevará determinar las concentraciones plasmáticas de Phe del paciente de forma regular para garantizar que las concentraciones plasmáticas de Phe permanecen por debajo de al menos 400 µM/l. Los ensayos para determinar dichas concentraciones se describen a continuación. Preferentemente, se pueden conseguir concentraciones inferiores a o de aproximadamente 360 µM/l.

## III. Identificar y controlar poblaciones de pacientes

Como se ha analizado detalladamente en el presente documento, será necesario en varias realizaciones de la presente invención determinar si un paciente dado es sensible al tratamiento con BH4, y para determinar las concentraciones de fenilalanina del paciente tanto inicialmente para identificar la clase de paciente con PKU a tratar y durante un régimen terapéutico en curso para monitorizar la eficacia del régimen. Ejemplos de dichos métodos se describen más adelante en el presente documento.

### A. Ensayo de carga de BH4

Para identificar un paciente como sensible a BH4, los expertos en la materia realizan un ensayo de "carga de BH4". Se han utilizado dos tipos de ensayos de carga para realizar el diagnóstico diferencial de la HPA. El primero es un mero ensayo de carga de BH4 por vía oral y el segundo es un ensayo de carga de fenilalanina/BH4 combinado.

En el ensayo de carga de BH4 más sencillo, se administra BH4 exógena, y se determinan los efectos de esta administración sobre la disminución de las concentraciones plasmáticas de Phe. Se propuso inicialmente una carga intravenosa de 2 mg/kg de BH4 en Danks et al., (Lancet 1:1236, 1976), a medida que se ha dispuesto de BH4 de mayor pureza, ha sido posible realizar la prueba usando una administración oral de BH4 en cantidades de aproximadamente 2,5 mg/kg de peso corporal. Finalmente, se propuso en Niederwieser et al. un enfoque normalizado, en el que se administra una única dosis oral de 7,5 mg/kg de BH4 (Eur. J. Pediatr. 138:441, 1982), aunque algunos laboratorios siguen utilizando hasta 20 mg de BH4/kg de peso corporal. Este ensayo permite diferenciar entre pacientes que tienen HPA ocasionada por un déficit en la BH4 o por una deficiencia en la PAH.

Para que el ensayo de carga de BH4 simple produzca resultados fiables, los niveles de Phe en sangre del paciente deben ser mayores de 400 µM/l. Por tanto, a veces es normal que el paciente suspenda la dieta de PKU durante los 2 días anteriores a la realización del ensayo de carga. Un kit de ensayo de la BH4 está disponible, y se distribuye por Dr. Schircks Laboratories (Jona, Suiza). Este kit recomienda una dosis de 20 mg de BH4/kg de peso corporal aproximadamente 30 minutos después de tomar una comida normal.

Como se ha indicado anteriormente, la concentración de Phe de un paciente idealmente debe ser mayor de 400 µmol/l para obtener una lectura precisa de BH4. En el ensayo de carga de fenilalanina/BH4 combinada, una administración oral de Phe (100 mg/kg de peso corporal) junto con BH4 (20 mg/kg peso corporal) permite la diferenciación selectiva de todas las deficientes de BH4. Normalmente, la Phe se administra en una dosis oral y va seguida aproximadamente una hora después por la BH4. Los niveles de Phe en plasma se controlan antes, y en intervalo de tiempo adecuados (por ejemplo, 1, 3, 5, 9, 13 y 25 horas) después de la administración de Phe.

Tanto en el ensayo de carga de BH4 simple como en el ensayo de carga de Phe/BH4 combinada, se ha sugerido que una disminución de la Phe en plasma superior al 30 % del valor de la Phe en plasma antes del estímulo con BH4 en las 24 horas posteriores a la carga es indicativo de una sensibilidad a la BH4 (Spaapen et al, Mol. Genet. and Metabol., 78:93-99, 2003).

También se pueden utilizar otros métodos para realizar los ensayos de carga de BH4. Ejemplos de dichos ensayos se describen en, por ejemplo, Muntau et al., (N. Engl. J. Med. 347(26):2002) y Bernegger and Blau (Mol. Genet. Metabol. 77:304-313,2002).

En Bernegger y Blau, los ensayos de carga de BH4 utilizan 20 mg/kg de BH4 y la extracción de sangre para determinación de fenilalanina y tirosina se realiza a las 0,4, 8, y 24 horas para entre pacientes sensibles y no sensibles a BH4. El ensayo se realizadas después de al menos 3 horas de ayuno. Las muestras de orina de neopterin y biopterina se analizan antes del ensayo. Después de una aplicación oral de la BH4 6R (20 mg/kg de peso corporal), se permite una ingesta de alimento normal durante el resto de la prueba. Las muestras de sangre se analizan para realizar mediciones de Phe y Tyr a las 0, 4, 8 y 24 horas. Otra muestra de orina se recoge a las 4-8 horas. La actividad de la dihidropteridina reductasa también se puede medir en cualquier momento durante la prueba. En los pacientes que tienen niveles de fenilalanina en plasma inferiores a 400 µM/l o pacientes que ya siguen una dieta baja en fenilalanina, Bernegger y Blau recomiendan un ensayo de fenilalanina-BH4 combinado ensayo el que se administran 100 mg de Phe/kg de peso corporal por vía oral 3 horas antes de administrar BH4.

Bernegger y Blau calculan la sensibilidad a BH4 como "hidroxilación de la fenilalanina" a las 4 y 8 horas después de la carga, y se expresa como porcentaje de la fenilalanina eliminada. La pendiente (S) de los gráficos de las "tasas de hidroxilación" a 0, 4 y 8 horas se comparan para diferentes productos de BH4 y diferentes grupos de pacientes. La pendiente discrimina entre sujetos no sensibles, poco sensibles y sensibles. Los sujetos poco sensibles (véase la Figure 5 de Bernegger y Blau) necesitan más tiempo para alcanzar los valores de corte de 360 µM/l y en que la eficacia de la BH4 administrada depende de los niveles de fenilalanina iniciales. Estos autores recomiendan que, para algunos pacientes con Phe plasmática inferior a 800 µM/l y para la mayoría de los pacientes con una Phe plasmática mayor de 1200 µM/l, la medida de Phe se realice a las 21 horas. Se puede usar una representación gráfica de Phe/S vs tiempo para estimar el tiempo necesario para alcanzar los valores de Phe plasmática "seguros" inferiores a 360 µM/l.

Muntau et al. (2002) también proporcionan ensayos de carga de BH4 ilustrativos que se pueden utilizar para calcular los tiempos y concentraciones de la administración de BH4. De nuevo, estos autores utilizan un ensayo de carga de Phe/BH4 combinado en el que se proporciona al os pacientes una comida que contiene 100 mg de Phe/kg de peso corporal. Una hora después de la comida, los pacientes reciben una dosis oral de 20 mg/kg de BH4 (Schircks Laboratories). Las concentraciones de fenilalanina en sangre se determinan mediante espectrometría de masas con ionización por electronebulización antes de la carga de Phe, así como antes, y a 4, 8, y 15 horas después de la carga de BH4. Los recién nacidos pueden alimentarse con el pecho, mientras que los pacientes mayores reciben una ingesta de proteínas normalizada (10 mg Phe/kg) a las 6-8 horas de la carga de BH4. Muntau también describe métodos para oxidar la Phe. Después de un ayuno de 4 horas y un ayuno nocturno, se administran por vía oral un total de 6 mg/kg de Phe marcada con <sup>13</sup>C disuelta en una solución de dextrosa. A continuación, se recogen muestras de la respiración durante un periodo de 180 minutos y se almacenan en tubos de vidrio a los que se ha practicado el vacío. Las muestras se analizan a continuación mediante espectrometría de masas con relación de isótopos, y se calcula la recuperación de carbono <sup>13</sup> (Treacy et al., Pediatr. Res. 42:430-5,1997)

Muntau et al. clasifican los pacientes como sensibles a BH4 cuando los niveles de Phe en sangre 15 horas después del estímulo con BH4 han disminuido en más del 30 % del valor obtenido antes de la administración de BH4. Una mejora en la tasa de oxidación de la Phe, determinada por mediciones del dióxido de carbono obtenido durante los 180 minutos del ensayo, se considera significativa cuando el suplemento de BH4 aumenta el valor de la oxidación de Phe en al menos un 15 %.

Los expertos en la materia podrán utilizar cualquiera de los métodos anteriormente citados para determinar si un individuo será sensible a BH4. Sin embargo, los expertos en la materia también pueden conocer otros métodos equivalentes y relacionados para determinar la sensibilidad a BH4, y se pueden utilizar en lugar de los métodos descritos anteriormente.

#### B. Determinación de las concentraciones de Phe

Existen numerosos métodos para determinar la presencia de Phe en sangre (Shaw et al., *Analytical Methods in Phenylketonuria-Clinical Biochemistry*, In Bickett et al. Eds. *Phenylketonuria and Some Other Inborn Errors of Amino Acid Metabolism*, Stuttgart, Georg Thiem Verlag, 47-561971). Normalmente, las concentraciones de fenilalanina y tirosina se determinan a partir del suero de un paciente usando un ensayo fluorométrico. Este ensayo se basa en la formación de sustancias fluorescentes cuando la fenilalanina se calienta con ninhidrina en presencia de leucilalanina (McCaman et al., *J. Lab. Clin. Med.* 59:885-890,1962.)

El método más popular para determinar las concentraciones de Phe es el ensayo de Guthrie en el que recortan discos de papel de filtro que se ha saturado con una muestra de sangre del paciente. Los discos uniformes se incuban en una bandeja de agar que se ha sembrado con *Bacillus subtilis* y que contiene un inhibidor específico del crecimiento de *Bacillus subtilis*. A medida que la fenilalanina se transfiere desde los discos uniformes al agar, la Phe invierte la inhibición del crecimiento bacteriano, proporcionando de esta forma una zona de crecimiento bacteriano que se puede correlacionar con la concentración de fenilalanina por comparación con ensayos similares realizados con discos que contengan cantidades conocidas de Phe.

Otros métodos para cuantificación de la concentración de Phe incluyen HPLC, espectrometría de masas, cromatografía de capa fina y similares. Dichos métodos se pueden utilizar para determinar la concentración plasmática de Phe de un paciente antes del tratamiento y para el seguimiento de la concentración de Phe durante el régimen terapéutico para determinar la eficacia del método.

Se contempla que los niveles de Phe en plasma de los pacientes se controlen en intervalos convenientes (por ejemplo, diariamente, en días alternos o semanalmente) a lo largo de todo el ciclo temporal del régimen terapéutico. Mediante el seguimiento de los niveles de Phe en plasma con dicha regularidad, el especialista podrá evaluar la eficacia del tratamiento y ajustar la BH4 y/o los requisitos de proteínas de la dieta de acuerdo con ello.

#### IV. Terapias combinadas

Algunos métodos de la invención implican el uso combinado de BH4 y restricción de proteínas de la dieta para conseguir un resultado terapéutico en pacientes con diversas formas de HPA. Para conseguir el resultado terapéutico adecuado con las técnicas de combinación contempladas en el presente documento, se administraría por lo general a los sujetos la composición de BH4 y la restricción dietética en una cantidad combinada para producir el resultado terapéutico deseado (es decir, una disminución en la concentración plasmática de Phe y/o la capacidad de tolerar mayores cantidades de ingesta de Phe/proteínas sin producir un aumento paralelo en las concentraciones plasmáticas de Phe). Este proceso puede implicar administrar la composición de BH4 y la composición terapéutica con proteínas de la dieta al mismo tiempo. Esto se puede conseguir mediante la administración de una sola composición o una formulación farmacológica de proteínas que incluye todas las proteínas de la dieta necesarias y que incluye también la BH4 dentro de dicha formulación de proteínas. Como alternativa, la proteína dietética (suplemento o comida proteica normal) se toma a aproximadamente la misma hora que la formulación farmacológica (comprimido, inyección o bebida) de BH4. La BH4 también se puede formular en una barrita de proteínas u otros alimentos como pastelitos, panqueques, tortas, adecuados para su ingestión.

En otras alternativas, el tratamiento con BH4 puede preceder o seguir el tratamiento de la proteína de la dieta en intervalos que varían de minutos a horas. En realizaciones donde las proteínas y las composiciones de BH4 se administran por separado, se debería garantizar de manera general que no transcurra un periodo de tiempo significativo entre el momento de cada administración, de tal manera que la BH4 siga siendo capaz de ejercer un efecto de forma ventajosa sobre el paciente. En tales casos, se contempla que se administraría la BH4 aproximadamente 2-6 horas (antes o después) de la ingesta de las proteínas de la dieta, prefiriéndose más un tiempo de retraso de solo 1 hora. En determinadas realizaciones, se contempla que el tratamiento con la BH4 sea un tratamiento continuo donde una dosis diaria de BH4 se administra al paciente indefinidamente. En otras situaciones, por ejemplo, en mujeres embarazadas que tienen solo las formas más leves de PKU y HPA, puede ser que el tratamiento con BH4 se continúe solo el lapso de tiempo en el que la mujer está embarazada y/o está dando el pecho.

Además, además de los tratamientos basados únicamente en la administración de BH4 y en la regulación de las proteínas de la dieta, la presente invención contempla también el tratamiento combinado con una tercera composición que se dirige específicamente a uno o más de los síntomas de HPA. Por ejemplo, se sabe que el déficit de tirosina producido por HPA da como resultado una deficiencia en los neurotransmisores dopamina y serotonina. Por tanto, en el contexto de la presente invención, se contempla que BH4 y los tratamientos basados en las proteínas de la dieta podrían combinarse además con la administración de los neurotransmisores L-dopa, carbidopa and 5-hidroxitriptófano para corregir los defectos que son el resultado de cantidades disminuidas de tirosina en la dieta

Además, el tratamiento génico con PAH (Christensen et al., Mol. Gent. and Metabol. 76: 313-318, 2002; Christensen et al., La genoterapia, 7:1971-1978, 2000) y fenilalanina amoniaco liasa (PAL Liu et al., Arts. Cells. Blood. Subs and Immob. Biotech. 30(4)243-257, 2002) ha sido contemplado por los expertos en la materia. Dichas técnicas de genoterapia génica se podrían usar junto con los tratamientos de la invención basados en BH4/restricción de proteínas de la dieta. En tratamientos combinados adicionales se contempla que se pueda proporcionar fenilasa como una enzima inyectable para disminuir todavía más las concentraciones en el paciente. Como la administración de fenilasa no generaría tirosina (a diferencia de la administración de PAH), dicho tratamiento seguirá dando como resultado que la tirosina siga siendo un aminoácido esencial para dichos pacientes. Por tanto, el suplemento de la dieta con tirosina puede ser deseable para pacientes que reciben fenilasa en combinación con el tratamiento con BH4.

#### V. Composiciones farmacéuticas

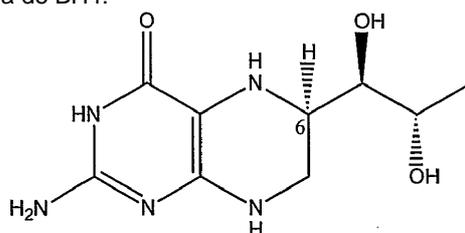
Las composiciones farmacéuticas para la administración de acuerdo con la presente invención pueden comprender una primera composición que comprende BH4 en una forma farmacéuticamente aceptable combinada opcionalmente con un transportador farmacéuticamente aceptable. Estas composiciones se pueden administrar por cualquier medio que consiga sus fines previstos. Las personas normalmente expertas en la técnica para tratar PKU pueden determinar fácilmente las cantidades y regímenes para administrar una composición de acuerdo con la presente invención. Tal como se ha descrito anteriormente, los expertos en la materia emplearían inicialmente las cantidades y regímenes de BH4 propuestas actualmente en un contexto médico, por ejemplo, aquellas composiciones que se proponen para modular la actividad de NOS, o para su uso en el tratamiento del dolor o la depresión, como se analiza en los pacientes relacionados en la Sección II anterior. Cualquiera de los protocolos, formulaciones, rutas de administración y similares descritos que se han usado para administrar BH4 en los ensayos de carga pueden modificarse fácilmente para su uso en la presente invención.

Las composiciones y métodos descritos en el presente documento no están limitados al uso de una forma concreta de BH4. De hecho, se contempla que las composiciones y métodos incluyan todas las composiciones que comprendan cualquier forma de BH4 en una cantidad eficaz para conseguir su fin previsto.

Determinados aspectos terapéuticos de la presente invención contemplan un tratamiento combinado en el que las composiciones de BH4 se administran además de una dieta modificada en sus proteínas, las composiciones farmacéuticas de la invención contemplan también todas las composiciones que comprenden al menos BH4 en una cantidad eficaz para conseguir la mejora de uno o más de los síntomas de PKU cuando se administran junto con las proteínas modificadas de la dieta. Por supuesto, el síntoma más evidente que se puede aliviar es que el tratamiento combinado produce una disminución en la concentración de Phe en plasma, sin embargo, otros síntomas como los cambios en el CI, función ejecutiva, concentración, ánimo, estabilidad conductual, rendimiento laboral y similares, también se pueden vigilar. Dichos indicios se vigilan usando técnicas conocidas por los expertos en la materia.

#### Polimorfos cristalinos de la sal de diclorhidrato de (6R) L-tetrahidrobiopterina

Se ha descubierto que BH4, y en particular, la sal de clorhidrato de BH4, presenta polimorfismo cristalino. A continuación se muestra la estructura de BH4:



La forma (6R) de BH4 es la forma biológicamente activa conocida, sin embargo, se sabe también que BH4 es inestable a temperatura ambiente. Se ha descubierto que un polimorfo cristalino de BH4 es más estable, y es estable a la descomposición en condiciones ambiente.

BH4 es difícil de manipular y por tanto se produce y ofrece en forma de su sal de diclorhidrato (Schircks Laboratories, Jona, Suiza) en ampollas precintadas con nitrógeno para evitar la degradación de la sustancia debido a su naturaleza higroscópica y su a la sensibilidad a la oxidación. La patente de Estados Unidos N.º 4.649.197 divulga que la separación del diclorhidrato de (6R)- y 6(S)-L-eritro-tetrahidrobiopterina en sus diastereómeros es difícil debido a la mala cristalinidad del diclorhidrato de 6(R,S)-L-eritro-tetrahidrobiopterina. La patente europea número 0 079 574 describe la preparación de tetrahidrobiopterina, en la que se obtiene diclorhidrato de tetrahidrobiopterina sólido como compuesto intermedio. S. Matsuura et al. describen en Chemistry Letters 1984, páginas 735-738 y Heterocycles, Vol. 23, n.º 12, 1985 páginas 3115-3120 el diclorhidrato de 6(R)-tetrahidrobiopterina como un sólido cristalino en forma de agujas incoloras, que se caracterizan por el análisis de rayos-X divulgado en J. Biochem. 98, 1341-1348 (1985). Se descubrió una rotación óptica de 6,81° en el producto cristalino, que es muy similar a la rotación óptica de 6,51° notificada para un sólido cristalino en forma de cristales blancos en el ejemplo 6 del documento EP-A2-0 191 335.

Los resultados obtenidos durante el desarrollo del diclorhidrato de (6R)-L-eritro-tetrahidrobiopterina indicaron que el compuesto puede existir en formas cristalinas diferentes, incluyendo formas polimórficas y solvatos. El interés continuado en este campo requiere un método eficaz y fiable para preparar las formas cristalinas individuales del diclorhidrato de (6R)-L-eritro-tetrahidrobiopterina y condiciones de cristalización controladas para proporcionar formas cristalinas que sean preferentemente estables durante la manipulación y el proceso de fabricación y preparación de formulaciones, y que proporcionan una elevada estabilidad en almacenamiento en forma de sustancia o como producto formulado, o que proporcionan formas menos estables adecuadas como compuestos intermedios de cristalización controlada para la fabricación de formas estables.

#### Forma B del polimorfo

El polimorfo cristalino que se ha encontrado que es más estable se denomina en el presente documento "forma B", o alternativamente "polimorfo B". Los resultados obtenidos durante la investigación y el desarrollo del diclorhidrato de (6R)-L-eritro-tetrahidrobiopterina revelaron que existen varios sólidos cristalinos que se han preparado, pero no se ha reconocido el polimorfismo y su efecto sobre la estabilidad de los cristales de BH4.

El polimorfo B es un anhidrato ligeramente higroscópico con la estabilidad termodinámica más elevada por encima de aproximadamente 20 °C. Adicionalmente, la forma B puede procesarse y manipularse fácilmente debido a su estabilidad térmica, posibilidad de preparación en condiciones dirigidas, su adecuada morfología y tamaño de partículas. El punto de fusión está próximo a 260 °C ( $\Delta H_f > 140$  J/g), pero no se puede detectar un punto de fusión evidente debido a la descomposición antes y durante la fusión. Estas propiedades excepcionales vuelven a la forma B del polimorfo especialmente factible para la aplicación farmacéutica, que se preparan a temperaturas elevadas. El polimorfo B puede obtenerse como un polvo fino con un tamaño de partículas que puede variar de 0,2 µm a 500 µm.

La Forma B presenta un modelo de difracción de rayos X en polvo, expresado en valores d (Å): 8,7 (vs), 6,9 (w), 5,90 (vw), 5,63 (m), 5,07 (m), 4,76 (m), 4,40 (m), 4,15 (w), 4,00 (s), 3,95 (m), 3,52 (m), 3,44 (w), 3,32 (m), 3,23 (s), 3,17 (w), 3,11 (vs), 3,06 (w), 2,99 (w), 2,96 (w), 2,94 (m), 2,87 (w), 2,84 (s), 2,82 (m), 2,69 (w), 2,59 (w), 2,44 (w). La Figura 1 es un gráfico del modelo de difracción de rayos X característico presentado por la forma B del diclorhidrato de (6R)-L-eritro-tetrahidrobiopterina.

Tal como se usa en el presente documento, las siguientes abreviaturas entre paréntesis significan: (vs) = intensidad muy fuerte; (s) = intensidad fuerte; (m) = intensidad media; (w) = intensidad débil; y (vw) = intensidad muy débil. En la Figura 1 se presenta un modelo de difracción de rayos X en polvo característico.

Se ha encontrado que otros polimorfos de BH4 tienen una estabilidad química y física satisfactorias para una manipulación segura durante su fabricación y formulación, y proporcionan una estabilidad al almacenamiento elevada en su forma pura o en formulaciones. Además, se ha descubierto que la forma B, y otros polimorfos de BH4 pueden prepararse en cantidades muy grandes (por ejemplo, a escala 100 kilos) y almacenarse durante un periodo prolongado de tiempo.

Todas las formas cristalinas (polimorfos hidratos y solvatos), inclusive la forma B cristalina, pueden utilizarse para la preparación del polimorfo B más estable. Se puede obtener el polimorfo B mediante equilibrio de fases de suspensiones de formas amorfas u otras formas diferentes a la forma B del polimorfo, tales como el polimorfo A, en disolventes polares y no acuosos adecuados. Por tanto, las preparaciones farmacéuticas descritas en el presente documento se refieren a una preparación de la forma B del polimorfo del diclorhidrato de (6R)-L-eritro-tetrahidrobiopterina.

Se pueden convertir otras formas de BH4 en la forma B dispersando la otra forma de BH4 en un disolvente a temperatura ambiente, agitando la suspensión a temperatura ambiente durante un tiempo suficiente para producir la forma B del polimorfo, aislando posteriormente la forma B cristalina y eliminando el disolvente de la forma B aislada. Temperatura ambiente tal como se usa en el presente documento, significan temperaturas en un intervalo de 0 °C to 60 °C, preferentemente 15 °C a 40 °C. La temperatura aplicada puede cambiarse durante el tratamiento y agitación disminuyendo la temperatura por etapas o de forma continua. Los disolventes adecuados para la conversión de

otras formas en la forma B incluyen, pero no de forma limitativa, metanol, etanol, isopropanol, otros alcoholes C3 y C4, ácido acético, acetonitrilo, tetrahidrofurano, metil t-butil éter, 1,4-dioxano, acetato de etilo, acetato de isopropilo, otros acetatos C3-C6, metil etil cetona y otras metil-C3-C5 alquil-cetonas. El tiempo hasta completar la fase de equilibrio puede ser de hasta 30 horas y preferentemente de hasta 20 horas o menos de 20 horas.

Se puede obtener también el polimorfo B mediante cristalización de las mezclas de disolvente que contienen hasta aproximadamente un 5 % de agua, especialmente a partir de mezclas de etanol, ácido acético y agua. Se ha descubierto que la forma B del polimorfo de diclorhidrato de (6R)-L-eritro-tetrahidrobiopterina puede prepararse mediante disolución, opcionalmente a temperaturas elevadas, preferentemente de una forma sólida de menor energía que la forma B o de la forma B del diclorhidrato de (6R)-L-eritro-tetrahidrobiopterina en una mezcla disolvente que comprende etanol, ácido acético y agua, adición de semillas a la solución, enfriamiento de la suspensión obtenida y aislamiento de los cristales formados. La disolución se puede llevar a cabo a una temperatura ambiente de hasta 70 °C, preferentemente hasta 50 °C. Se puede usar la mezcla disolvente final para la disolución o el material de partida puede disolverse en primer lugar en agua y los otros disolventes pueden añadirse a continuación a la vez o uno después del otro. La composición de la mezcla disolvente puede comprender una relación en volumen de agua: ácido acético: tetrahidrofurano de 1: 3: 2 a 1: 9: 4 y preferentemente 1: 5: 4. La solución se agita preferentemente. Enfriar puede significar temperaturas por debajo de -40 °C a 0 °C, preferiblemente hasta de 10 °C a 30 °C. Las semillas adecuadas son la forma B del polimorfo procedente de otro lote o cristales que tengan una morfología similar o idéntica. Tras el aislamiento, la forma B cristalina puede lavarse con un no disolvente tal como acetona o tetrahidrofurano y secarse de una manera normal.

Se puede obtener también el polimorfo B mediante cristalización de las soluciones acuosas a través de la adición de no disolventes tales como metanol, etanol y ácido acético. El procedimiento de cristalización y aislamiento puede llevarse a cabo ventajosamente a temperatura ambiente sin enfriar la solución. Este proceso es por tanto muy adecuado para llevarse a cabo a escala industrial.

En una realización de las composiciones y métodos descritos en el presente documento, se prepara una composición que incluye la forma B del polimorfo del diclorhidrato de (6R)-L-eritro-tetrahidrobiopterina mediante disolución de una forma sólida diferente de la forma B o de la forma B del diclorhidrato de (6R)-L-eritro-tetrahidrobiopterina en agua a temperatura ambiente, añadiendo un no disolvente en cantidad suficiente para formar una suspensión, agitando opcionalmente la suspensión durante un determinado tiempo, y aislando posteriormente los cristales formados. La composición se modifica adicionalmente para obtener una composición farmacéutica como se describe a continuación.

La concentración de diclorhidrato de (6R)-L-eritro-tetrahidrobiopterina en la solución acuosa puede ser de 10 a 80 por ciento en peso, más preferentemente de 20 a 60 por ciento en peso, por referencia a la solución. Los no disolventes preferidos (es decir, los disolventes útiles en la preparación de suspensiones de BH4) son metanol, etanol y ácido acético. El no disolvente puede añadirse a la solución acuosa. Más preferentemente, la solución acuosa se añade al no disolvente. El tiempo de agitación tras la formación de la suspensión puede ser de hasta 30 horas y preferentemente de hasta 20 horas o menos de 20 horas. El aislamiento mediante filtración y secado se lleva a cabo de manera conocida como se ha descrito anteriormente.

La forma B del polimorfo es una forma cristalina muy estable, que fácilmente se puede eliminar mediante filtración, secarse y molerse hasta los tamaños de partículas deseado para las formulaciones farmacéuticas. Estas propiedades excepcionales convierten la forma B del polimorfo en especialmente factible para la aplicación farmacéutica.

#### Forma A del polimorfo

Se ha descubierto que otro polimorfo cristalino del diclorhidrato de (6R)-L-eritro-tetrahidrobiopterina es una forma estable preferida para su uso en una preparación farmacéutica descrita en el presente documento, que se denominará denominarse en el presente documento "forma A", o "polimorfo A." El polimorfo A es ligeramente higroscópico y adsorbe agua hasta un contenido de aproximadamente un 3 por ciento en peso, que se libera continuamente entre 50 °C y 200 °C, cuando se calienta a una velocidad de 10 °C/minuto. El polimorfo A es un anhidrato higroscópico que es una forma metaestable con respecto a la forma B; sin embargo, es estable durante algunos meses en condiciones ambiente si se mantiene en un recipiente bien precintado. La forma A es especialmente adecuada como compuesto intermedio y material de partida para producir formas polimorfas estables. Se puede preparar la forma A del polimorfo como un polvo sólido con un intervalo de tamaño de partículas medio deseado que varía normalmente entre 1 µm y aproximadamente 500 µm.

El polimorfo A presenta un modelo de difracción de rayos X en polvo característico con picos característicos expresados como valores d (Å) de: 15,5 (vs), 12,0 (m) 6,7 (m) 6,5 (m) 6,3 (w), 6,1 (w), 5,96 (w), 5,49 (m) 4,89 (m) 3,79 (m) 3,70 (s), 3,48 (m) 3,45 (m) 3,33 (s), 3,26 (s), 3,22 (m) 3,18 (m) 3,08 (m) 3,02 (w), 2,95 (w), 2,87 (m) 2,79 (w), 2,70 (w). La Figura 2 es un gráfico del modelo de difracción de rayos X característico presentado por la forma A del diclorhidrato de (6R)-L-eritro-tetrahidrobiopterina.

El polimorfo A presenta bandas de espectros Raman características, expresadas en números de onda (cm<sup>-1</sup>) a: 2934 (w), 2880 (w), 1692 (s), 1683 (m) 1577 (w), 1462 (m) 1360 (w), 1237 (w), 1108 (w), 1005 (vw), 881 (vw), 813 (vw), 717 (m) 687 (m) 673 (m) 659 (m) 550 (w), 530 (w), 492 (m) 371 (m) 258 (w), 207 (w), 101 (s), 87 (s) cm<sup>-1</sup>.

5 Se puede obtener la forma A del polimorfo criodesecando o eliminando el agua de soluciones de diclorhidrato de (6R)-L-eritro-tetrahidrobiopterina en agua. La forma A del polimorfo del diclorhidrato de (6R)-L-eritro-tetrahidrobiopterina puede prepararse disolviendo el diclorhidrato de (6R)-L-eritro-tetrahidrobiopterina a temperatura ambiente en agua, (1) enfriando la solución a bajas temperaturas para solidificar la solución, y eliminando el agua a presión reducida, o (2) eliminando el agua de dicha solución.

10 La forma A cristalina puede aislarse mediante filtración y a continuación secarse para evaporar el agua absorbida del producto. Se conocen las condiciones y método de secado y el secado del producto aislado o la eliminación del agua según la variante (2) descrita en el presente documento que puede llevarse a cabo aplicando temperaturas elevadas, por ejemplo, hasta 80 °C, preferentemente en el intervalo de 30 °C a 80 °C, al vacío o a temperaturas elevadas y vacío. Antes de aislar un precipitado obtenido en la variante (2), la suspensión puede agitarse durante un determinado tiempo en la fase de equilibrio. La concentración de diclorhidrato de (6R)-L-eritro-tetrahidrobiopterina en la solución acuosa puede ser de 5 a 40 por ciento en peso, por referencia a la solución.

15 Se prefiere un enfriamiento rápido para obtener soluciones sólidas como material de partida. Se aplica una presión reducida hasta que se elimina completamente el disolvente. La criodesecación es una tecnología bien conocida en la materia. El tiempo hasta completar la eliminación del disolvente es dependiente del vacío aplicado, que puede ser de 0,01 a 1 mbar (1 Pa a 100 Pa), el disolvente utilizado y la temperatura de congelación.

20 La forma A del polimorfo es estable a temperatura ambiente o por debajo de la temperatura ambiente en condiciones sustancialmente exentas de agua, que se demuestra con ensayos de equilibrio de fases de suspensiones en tetrahidrofurano o de butil metil éter terciario agitado durante cinco días y 18 horas respectivamente con nitrógeno a temperatura ambiente. La filtración y el secado al aire a temperatura ambiente dan como resultado la forma A del polimorfo.

25 Forma F del polimorfo

30 Se ha descubierto que otro polimorfo cristalino del diclorhidrato de (6R)-L-eritro-tetrahidrobiopterina es una forma estable preferida para su uso en una preparación farmacéutica descrita en el presente documento, que se denominará en el presente documento "forma F", o "polimorfo F." El polimorfo F es ligeramente higroscópico y adsorbe agua hasta un contenido de aproximadamente un 3 por ciento en peso, que se libera continuamente entre 35 50 °C y 200 °C, cuando se calienta a una velocidad de 10 °C/minuto. El polimorfo F es una forma metaestable y un anhidrato higroscópico, que es más estable que la forma A a menores temperaturas ambiente y menos estable que la forma B a temperaturas superiores y la forma F es especialmente adecuada como compuesto intermedio y material de partida para producir formas polimorfas estables, Se puede preparar la forma F del polimorfo como un polvo sólido con un intervalo de tamaño de partículas medio deseado que varía normalmente entre 1 µm y 40 aproximadamente 500 µm.

45 El polimorfo F presenta un modelo de difracción de rayos X en polvo característico con picos característicos expresados como valores d (Å) de: 17,1 (vs), 12,1 (w), 8,6 (w), 7,0 (w), 6,5 (w), 6,4 (w), 5,92 (w), 5,72 (w), 5,11 (w), 4,92 (m) 4,86 (w), 4,68 (m) 4,41 (w), 4,12 (w), 3,88 (w), 3,83 (w), 3,70 (m) 3,64 (w), 3,55 (m) 3,49 (s), 3,46 (vs), 3,39 (s), 3,33 (m) 3,31 (m) 3,27 (m) 3,21 (m) 3,19 (m) 3,09 (m) 3,02 (m) y 2,96 (m). La Figura 3 es un gráfico del modelo de difracción de rayos X característico presentado por la forma F del diclorhidrato de (6R)-L-eritro-tetrahidrobiopterina.

50 Se puede obtener el polimorfo F mediante el equilibrio de fases de suspensiones de la forma A del polimorfo en un disolvente polar y no acuoso, que apenas disuelve dichas formas de energía más bajas, especialmente alcoholes tales como metanol, etanol, propanol e isopropanol. La forma F del polimorfo del diclorhidrato de (6R)-L-eritro-tetrahidrobiopterina puede prepararse también dispersando partículas de la forma A sólida del diclorhidrato de (6R)-L-eritro-tetrahidrobiopterina en un disolvente acuoso que apenas disuelve dicho diclorhidrato de (6R)-L-eritro-tetrahidrobiopterina por debajo de la temperatura ambiente, agitando la suspensión a dichas temperaturas durante un tiempo suficiente para producir la forma F del polimorfo, aislando posteriormente la forma F cristalina y eliminando el disolvente de la forma F aislada. La eliminación del disolvente y el secado se pueden llevar a cabo al aire, aire seco o una protección de gas seco tal como nitrógeno o gases nobles y a o por debajo de la temperatura ambiente, por ejemplo, hasta 0 °C. La temperatura durante la fase de equilibrio es preferentemente de 5 a 15 °C y lo 55 más preferente aproximadamente 10 °C.

60 Forma J del polimorfo

65 Se ha descubierto que otro polimorfo cristalino del diclorhidrato de (6R)-L-eritro-tetrahidrobiopterina es una forma estable preferida para su uso en una preparación farmacéutica descrita en el presente documento, que se denominará en el presente documento "forma J", o "polimorfo J." El polimorfo J es ligeramente higroscópico y

adsorbe agua cuando se manipula a la humedad del aire. El polimorfo J es una forma metaestable y un anhidrato higroscópico, y se puede transformar posteriormente en la forma E descrita a continuación, a partir de la cual se obtiene tras exposición a condiciones de humedad relativa tales como por encima de un 75 % de humedad relativa. La forma J es especialmente adecuada como compuesto intermedio y material de partida para producir formas polimorfas estables. Se puede preparar la forma J del polimorfo como un polvo sólido con un intervalo de tamaño de partículas medio deseado que varía normalmente entre 1 µm y aproximadamente 500 µm.

El polimorfo J presenta un modelo de difracción de rayos X en polvo característico con picos característicos expresados como valores d (Å) de: 14,6 (m) 6,6 (w), 6,4 (w), 5,47 (w), 4,84 (w), 3,29 (vs), y 3,21 (vs). La Figura 4 es un gráfico del modelo de difracción de rayos X característico presentado por la forma J del diclorhidrato de (6R)-L-eritro-tetrahidrobiopterina.

Se puede obtener el polimorfo J mediante deshidratación de la forma E a temperaturas moderadas bajo vacío. En particular, la forma J del polimorfo de del diclorhidrato de (6R)-L-eritro-tetrahidrobiopterina se puede preparar tomando la forma E y eliminando el agua de la forma E tratando la forma E en un desecador a vacío para obtener la forma J a temperaturas moderadas que pueden significar una temperatura en el intervalo de 25 a 0 °C, y lo más preferente 30 a 50 °C.

#### Forma K del polimorfo

Se ha descubierto que otro polimorfo cristalino del diclorhidrato de (6R)-L-eritro-tetrahidrobiopterina es una forma estable preferida para su uso en una preparación farmacéutica descrita en el presente documento, que se denominará en el presente documento "forma K", o "polimorfo K". El polimorfo K es ligeramente higroscópico y adsorbe agua hasta un contenido de aproximadamente un 2,0 por ciento en peso, que se libera continuamente entre 50 °C y 100 °C, cuando se calienta a una velocidad de 10 °C/minuto. El polimorfo K es una forma metaestable y un anhidrato higroscópico, que es menos estable que la forma B a temperaturas superiores y la forma K es especialmente adecuada como compuesto intermedio y material de partida para producir formas polimorfas estables, en particular la forma B. La forma K del polimorfo puede prepararse como un polvo sólido con un intervalo de tamaño de partículas medio deseado que varía normalmente entre 1 µm y aproximadamente 500 µm.

El polimorfo K presenta un modelo de difracción de rayos X en polvo característico con picos característicos expresados como valores d (Å) de: 14,0 (s), 9,4 (w), 6,6 (w), 6,4 (w), 6,3 (w), 6,1 (w), 6,0 (w), 5,66 (w), 5,33 (w), 5,13 (vw), 4,73 (m) 4,64 (m) 4,48 (w), 4,32 (vw), 4,22 (w), 4,08 (w), 3,88 (w), 3,79 (w), 3,54 (m) 3,49 (vs), 3,39 (m) 3,33 (vs), 3,13 (s), 3,10 (m) 3,05 (m) 3,01 (m) 2,99 (m) y 2,90 (m). La Figura 5 es un gráfico del modelo de difracción de rayos X característico presentado por la forma K del diclorhidrato de (6R)-L-eritro-tetrahidrobiopterina.

Se puede obtener el polimorfo K mediante cristalización en mezclas de disolventes polares que contienen pequeñas cantidades de agua y en presencia de pequeñas cantidades de ácido ascórbico. Los disolventes de la mezcla de disolventes se pueden seleccionar entre ácido acético y un alcohol tal como metanol, etanol, n-propanol o isopropanol. En particular, la forma K del polimorfo de diclorhidrato de (6R)-L-eritro-tetrahidrobiopterina puede prepararse disolviendo el diclorhidrato de (6R)-L-eritro-tetrahidrobiopterina en una mezcla de ácido acético y un alcohol o tetrahidrofurano que contiene pequeñas cantidades de agua y una pequeña cantidad de ácido ascórbico a temperaturas elevadas, disminuyendo la temperatura por debajo de la temperatura ambiente para cristalizar dicho diclorhidrato, aislando el precipitado y secando el precipitado aislado a temperatura elevada, opcionalmente al vacío. Los alcoholes adecuados son por ejemplo metanol, etanol, propanol e isopropanol, por lo que se prefiere el etanol. La relación entre el ácido acético al alcohol o al tetrahidrofurano puede ser de 2:1 a 1:2 y preferentemente de aproximadamente 1:1. La disolución del diclorhidrato de (6R)-L-eritro-tetrahidrobiopterina se puede llevarse a cabo en presencia de un elevado contenido en agua y se puede añadir más cantidad de mezcla de antidisolvente para obtener una precipitación completa. La cantidad de agua en la composición final puede ser de 0,5 al 5 por ciento en peso, y la cantidad de ácido ascórbico puede ser de 0,01 al 0,5 por ciento en peso, ambos en referencia a la mezcla de disolvente. La temperatura de la disolución puede estar comprendida en el intervalo de 30 a 100 y preferentemente de 35 a 70 °C y la temperatura de secado puede estar en el intervalo de 30 a 50 °C. El precipitado se puede lavar en un alcohol tal como etanol tras el aislamiento, por ejemplo, mediante filtración. El polimorfo K se puede convertir fácilmente en la forma más estable B mediante equilibrio de fases en, por ejemplo, isopropanol y opcionalmente sembrando con cristales de la forma B por encima de la temperatura ambiente tal como temperaturas de 30 a 40 °C.

#### Formas hidratadas de la sal de diclorhidrato de (6R) L-tetrahidrobiopterina

Como se describe adicionalmente a continuación, se ha descubierto que el diclorhidrato de (6R)-L-eritro-tetrahidrobiopterina existe como numerosos hidratos cristalinos, que se deberán describir y definir en el presente documento como las formas C, D, E, H, y O. Estas formas de hidrato son útiles como una forma estable de BH4 de los preparados para las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento y la preparación de composiciones que incluyen polimorfos cristalinos estables de BH4.

## Hidrato de forma C

Se ha descubierto que un hidrato cristalino del diclorhidrato de (6R)-L-eritro-tetrahidrobiopterina es una forma estable preferida para su uso en una preparación farmacéutica descrita en el presente documento, que se denominará en el presente documento "forma C", o "hidrato C." El hidrato C es una forma ligeramente higroscópica y tiene un contenido de agua de aproximadamente un 5,5 por ciento en peso, lo que indica que la forma C es un monohidrato. El hidrato C tiene un punto de fusión cercano a 94 °C ( $\Delta H_f$  es aproximadamente 31 J/g) y el hidrato forma C es especialmente adecuado como compuesto intermedio y material de partida para producir formas polimórficas estables. Se puede preparar la forma C del polimorfo como un polvo sólido con un intervalo de tamaño de partículas medio deseado que varía normalmente entre 1  $\mu\text{m}$  y aproximadamente 500  $\mu\text{m}$ .

La forma C presenta un modelo de difracción de rayos X en polvo característico con picos característicos expresados como valores  $d$  (Å) de: 18,2 (m) 15,4 (w), 13,9 (vs), 10,4 (w), 9,6 (w), 9,1 (w), 8,8 (m) 8,2 (w), 8,0 (w), 6,8 (m) 6,5 (w), 6,05 (m) 5,77 (w), 5,64 (w), 5,44 (w), 5,19 (w), 4,89 (w), 4,76 (w), 4,41 (w), 4,25 (m) 4,00 (m) 3,88 (m) 3,80 (m) 3,59 (s), 3,50 (m) 3,44 (m) 3,37 (m) 3,26 (s), 3,19 (vs), 3,17 (s), 3,11 (m) 3,06 (m) 3,02 (m) 2,97 (vs), 2,93 (m) 2,89 (m) 2,83 (m) y 2,43 (m). La Figura 6 es un gráfico del modelo de difracción de rayos X característico presentado por el hidrato forma C del diclorhidrato de (6R)-L-eritro-tetrahidrobiopterina.

El hidrato forma C puede obtenerse mediante equilibrio de fases a temperatura ambiente de una forma de polimorfo tal como una suspensión del polimorfo B en un no disolvente que contiene agua en una cantidad de preferentemente aproximadamente un 5 por ciento en peso, por referencia al disolvente. La forma C del hidrato del diclorhidrato de (6R)-L-eritro-tetrahidrobiopterina puede prepararse suspendiendo el diclorhidrato de (6R)-L-eritro-tetrahidrobiopterina en un no disolvente tal como heptano, alcoholes C1-C4 como metanol, etanol, 1- o 2-propanol, acetatos, tales como acetato de etilo, acetonitrilo, ácido acético u otros éteres tales como tetrahidrofurano, dioxano, terc-butil metil éter, o mezclas binarias o ternarias de dichos no disolventes, a los que se añade el agua suficiente para formar un monohidrato, y agitando la suspensión a temperatura ambiente o inferior (por ejemplo, de 0 a 30 °C) durante un tiempo suficiente para formar un monohidrato. Agua suficiente puede significar de 1 al 10 y preferentemente de 1 al 10 y preferentemente de 3 al 8 por ciento en peso de agua, por referencia a la cantidad de disolvente. Los sólidos se pueden eliminar por filtración y secarse al aire a aproximadamente la temperatura ambiente. El sólido puede absorber parte de agua y tener por tanto un mayor contenido en agua que el valor teórico de 5,5 por ciento en peso. El hidrato forma C es inestable con respecto a las formas B y D, y se convierte fácilmente en el polimorfo forma B a temperaturas de aproximadamente 40 °C en aire y humedad relativa baja. La forma C se puede transformar en el hidrato D, más estable, mediante suspensión en equilibrio a temperatura ambiente.

## Hidrato de forma D

Se ha descubierto que otro hidrato cristalino del diclorhidrato de (6R)-L-eritro-tetrahidrobiopterina es una forma estable preferida para su uso en una preparación farmacéutica descrita en el presente documento, que se denominará en el presente documento "forma D", o "hidrato D." El hidrato D es una forma ligeramente higroscópica y tiene un contenido de agua de aproximadamente 5,0 a 7,0 por ciento en peso, lo que sugiere que la forma C es un monohidrato. El hidrato D tiene un punto de fusión próximo a 153 °C ( $\Delta H_f$  es aproximadamente 111 J/g) y es mucho más estable que la forma C e incluso es estable cuando se expone a la humedad del aire a temperatura ambiente. La forma D del hidrato puede usarse tanto para preparar formulaciones o como compuesto intermedio y materiales de partida para producir formas polimórficas estables. Se puede preparar la forma D del polimorfo como un polvo sólido con un intervalo de tamaño de partículas medio deseado que varía normalmente entre 1  $\mu\text{m}$  y aproximadamente 500  $\mu\text{m}$ .

La forma D presenta un modelo de difracción de rayos X en polvo característico con picos característicos expresados como valores  $d$  (Å) de: 8,6 (s), 6,8 (w), 5,56 (m) 4,99 (m) 4,67 (s), 4,32 (m) 3,93 (vs), 3,88 (w), 3,64 (w), 3,41 (w), 3,25 (w), 3,17 (m) 3,05 (s), 2,94 (w), 2,92 (w), 2,88 (m) 2,85 (w), 2,80 (w), 2,79 (m) 2,68 (w), 2,65 (w), 2,52 (vw), 2,35 (w), 2,34 (w), 2,30 (w), y 2,29 (w). La Figura 7 es un gráfico del modelo de difracción de rayos X característico presentado por el hidrato forma D del diclorhidrato de (6R)-L-eritro-tetrahidrobiopterina.

La forma D del hidrato se puede obtener añadiendo a aproximadamente temperatura ambiente soluciones concentradas de diclorhidrato de (6R)-L-eritro-tetrahidrobiopterina a una cantidad en exceso de un no disolvente tal como hexano, heptano, diclorometano, 1- o 2-propanol, acetona, acetato de etilo, acetonitrilo, ácido acético u otros éteres tales como tetrahidrofurano, dioxano, terc-butil metil éter, o mezclas de dichos no disolventes, y agitando la suspensión a temperatura ambiente. La forma cristalina se puede eliminar por filtración y después secarse bajo atmósfera de nitrógeno seco a temperatura ambiente. Un no disolvente preferido es isopropanol. La adición de la disolución acuosa se puede llevar a cabo gota a gota para evitar una repentina precipitación. La forma D del hidrato del diclorhidrato de (6R)-L-eritro-tetrahidrobiopterina se puede preparar añadiendo a aproximadamente temperatura ambiente soluciones concentradas de diclorhidrato de (6R)-L-eritro-tetrahidrobiopterina a una cantidad en exceso de un no disolvente y agitando la suspensión a temperatura ambiente. Exceso de no disolvente puede significar un promedio de medio acuoso al no disolvente entre 1:10 y 1:1000. La Forma D contiene un pequeño exceso de agua, relacionada con el monohidrato, y se cree que absorbe agua debido a su naturaleza ligeramente higroscópica del hidrato cristalino. El hidrato forma D se considera el más estable de los hidratos conocidos a temperatura ambiente y

a una humedad relativa inferior al 70 %. El hidrato forma F se puede utilizar en las formulaciones preparadas en condiciones en las que este hidrato es estable. Temperatura ambiente puede significar de 20 a 30 °C.

#### Hidrato de forma E

Se ha descubierto que otro hidrato cristalino del diclorhidrato de (6R)-L-eritro-tetrahidrobiopterina es una forma estable preferida para su uso en una preparación farmacéutica descrita en el presente documento, que se denominará en el presente documento "forma E", o "hidrato D." El hidrato D tiene un contenido de agua de aproximadamente 10 a 14 por ciento en peso, lo que sugiere que la forma E es un dihidrato. El hidrato E se forma a temperaturas inferiores a la temperatura ambiente. El hidrato forma E es especialmente adecuada como compuesto intermedio y material de partida para producir formas polimorfas estables. Es especialmente adecuado para producir la forma exenta de agua de la forma J tras secado bajo atmósfera de nitrógeno u opcionalmente al vacío. La forma E no es higroscópica y es estable en humedades relativas relativamente elevadas, es decir, a humedades relativas superiores a aproximadamente 60 % y hasta aproximadamente 85 %. Se puede preparar la forma E del polimorfo como un polvo sólido con un intervalo de tamaño de partículas medio deseado que varía normalmente entre 1 µm y aproximadamente 500 µm.

La forma E presenta un modelo de difracción de rayos X en polvo característico con picos característicos expresados como valores  $d$  (Å) de: 15,4 (s), 6,6 (w), 6,5 (w), 5,95 (vw), 5,61 (vw), 5,48 (w), 5,24 (w), 4,87 (w), 4,50 (vw), 4,27 (w), 3,94 (w), 3,78 (w), 3,69 (m), 3,60 (w), 3,33 (s), 3,26 (vs), 3,16 (w), 3,08 (m), 2,98 (w), 2,95 (m), 2,91 (w), 2,87 (m), 2,79 (w), 2,74 (w), 2,69 (w), y 2,62 (w). La Figura 8 es un gráfico del modelo de difracción de rayos X característico presentado por el hidrato forma E del diclorhidrato de (6R)-L-eritro-tetrahidrobiopterina.

La forma E del hidrato se puede obtener mediante adición de soluciones acuosas concentradas de diclorhidrato de (6R)-L-eritro-tetrahidrobiopterina a una cantidad en exceso de un no disolvente y agitando la suspensión a dichas temperaturas. La forma cristalina se puede eliminar por filtración y después secarse bajo atmósfera de nitrógeno seco a temperatura ambiente. Los no disolventes son, por ejemplo, hexano, heptano, diclorometano, 1- o 2-propanol, acetona, acetato de etilo, acetonitrilo, ácido acético u otros éteres tales como tetrahydrofurano, dioxano, terc-butil metil éter, o mezclas de dichos no disolventes. Un no disolvente preferido es isopropanol. La adición de la disolución acuosa se puede llevar a cabo gota a gota para evitar una repentina precipitación. La forma E del hidrato del diclorhidrato de (6R)-L-eritro-tetrahidrobiopterina se puede preparar añadiendo soluciones acuosas concentradas de diclorhidrato de (6R)-L-eritro-tetrahidrobiopterina a una cantidad en exceso de un no disolvente que se enfría a temperaturas de aproximadamente 10 a -10 °C, y agitando la suspensión a temperatura ambiente. Exceso de no disolvente puede significar un promedio de medio acuoso al no disolvente entre 1:10 y 1:1000. Un no disolvente preferido es tetrahydrofurano. Otro proceso de preparación comprende exponer la forma B del polimorfo al aire atmosférico con una humedad relativa de 70 a 90 %, preferentemente aproximadamente a un 80 %. Se considera que la forma E es un dihidrato, que puede absorber algo de agua adicional. La forma B del polimorfo se puede transformar en el polimorfo J tras secado al vacío a temperaturas moderadas, lo que puede significar entre 20 °C y 50 °C a presiones entre 0 y 100 mbar (0 y 10 kPa). La Forma E es especialmente útil para formulaciones en formas semisólidas debido a su estabilidad a humedades relativamente altas.

#### Hidrato de forma H

Se ha descubierto que otro hidrato cristalino del diclorhidrato de (6R)-L-eritro-tetrahidrobiopterina es una forma estable preferida para su uso en una preparación farmacéutica descrita en el presente documento, que se denominará en el presente documento "forma H", o "hidrato D." El hidrato D tiene un contenido de agua de aproximadamente 5,0 a 7,0 por ciento en peso, lo que sugiere que la forma H es un monohidrato higroscópico. El hidrato de forma H se forma a temperaturas inferiores a la temperatura ambiente. El hidrato forma H es especialmente adecuada como compuesto intermedio y material de partida para producir formas polimorfas estables. Se puede preparar la forma H del polimorfo como un polvo sólido con un intervalo de tamaño de partículas medio deseado que varía normalmente entre 1 µm y aproximadamente 500 µm.

La forma H presenta un modelo de difracción de rayos X en polvo característico con picos característicos expresados como valores  $d$  (Å) de: 8,6 15,8 (vs), 10,3 (w), 8,0 (w), 6,6 (w), 6,07 (w), 4,81 (w), 4,30 (w), 3,87 (m), 3,60 (m), 3,27 (m), 3,21 (m), 3,13 (w), 3,05 (w), 2,96 (m), 2,89 (m), 2,82 (w), y 2,67 (m). La Figura 9 es un gráfico del modelo de difracción de rayos X característico presentado por el hidrato forma H del diclorhidrato de (6R)-L-eritro-tetrahidrobiopterina.

La forma H del hidrato se puede obtener por disolución a temperatura ambiente del diclorhidrato de (6R)-L-eritro-tetrahidrobiopterina en una mezcla de ácido acético y agua, añadiéndola a un no disolvente para precipitar un sólido cristalino, enfriando la suspensión obtenida y agitando la suspensión obtenida durante un determinado tiempo. El sólido cristalino se elimina por filtración y después secarse al vacío a temperatura ambiente. Los no disolventes son, por ejemplo, hexano, heptano, diclorometano, 1- o 2-propanol, acetona, acetato de etilo, acetonitrilo, ácido acético u otros éteres tales como tetrahydrofurano, dioxano, terc-butil metil éter, o mezclas de dichos no disolventes. Un no disolvente preferido es tetrahydrofurano. La forma H del hidrato de diclorhidrato de (6R)-L-eritro-tetrahidrobiopterina se puede preparar disolviendo a temperatura ambiente el diclorhidrato de (6R)-L-eritro-tetrahidrobiopterina en una

mezcla de ácido acético y una cantidad de agua inferior a la de ácido acético, añadiendo un no disolvente y enfriando la suspensión obtenida a temperaturas en el intervalo de -10 a 10 °C, y preferentemente de -5 a 5 °C, y agitar la suspensión a dicha temperatura durante un determinado tiempo. Un determinado tiempo puede significar de 1 a 20 horas. La relación en peso entre el ácido acético y el agua puede ser de 2:1 a 25:1 y preferentemente de 5:1 a 15:1. Esta relación en peso de ácido acético/agua respecto al no disolvente puede ser de 1:2 a 1:5. El hidrato forma H parece ser un monohidrato con un ligero exceso de agua absorbida debido a su naturaleza higroscópica.

#### Hidrato de forma O

Se ha descubierto que otro hidrato cristalino del diclorhidrato de (6R)-L-eritro-tetrahidrobiopterina es una forma estable preferida para su uso en una preparación farmacéutica descrita en el presente documento, que se denominará en el presente documento "forma O", o "hidrato O." El hidrato de forma O se forma a temperatura cercanas a la temperatura ambiente. El hidrato forma O es especialmente adecuada como compuesto intermedio y material de partida para producir formas polimorfas estables. Se puede preparar la forma O del polimorfo como un polvo sólido con un intervalo de tamaño de partículas medio deseado que varía normalmente entre 1 µm y aproximadamente 500 µm.

La forma O presenta un modelo de difracción de rayos X en polvo característico con picos característicos expresados como valores  $d$  (Å) de: 15,9 (w), 14,0 (w), 12,0 (w), 8,8 (m) 7,0 (w), 6,5 (w), 6,3 (m) 6,00 (w), 5,75 (w), 5,65 (m) 5,06 (m) 4,98 (m) 4,92 (m) 4,84 (w), 4,77 (w), 4,42 (w), 4,33 (w), 4,00 (m) 3,88 (m) 3,78 (w), 3,69 (s), 3,64 (s), 3,52 (vs), 3,49 (s), 3,46 (s), 3,42 (s), 3,32 (m) 3,27 (m) 3,23 (s), 3,18 (s), 3,15 (vs), 3,12 (m) 3,04 (vs), 2,95 (m) 2,81 (s), 2,72 (m) 2,67 (m) y 2,61 (m). La Figura 10 es un gráfico del modelo de difracción de rayos X característico presentado por el hidrato forma O del diclorhidrato de (6R)-L-eritro-tetrahidrobiopterina.

El hidrato de forma O se puede preparar exponiendo la forma F del polimorfo a una atmósfera de nitrógeno que contiene vapor de agua con una humedad relativa resultante de aproximadamente 52 % durante aproximadamente 24 horas. El hecho de que la forma F, que es un anhidrato ligeramente higroscópico, se puede usar para preparar la forma O con una humedad relativa del 52 % sugiere que la forma O es un hidrato, que es más estable que la forma F en condiciones ambientales de temperatura y humedad.

#### Formas solvatadas de la sal de diclorhidrato de (6R) L-tetrahidrobiopterina

Como se describe adicionalmente a continuación, se ha descubierto que el diclorhidrato de (6R)-L-eritro-tetrahidrobiopterina existe en numerosas formas solvatadas cristalinas, que se deberán describir y definir en el presente documento como las formas G, I, L, M, y N. Estas formas de solvato son útiles como una forma estable de BH4 de los preparados para las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento y la preparación de composiciones que incluyen polimorfos cristalinos estables de BH4.

#### Solvato de forma G

Se ha descubierto que una forma cristalina solvatada en etanol del diclorhidrato de (6R)-L-eritro-tetrahidrobiopterina es una forma estable preferida para su uso en una preparación farmacéutica descrita en el presente documento, que se denominará en el presente documento "forma G", o "hidrato G." La forma G solvatada en etanol tiene un contenido de etanol de aproximadamente 8,0 a 12,5 por ciento en peso, lo que sugiere que la forma G es un monosolvato en etanol higroscópico. El solvato de forma G se forma a temperaturas inferiores a la temperatura ambiente. La forma G es especialmente adecuada como compuesto intermedio y material de partida para producir formas polimorfas estables. Se puede preparar la forma G del polimorfo como un polvo sólido con un intervalo de tamaño de partículas medio deseado que varía normalmente entre 1 µm y aproximadamente 500 µm.

La forma G presenta un modelo de difracción de rayos X en polvo característico con picos característicos expresados como valores  $d$  (Å) de: 14,5 (vs), 10,9 (w), 9,8 (w), 7,0 (w), 6,3 (w), 5,74 (w), 5,24 (vw), 5,04 (vw), 4,79 (w), 4,41 (w), 4,02 (w), 3,86 (w), 3,77 (w), 3,69 (w), 3,63 (m) 3,57 (m) 3,49 (m) 3,41 (m) 3,26 (m) 3,17 (m) 3,07 (m) 2,97 (m) 2,95 (m) 2,87 (w), y 2,61 (w). La Figura 11 es un gráfico del modelo de difracción de rayos X característico presentado por la forma G del solvato del diclorhidrato de (6R)-L-eritro-tetrahidrobiopterina.

La forma G de solvato en etanol se puede obtener mediante cristalización del diclorhidrato de (6R)-L-eritro-tetrahidrobiopterina disuelto en agua y añadiendo un importante exceso de etanol, agitando la suspensión obtenida a por debajo de la temperatura ambiente y secando el aislado al aire o bajo atmósfera de nitrógeno a aproximadamente la temperatura ambiente. En el presente documento, un exceso importante de etanol significa una mezcla resultante de etanol y agua con menos de 10 % de agua, preferentemente de aproximadamente 3 al 6 %. El enolato de forma G del diclorhidrato de (6R)-L-eritro-tetrahidrobiopterina se puede preparar disolviendo la diclorhidrato de (6R)-L-eritro-tetrahidrobiopterina de aproximadamente temperatura ambiente a temperaturas de 75 °C en agua o en una mezcla de agua y etanol, enfriando una solución calentada a temperatura ambiente y enfriando hasta de 5 a 10 °C, añadiendo opcionalmente etanol para completar la precipitación, agitando la suspensión obtenida a temperaturas de 20 a 5 °C, eliminando por filtración el sólido cristalino de color blanco y secando el sólido al aire o con un gas de protección tal como nitrógeno a temperaturas de aproximadamente la

temperatura ambiente. El proceso se puede llevar a cabo en una primera variante disolviendo el diclorhidrato de (6R)-L-eritro-tetrahidrobiopterina a aproximadamente temperatura ambiente en una pequeña cantidad de agua y añadiendo a continuación un exceso de etanol y agitando después la suspensión obtenida durante un tiempo suficiente para el equilibrio de fases. En una segunda variante, el diclorhidrato de (6R)-L-eritro-tetrahidrobiopterina se puede suspender en etanol, añadiendo opcionalmente una pequeña cantidad de agua, y calentando la suspensión y disolver el diclorhidrato de (6R)-L-eritro-tetrahidrobiopterina, enfriando la solución a temperaturas de aproximadamente 5 a 15 °C, añadiendo más cantidad de etanol a la suspensión y agitando después la suspensión obtenida durante un tiempo suficiente para el equilibrio de fases.

#### 10 Solvato de forma I

Se ha descubierto que una forma cristalina solvatada en ácido acético del diclorhidrato de (6R)-L-eritro-tetrahidrobiopterina es una forma estable preferida para su uso en una preparación farmacéutica descrita en el presente documento, que se denominará en el presente documento "forma I", o "hidrato I." La forma I solvatada en ácido acético tiene un contenido de ácido acético de aproximadamente un 12,7 por ciento en peso, lo que sugiere que la forma I es un monosolvato en ácido acético higroscópico. El solvato de forma I se forma a temperaturas inferiores a la temperatura ambiente. La forma I solvatada en ácido acético es especialmente adecuada como compuesto intermedio y material de partida para producir formas polimorfas estables. Se puede preparar la forma I del polimorfo como un polvo sólido con un intervalo de tamaño de partículas medio deseado que varía normalmente entre 1 µm y aproximadamente 500 µm.

La forma I presenta un modelo de difracción de rayos X en polvo característico con picos característicos expresados como valores d (Å) de: 14,5 (m) 14,0 (w), 11,0 (w), 7,0 (vw), 6,9 (vw), 6,2 (vw), 5,30 (w), 4,79 (w), 4,44 (w), 4,29 (w), 4,20 (vw), 4,02 (w), 3,84 (w), 3,80 (w), 3,67 (vs), 3,61 (m) 3,56 (w), 3,44 (m) 3,27 (w), 3,19 (w), 3,11 (s), 3,00 (m) 2,94 (w), 2,87 (w), y 2,80 (w). La Figura 12 es un gráfico del modelo de difracción de rayos X característico presentado por la forma I del solvato del diclorhidrato de (6R)-L-eritro-tetrahidrobiopterina.

La forma I solvatada en ácido acético se puede obtener por disolución del diclorhidrato de (6R)-L-eritro-tetrahidrobiopterina en una mezcla de ácido acético y agua a temperatura elevada, adición de más cantidad de ácido acético a la solución, enfriamiento hasta una temperatura de aproximadamente 10 °C, y posterior calentamiento de la suspensión formada a aproximadamente 15 °C, y agitando después la suspensión obtenida durante un tiempo suficiente para el equilibrio de fases, que puede tardar hasta 3 días. El sólido cristalino después se elimina por filtración y se seca al aire o con un gas de protección tal como nitrógeno a temperaturas de aproximadamente la temperatura ambiente.

#### 35 Solvato de forma L

Se ha descubierto que una forma cristalina hidratada/solvatada en etanol del diclorhidrato de (6R)-L-eritro-tetrahidrobiopterina es una forma estable preferida para su uso en una preparación farmacéutica descrita en el presente documento, que se denominará en el presente documento "forma L", o "hidrato L." La forma L puede contener un 4 % pero hasta un 13 % de etanol y de 0 a aproximadamente un 6 % de agua. La forma L se puede transformar en la forma G cuando se trata en etanol a temperaturas de aproximadamente 0 °C a 20 °C. Además, la forma L se puede transformar en la forma B cuando se trata en un disolvente orgánico a temperaturas ambientales (de 10 °C a 60 °C). Se puede preparar la forma L del polimorfo como un polvo sólido con un intervalo de tamaño de partículas medio deseado que varía normalmente entre 1 µm y aproximadamente 500 µm.

La forma L presenta un modelo de difracción de rayos X en polvo característico con picos característicos expresados como valores d (Å) de: 14,1 (vs), 10,4 (w), 9,5 (w), 9,0 (vw), 6,9 (w), 6,5 (w), 6,1 (w), 5,75 (w), 5,61 (w), 5,08 (w), 4,71 (w), 3,86 (w), 3,78 (w), 3,46 (m) 3,36 (m) 3,06 (w), 2,90 (w), y 2,82 (w). La Figura 13 es un gráfico del modelo de difracción de rayos X característico presentado por la forma L del solvato del diclorhidrato de (6R)-L-eritro-tetrahidrobiopterina.

La forma L se puede obtener mediante la suspensión del hidrato de forma E a temperatura ambiente en etanol y agitando la suspensión a temperaturas de 0 a 10 °C, preferentemente de aproximadamente 5 °C, durante un tiempo suficiente para el equilibrio de fases, que puede tardar de 1 a 20 horas. El sólido cristalino después se eliminó por filtración y se secó preferentemente a presión reducida a 30 °C o bajo atmósfera de nitrógeno. El análisis mediante TG-FTIR sugiere que la forma L puede contener cantidades variables de etanol y agua, es decir, puede existir como polimorfo (anhidrato), como solvato en etanol/hidrato mixto, o incluso como hidrato.

#### 60 Solvato de forma M

Se ha descubierto que una forma cristalina solvatada en etanol del diclorhidrato de (6R)-L-eritro-tetrahidrobiopterina es una forma estable preferida para su uso en una preparación farmacéutica descrita en el presente documento, que se denominará en el presente documento "forma M", o "hidrato M". La forma M puede contener un 4 % pero hasta un 13 % de etanol y de 0 a aproximadamente un 6 % de agua, lo que sugiere que la forma M es un solvato en etanol algo higroscópico. El solvato de forma M se forma a temperatura ambiente. La forma M es especialmente adecuada

como compuesto intermedio y material de partida para producir formas polimorfas estables, ya que la forma M se puede transformar en la forma G cuando se trata en etanol a temperaturas entre aproximadamente  $-10^{\circ}$  y  $15^{\circ}\text{C}$ , y en la forma B cuando se trata en disolventes orgánicos como etanol, alcoholes C3 y C4, o éteres cíclicos tales como THF y dioxano. Se puede preparar la forma M del polimorfo como un polvo sólido con un intervalo de tamaño de partículas medio deseado que varía normalmente entre  $1\ \mu\text{m}$  y aproximadamente  $500\ \mu\text{m}$ .

La forma M presenta un modelo de difracción de rayos X en polvo característico con picos característicos expresados como valores  $d$  (Å) de: 18,9 (s), 6,4 (m) 6,06 (w), 5,66 (w), 5,28 (w), 4,50 (w), 4,23 (w), y 3,22 (vs). La Figura 14 es un gráfico del modelo de difracción de rayos X característico presentado por la forma M del solvato del diclorhidrato de (6R)-L-eritro-tetrahidrobiopterina.

La forma M solvatada en etanol se puede obtener por disolución del diclorhidrato de (6R)-L-eritro-tetrahidrobiopterina en etanol y evaporación de la solución bajo atmósfera de nitrógeno a temperatura ambiente, es decir, entre  $10^{\circ}\text{C}$  y  $40^{\circ}\text{C}$ . La forma M también se puede obtener por secado de la forma G con una pequeña corriente de nitrógeno seco a un caudal de aproximadamente 20 a 100 ml/min. Dependiendo de la medida del secado bajo atmósfera de nitrógeno, la cantidad remanente de etanol puede ser variable, es decir, de aproximadamente 3 % a 13 %.

Solvato de forma N

Se ha descubierto que otro solvato cristalino del diclorhidrato de (6R)-L-eritro-tetrahidrobiopterina es una forma estable preferida para su uso en una preparación farmacéutica descrita en el presente documento, que se denominará en el presente documento "forma N", o "hidrato N". La forma N puede contener en total hasta un 10 % de isopropanol y agua, lo que sugiere que la forma N es un solvato en isopropanol algo higroscópico. La forma N se puede obtener mediante lavado de la Forma D con isopropanol y posterior secado al vacío a aproximadamente  $30^{\circ}\text{C}$ . La forma N es especialmente adecuada como compuesto intermedio y material de partida para producir formas polimorfas estables. Se puede preparar la forma N del polimorfo como un polvo sólido con un intervalo de tamaño de partículas medio deseado que varía normalmente entre  $1\ \mu\text{m}$  y aproximadamente  $500\ \mu\text{m}$ .

La forma N presenta un modelo de difracción de rayos X en polvo característico con picos característicos expresados como valores  $d$  (Å) de: 19,5 (m) 9,9 (w), 6,7 (w), 5,15 (w), 4,83 (w), 3,91 (w), 3,56 (m) 3,33 (vs), 3,15 (w), 2,89 (w), 2,81 (w), 2,56 (w), y 2,36 (w). La Figura 15 es un gráfico del modelo de difracción de rayos X característico presentado por la forma N del solvato del diclorhidrato de (6R)-L-eritro-tetrahidrobiopterina.

La forma N en isopropanol se puede obtener por disolución del diclorhidrato de (6R)-L-eritro-tetrahidrobiopterina en 4,0 ml de una mezcla de isopropanol y agua (relación del volumen de mezclado, por ejemplo, 4:1). A esta solución se añadió lentamente isopropanol (IPA, por ejemplo, aproximadamente 4,0 ml) y la suspensión resultante se enfrió a  $0^{\circ}\text{C}$  y se agitó durante varias horas (e.g., aproximadamente de 10 a 18 horas) a esta temperatura. La suspensión se filtró, y el residuo sólido se lavó con isopropanol a temperatura ambiente. El material cristalino obtenido se seca a continuación a temperatura ambiente (por ejemplo, aproximadamente de  $20^{\circ}$  a  $30^{\circ}\text{C}$ ) y presión reducida (de aproximadamente 2 a 10 mbar [200 a 1000 Pa] durante varias horas (por ejemplo, aproximadamente de 5 a 20 horas). TG-FTIR muestra una pérdida de peso del 9,0 % a entre  $25^{\circ}$  a  $200^{\circ}\text{C}$ , que se atribuye tanto al isopropanol como al agua. Este resultado sugiere que la forma N puede existir en forma de un solvato de isopropanol, o en forma de un solvato/hidrato mixto en isopropanol, o como forma no solvatada que contiene una pequeña cantidad de agua.

Para la preparación de las formas del polimorfo, se pueden utilizar técnicas de cristalización bien conocidas en la técnica, tales como agitación de una suspensión (con equilibrio de fases), precipitación, recristalización, evaporación, métodos de adsorción de agua de tipo solvente o descomposición de los solvatos. Se pueden utilizar soluciones diluidas, saturadas o supersaturadas para la cristalización, con o sin siembra de los agentes nucleantes adecuados. Se pueden aplicar temperaturas de hasta  $100^{\circ}\text{C}$  para formar soluciones. Se puede aplicar un enfriamiento para iniciar la cristalización y precipitación hasta  $-100^{\circ}\text{C}$  y preferentemente hasta  $-30^{\circ}\text{C}$ . Los polimorfos metaestables o las formas pseudo polimórficas se pueden utilizar para preparar soluciones o suspensiones de formas más estables y conseguir concentraciones más elevadas de las soluciones.

Se ha descubierto sorprendentemente que el hidrato de forma D es la forma más estable de los hidratos, y las formas B y D son especialmente adecuadas para su uso en formulaciones farmacéuticas. Las formas B y D presentan algunas ventajas como sencillez de fabricación, buena manipulación debido a un tamaño y morfología del cristal cómodos, muy buena estabilidad en condiciones de producción de diferentes tipos de formulación, estabilidad en almacenamiento, mayor solubilidad, y elevada biodisponibilidad. De acuerdo con ello, en un método y/o composición divulgada en el presente documento, la forma de la BH4 presente en una mezcla es preferentemente una forma cristalina estabilizada de BH4 y se selecciona del grupo que consiste de la forma A del polimorfo cristalino, la forma B del polimorfo cristalino, la forma F del polimorfo cristalino, la forma J del polimorfo cristalino, la forma L del polimorfo cristalino, la forma C del hidrato cristalino, la forma D del hidrato cristalino, la forma E del hidrato cristalino, la forma H del hidrato cristalino, la forma O del hidrato cristalino, la forma G del solvato cristalino, la forma I del solvato cristalino, la forma L del solvato cristalino, la forma M del solvato cristalino, la forma N del solvato cristalino, y combinaciones de las mismas. Más preferentemente, la forma de BH4 es para su uso en una composición y método divulgados en el presente documento que es una composición que incluye la forma B del

polimorfo y/o la forma D del hidrato del diclorhidrato de (6R)-L-eritro-tetrahidrobiopterina y un transportador o diluyente farmacéuticamente aceptable.

Las formas cristalinas del diclorhidrato de (6R)-L-eritro-tetrahidrobiopterina se pueden usar junto con ácido fólico o ácido tetrahidrofólico o sus sales farmacéuticamente aceptables tales como las sales de sodio, potasio, calcio o amonio, tanto en solitario como además de arginina. La relación en peso entre las formas cristalinas y el ácido fólico o sales de los mismos puede ser de aproximadamente 1:10:10 a aproximadamente 10:1:1.

#### VI. Formulaciones farmacéuticas

Las formulaciones descritas en el presente documento se administran preferentemente como formulaciones orales. Las formulaciones orales son preferentemente formulaciones sólidas tales como cápsulas, comprimidos, píldoras y pastillas, o formulaciones líquidas tales como suspensiones acuosas, elixires y jarabes. Las diferentes formas de BH4 descritas en el presente documento se puede utilizar directamente en forma de polvo (partículas micronizadas), gránulos, suspensiones o soluciones, o se pueden combinar entre sí con otros principios activos farmacéuticamente aceptables por mezcla de los componentes y, opcionalmente, sometiéndolos a una división fina, y a continuación llenar cápsulas, compuestas por ejemplo de gelatina dura o blanda, que comprenden comprimidos, píldoras o pastillas, o suspenderlas o disolverlas en transportadores para suspensiones, elixires y jarabes. Los recubrimientos se pueden aplicar tras la compresión para formar píldoras.

Los ingredientes farmacéuticamente aceptables son bien conocidos para los diferentes tipos de formulación, y pueden ser, por ejemplo, aglutinantes tales como polímeros naturales o sintéticos, excipientes, lubricantes, tensioactivos, agentes edulcorantes y aromatizantes, materiales de recubrimiento, conservantes, tintes, espesantes, adyuvantes, agentes antimicrobianos, antioxidantes y transportadores para los diferentes tipos de formulaciones. Los ejemplos no limitantes de aglutinantes útiles en una composición descrita en el presente documento incluyen goma tragacanto, acacia, almidón, gelatina, y polímeros biológicamente degradables tales como homo o copoliésteres de ácidos dicarboxílicos, alquilenglicoles, polialquilenglicoles y/o ácidos hidroxilcarboxílicos alifáticos; homo o copoliámidas de ácidos dicarboxílicos, alquilendiaminas, y/o ácidos aminocarboxílicos lineales; los correspondientes copolímeros de poliéster-poliámida, polianhídridos, poliortoésteres, polifosfacenos y policarbonatos. Los polímeros biológicamente degradables pueden ser lineales, ramificados o reticulados. Los ejemplos específicos son (poliácido glicólico), poli(ácido láctico), y poli-d,l-láctido/glicólido. Otros ejemplos de polímeros son los polímeros solubles en agua tales como polioxaalquilenos (polioxaetileno, polioxapropileno y polímeros mixtos de los mismos, poliacrilamidas y poliacrilamidas hidroxialquiladas, poli(ácido maleico) y ésteres o amidas de los mismos, poli(ácido acrílico) y ésteres o amidas de los mismos, poli(alcohol vinílico) y ésteres o éteres de los mismos, poli-vinilimidazol, poli-vinilpirrolidón, y polímeros naturales tales como quitosana.

Los ejemplos no limitantes de excipientes útiles en una composición descrita en el presente documento incluyen fosfatos tales como fosfato dicálcico. Los ejemplos no limitantes de lubricantes para su uso en una composición descrita en el presente documento incluyen aceites tanto naturales como sintéticos, grasas, ceras, o ácidos grasos tales como estearato de magnesio.

Los tensioactivos para su uso en una composición descrita en el presente documento puede ser aniónicos, aniónicos, anfóteros o neutros. Los ejemplos no limitantes de tensioactivos útiles en una composición descrita en el presente documento incluyen lecitina, fosfolípidos, octilsulfato, decilsulfato, dodecil sulfato, tetradecil sulfato, hexadecil sulfato y octadecilsulfato, Na oleato o Na caprato, ácidos 1-acilaminoetano-2-sulfónicos, tal como 1-octanoilaminoetano-2-sulfónico, ácido 1-decanoilaminometano-2-sulfónico, ácido 1-dodecanoilaminometano-2-sulfónico, ácido 1-tetradecanoilaminometano-2-sulfónico, ácido 1-hexadecanoilaminometano-2-sulfónico, y ácido 1-octadecanoilaminometano-2-sulfónico, y ácido taurocólico y ácido taurodesoxicólico, ácidos biliares y sus sales, tal como el ácido cólico, ácidos desoxicólico y glicolatos de sodio, caprato de sodio o laurato de sodio, oleato de sodio, lauril sulfato de sodio, cetil sulfato de sodio, aceite de ricino sulfatado y dioctilsulfosuccinato de sodio, cocamidopropilbetaína y laurilbetaína, alcoholes grasos, colesterol, mono o diestearato de glicerol, mono o dioleato de glicerol y mono o dipalmitato de glicerol, y estearato polioxi-etilenado.

Los ejemplos no limitantes de agentes edulcorantes en una composición descrita en el presente documento incluyen sacarosa, fructosa, lactosa o aspartame. Los ejemplos no limitantes de agentes aromatizantes para su uso en una composición descrita en el presente documento incluyen piperita, aceite de gaulteria o sabores frutales como sabor a cereza o naranja. Los ejemplos no limitantes de agentes de recubrimiento para su uso en una composición descrita en el presente documento incluyen gelatina, cera, goma laca, azúcar u otros polímeros biológicos degradables. Los ejemplos no limitantes de agentes de recubrimiento para su uso en una composición descrita en el presente documento incluyen gelatina, ácido sórbico, clorobutano, fenol y timerosal.

La forma del hidrato D descrita en el presente documento también se puede formular como comprimido o polvo efervescente, que se desintegra en un medio acuoso para proporcionar una solución que se puede beber. Un jarabe o elixir pueden contener el polimorfo descrito en el presente documento, sacarosa o fructosa como agente edulcorante, un conservante como metil parabeno, un colorante y un agente aromatizante.

Las formulaciones de liberación lenta también se pueden preparar a partir del polimorfo descrito en el presente documento para conseguir una liberación controlada del principio activo en contacto con los fluidos corporales en el tracto gastrointestinal, y para proporcionar un nivel sustancialmente constante y eficaz del principio activo en el plasma sanguíneo. Con este fin, la forma cristalina puede estar incluida en una matriz polimérica de un polímero degradable, un polímero soluble en agua o una mezcla de ambos, y opcionalmente los tensioactivos adecuados. Inclusión puede significar en este contexto, la incorporación de las micro-partículas en una matriz de polímeros. También se obtienen formulaciones de liberación controlada mediante la encapsulación de micropartículas dispersas o microgotículas emulsionadas mediante técnicas de recubrimiento por dispersión o emulsión conocidas.

Aunque las necesidades individuales varían, la determinación de los intervalos óptimos de las cantidades eficaces de cada componente está entre las capacidades del experto en la materia. Las dosificaciones típicas de la BH4 comprenden de aproximadamente 1 a aproximadamente 20 mg/kg de peso corporal por día, que suelen aumentar hasta aproximadamente 5 (1 mg/kg x 5 kg de peso corporal) a 3000 mg/día (30 mg/kg x 100 kg de peso corporal). Dichas dosis se pueden administrar en una dosis única o se puede dividirse en múltiples dosis. Aunque se contempla una administración continua diaria, puede ser deseable cesar el tratamiento con BH4 cuando los síntomas de los niveles de Phe se reducen por debajo de un determinado umbral. Por supuesto, el tratamiento se puede reiniciar en el caso en que los niveles de Phe aumenten de nuevo.

Se entiende que la dosis adecuada de una composición dependerá de la edad, salud y peso del receptor, tipo de tratamiento concurrente, en su caso, frecuencia de tratamiento, y la naturaleza del efecto deseado (es decir, la cantidad de disminución en la concentración plasmática de Phe deseada). La frecuencia de la dosificación también depende de los efectos farmacodinámicos sobre los niveles de Phe. Si el efecto dura 24 para una sola dosis. Sin embargo, la dosificación más preferida se puede personalizar al sujeto individual, y se entiende que el experto en la técnica puede determinar esto, sin experimentación excesiva. Esto suele implicar un ajuste de una dosis normalizada, por ejemplo, reducción de la dosis si el paciente tiene un bajo peso corporal.

Tal como se ha descrito anteriormente, la dosis total necesaria para cada tratamiento puede administrarse en múltiples dosis o en una sola dosis. Las composiciones de BH4 y proteínas se pueden administrar solas o junto con otros principios terapéuticos dirigidos a la enfermedad o dirigidos a otros síntomas de la misma.

Como es evidente de la divulgación presentada en el presente documento, en un amplio aspecto, la presente solicitud contempla la aplicación clínica de un tratamiento combinado que comprende una primera composición que contiene una formulación de BH4 cristalina, y una segunda composición que contiene una formulación proteica médica (por ejemplo, PHENEX o similar). Por tanto, las composiciones deberán formularse como composiciones farmacéuticas adecuadas, es decir, en una forma adecuada para aplicaciones in vivo en dichos tratamientos combinados. En general, esto conlleva la preparación de composiciones que esencialmente están exentas de pirógenos, así como otras impurezas que podrían ser perjudiciales para los seres humanos o animales. Preferentemente, la composición de BH4 cristalina puede ser tal que se puede añadir directamente a las formulaciones de proteínas existentes utilizadas para el tratamiento de la PKU.

Uno deseará utilizar por lo general sales y tampones adecuados para convertir la BH4 en adecuada para su captación. Las composiciones acuosas para su uso de acuerdo con la presente invención comprenden una cantidad eficaz de la BH4 disuelta o dispersada en un transportador o medio acuoso farmacéuticamente aceptable. Dichas composiciones pueden administrarse por vía oral.

La expresión "farmacéuticamente o farmacéuticamente aceptables" se refiere a las entidades moleculares y composiciones que no producen reacciones adversas, alérgicas, u otro tipo de reacciones indeseables cuando se administra a un animal o ser humano. Tal como se usa en el presente documento, "vehículo farmacéuticamente aceptable" incluye cualquiera y todos los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardantes de la absorción y similares. El uso de dichos medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas es bien conocido en la técnica. Excepto en el caso de que cualquier agente o medio convencional sea incompatible con las composiciones terapéuticas, está contemplado su uso en las composiciones terapéuticas. Pueden incorporarse también principios activos suplementarios en las composiciones. En realizaciones ilustrativas, la formulación proteica médica puede comprender sólidos de jarabe de maíz, aceite de cártamo alto oleico, aceite de coco, aceite de soja, L-leucina, fosfato de calcio tribásico, L-tirosina, L-prolina, L-lisina acetato, DATEM (un emulsionante), L-glutamina, L-valina, fosfato de potasio dibásico, L-isoleucina, L-arginina, L-alanina, glicina, L-asparagina monohidrato, L-serina, citrato de potasio, L-treonina, citrato de sodio, cloruro de magnesio, L-histidina, L-metionina, ácido ascórbico, carbonato de calcio, ácido L-glutámico, diclorhidrato de L-cistina, L-triptófano, ácido L-aspártico, cloruro de colina, taurina, m-inositol, sulfato ferroso, palmitato de ascorbilo, sulfato de zinc, L-carnitina, acetato de alfa-tocoferilo, cloruro de sodio, niacinamida, mezcla de tocoferoles, pantotenato de calcio, sulfato cúprico, clorhidrato de cloruro de tiamina, palmitato de vitamina A, sulfato de manganeso, riboflavina, clorhidrato de piridoxina, ácido fólico, beta-caroteno, yoduro de potasio, filoquinona, biotina, selenato de sodio, cloruro de cromo, molibdato de sodio, vitamina D3 y cianocobalamina. Los aminoácidos, minerales y vitaminas del suplemento se deben proporcionar en cantidades que proporcionan la dosis diaria recomendada de cada uno de los componentes.

Tal como se usa en el presente documento, "Vehículo farmacéuticamente aceptable" incluye cualquiera y todos los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardantes de la absorción y similares. El uso de dichos medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas es bien conocido en la técnica. Excepto en el caso de que cualquier agente o medio convencional sea incompatible con el compuesto activo, está contemplado su uso en las composiciones terapéuticas. Pueden incorporarse también principios activos suplementarios en las composiciones.

Las composiciones activas para su uso de acuerdo con la presente invención incluyen preparaciones farmacéuticas clásicas de la BH4 que se han analizado en el presente documento y son conocidas del experto en la técnica. Las fórmulas proteicas, tales como, por ejemplo, Phenex, son también conocidas del experto en la técnica. La administración de estas composiciones se realizará mediante cualquier ruta común para la suplementación de la dieta. La proteína se administra preferentemente por vía oral, como la BH4.

Los principios activos se pueden preparar para su administración en forma de soluciones de base libre o como sales farmacéuticamente aceptables en agua adecuadamente mezcladas con un tensioactivo, tal como hidroxipropilcelulosa. Las dispersiones también se pueden preparar el glicerol, polietilenglicoles líquidos, y mezclas de los mismos y en aceites. En condiciones normales de almacenamiento y uso, estas preparaciones contienen un conservante para evitar el crecimiento de microorganismos.

Las composiciones de BH4 se pueden preparar como formas farmacéuticas adecuadas para uso inyectable. Dichas composiciones incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. En, la composición debe ser estéril y fluida en la medida que se pueda administrar fácilmente mediante una jeringuilla. Debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento y tiene que conservarse contra la acción contaminante de microorganismos, tales como bacterias y hongos. El vehículo puede ser un disolvente o un medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, y polietilenglicol líquido, y similares), mezclas adecuadas de los mismos, y aceites vegetales. Puede mantenerse la fluidez adecuada, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento tal como lecitina, manteniendo el tamaño de partícula necesario en el caso de las dispersiones y mediante el uso de tensioactivos. La prevención de la acción de microorganismos puede lograrse por medio de varios agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutano, fenol, ácido sórbico, timerosal, y similares. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares o cloruro de sodio. La absorción prolongada de las composiciones inyectables se puede conseguir mediante el uso de agentes que retrasan la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

Las soluciones inyectables estériles se preparan incorporando los principios activos en la cantidad necesaria del disolvente adecuado con el resto de ingredientes variados indicados anteriormente, según sea necesario, seguido de esterilización por filtración. En general, las dispersiones se preparan incorporando los diferentes principios activos esterilizados en un vehículo estéril que contiene el medio de dispersión básico y los demás ingredientes necesarios de entre los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos de preparación preferidos son el secado a vacío y las técnicas de criodesecación que dan como resultado un polvo del principio activo más cualquier ingrediente deseado adicional de una de sus soluciones anteriormente filtrada en estéril.

La BH4 usada en una composición descrita el presente documento preferentemente se formula en forma de una sal de diclorhidrato, sin embargo, se contempla que otras formas salinas de la BH4 tengan la actividad biológica deseada, y en consecuencia, se pueden utilizar otras formas salinas de la BH4.

Las sales de adición de base farmacéuticamente aceptables se pueden formar con metales o aminas, tales como metales alcalinos o alcalinotérreos o aminas orgánicas. Las sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos se pueden preparar también con un catión farmacéuticamente aceptable. Los cationes farmacéuticamente aceptables son bien conocidos de los expertos en la técnica e incluyen cationes alcalinos, alcalinotérreos, cationes de amonio y amonio cuaternario. Son también posibles los carbonatos o hidrogenocarbonatos. Los ejemplos de metales utilizados como cationes son sodio, potasio, magnesio, amonio, calcio, o férrico, y similares. Los ejemplos de aminas adecuadas incluyen isopropilamina, trimetilamina, histidina, N,N'-dibenciletilendiamina, cloroprocaina, colina, dietanolamina, dicitlohexilamina, etilendiamina, N-metilglucamina, y procaína.

Las sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables incluyen sales de ácidos orgánicos o inorgánicos. Los ejemplos de sales de ácidos orgánicos adecuadas incluyen clorhidratos, acetatos, citratos, salicilatos, nitratos, fosfatos. Otras sales farmacéuticamente aceptables adecuadas son bien conocidas de los expertos en la técnica e incluyen, por ejemplo, los ácidos acético, cítrico, oxálico, tartárico, o mandélico, ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico o ácido fosfórico; con ácidos orgánicos carboxílicos, sulfónicos, sulfo o fosfoácidos o ácidos sulfámicos N-sustituídos, por ejemplo, ácido acético, ácido propiónico, ácido glicólico, ácido succínico, ácido maleico, ácido hidroximaleico, ácido metilmaleico, ácido fumárico, ácido málico, ácido tartárico, ácido láctico, ácido oxálico, ácido glucónico, ácido glucárico, ácido glucourónico, ácido cítrico, ácido benzoico, ácido cinámico, ácido mandélico, ácido salicílico, ácido 4-aminosalicílico, ácido 2-fenoxiacético, ácido 2-acetoxibenzoico, ácido embónico, ácido nicotínico o ácido isonicotínico; y con aminoácidos, tales como los 20 alfa-aminoácidos implicados en la síntesis de

5 proteínas natural, por ejemplo ácido glutámico o ácido aspártico, y también con ácido fenilacético, ácido metanosulfónico, ácido etanosulfónico, ácido 2-hidroxietanosulfónico, ácido etano-1,2 disulfónico, ácido bencenosulfónico, ácido 4-metilbencenosulfónico, ácido naftaleno-2-sulfónico, ácido naftaleno-1,5-disulfónico, 2- o 3-fosfoglicerato, glucosa 6-fosfato, ácido N-ciclohexilsulfámico (con formación de ciclamatos), o con otros compuestos de ácido orgánico, tales como ácido ascórbico.

Específicamente, se prefieren las sales de BH4 con ácidos orgánicos o inorgánicos. Los ejemplos no limitantes de formas salinas alternativas de BH4 incluyen las sales de BH4 de ácido acético, ácido cítrico, ácido oxálico, ácido tartárico, ácido fumárico, y ácido mandélico.

10 La frecuencia de la dosificación de BH4 dependerá de los parámetros farmacocinéticos del agente y de las rutas de administración. La formulación farmacéutica óptima será determinada por un experto en la materia dependiendo de la vía de administración y la dosis deseada. Véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª Ed. (1990, Mack Publ. Co, Easton PA 18042) pp 1435 1712. Dichas formulaciones pueden influir en el estado físico, 15 estabilidad, tasa de liberación in vivo y aclaramiento in vivo de los agentes administrados. Dependiendo de la ruta de administración, la dosis adecuada se puede calcular según el peso corporal, área superficial corporal o tamaño del órgano. Otros ajustes de los cálculos necesarios para determinar la dosis de tratamiento adecuada se realizan de forma rutinaria por el experto en la técnica sin experimentación excesiva, especialmente a la luz de la información de dosis y los ensayos divulgados en el presente documento, así como los datos farmacocinéticos observados en 20 animales o en sujetos de ensayos clínicos con seres humanos.

25 Las dosificaciones adecuadas se pueden determinar mediante el uso de ensayos establecidos para determinar los niveles de Phe en sangre junto con datos importantes de respuesta a la dosis. El médico a cargo del paciente determinará la posología, teniendo en cuenta factores que pueden modificar la acción de fármacos, por ejemplo, la actividad específica del fármaco, la gravedad del daño y la sensibilidad del paciente, la edad, afección, peso corporal, el sexo y alimentación del paciente, la gravedad de cualquier infección, el momento de administración y otros factores clínicos. Cuando se realiza el estudio, se obtendrá más información con respecto a los niveles de dosificación adecuados y duración del tratamiento para enfermedades y dolencias específicas.

30 Se apreciará que la invención puede ser útil en campos de la medicina humana y medicina veterinaria. Así, el sujeto a tratar puede ser un mamífero, preferentemente un ser humano u otro animal. Para fines veterinarios, los sujetos incluyen, por ejemplo, animales de granja incluyendo vacas, ovejas, cerdos, caballos y cabras, animales de compañía como perros y gatos, animales exóticos y de zoológico, animales de laboratorio como ratones, ratas, conejos, cobayas y hámsteres; y aves de corral tales como pollos, pavos, patos y gansos.

## 35 VII. Ejemplos

Los siguientes ejemplos se han incluido para demostrar realizaciones preferidas de la presente invención. Las personas expertas en la materia deberán apreciar que las técnicas descritas en los ejemplos siguientes representan 40 técnicas y composiciones descubiertas por los inventores que funcionan bien en la práctica de la invención, y, por tanto, se puede considerar que constituyen los modos preferidos para su práctica. Sin embargo, el experto en la técnica deberá, a la luz de la presente divulgación, apreciar que se pueden realizar muchos cambios en las realizaciones específicas que se describen y obtener además un resultado igual o similar.

### 45 EJEMPLO 1

#### Evaluación clínica con 6R-Tetrahidrobiopterina

50 El siguiente ejemplo proporciona una guía de los parámetros a utilizar para la evaluación clínica de la BH4 de acuerdo con la presente invención. Como se ha analizado detalladamente en el presente documento, la BH4 se puede utilizar en el tratamiento de la HPA incluyendo HPA, fenilcetonuria (PKU) leve y PKU clásica. Se realizarán ensayos clínicos que proporcionarán una evaluación de dosis orales diarias de BH4 para la seguridad, la farmacocinética, y la respuesta inicial de los criterios de valoración clínicos tanto derivados como definidos. El ensayo clínico se realizará para un mínimo, pero no limitándose necesariamente a dicho plazo, de 6 semanas para 55 recoger suficiente información de seguridad de 30 pacientes evaluables.

60 La dosis inicial de los ensayos clínicos variará de aproximadamente 10 a aproximadamente 20 mg/kg. En el caso en que dicha dosis no produzca una reducción del exceso de niveles de fenilalanina (Phe) en el plasma de un paciente, o que produzca un beneficio clínico directo significativo medido como la capacidad de aumentar la ingesta diaria oral de Phe sin aumentar los niveles de Phe en plasma, la dosis deberá aumentarse según sea necesario, y mantenerse durante un periodo mínimo adicional de, pero necesariamente limitado a, 6 semanas para establecer la seguridad y evaluar la eficacia adicional. Las dosis inferiores, por ejemplo, dosis de entre 5 y 10 mg/kg, también están incluidas.

65 Las mediciones de la seguridad incluirán acontecimientos adversos, reacciones alérgicas, analítica completa (función renal y hepática), análisis de orina, y CBC con diferencial. Además, se realizará el seguimiento de otros parámetros, incluyendo la reducción de los niveles de Phe en sangre, análisis neuropsicológicos y cognitivos, y

valoraciones globales. El presente ejemplo también incluye determinar los parámetros farmacocinéticos del fármaco en la circulación, y una distribución general y semivida de la 6R-BH4 en sangre. Se anticipa que estas medidas ayudarán a relacionar la dosis con la respuesta clínica.

## 5 Métodos

Los pacientes que tienen niveles elevados de Phe en plasma se someterán a un análisis inicial que incluye anamnesis y exploración física, pruebas neuropsicológicas y cognitivas, un conjunto normalizado de pruebas de laboratorio clínico (CBC, Panel 20, CH50, UA), niveles de pterinas en orina, niveles de dihidropteridina reductasa (DHPR), y un panel sanguíneo (plasma) de los aminoácidos séricos (en ayunas). La dosis propuesta para seres humanos de 10 a aproximadamente 20 mg/kg de BH4 se administrará dividida en de una a tres dosis diarias. El paciente se seguirá de cerca con visitas semanales a la clínica. Los pacientes volverán a la clínica para una evaluación completa una semana tras completar el período de tratamiento. En caso de necesitar aumento de la dosis, el paciente deberá seguir el mismo programa detallado anteriormente. La seguridad se controlará durante la totalidad del ensayo clínico.

Los pacientes inscritos se aleatorizarán para recibir BH4 o un placebo. Tras un periodo inicial de dos a cuatro semanas, todos los participantes del estudio comenzarán una dieta controlada con una ingesta limitada de Phe para un total de cuatro a seis semanas. Tras completar las primeras dos a cuatro semanas con la restricción dietética, todos los participantes del estudio se retrocruzarán en su aleatorización y se seguirán durante un periodo adicional de dos a cuatro semanas. Los niveles de Phe en sangre y otros parámetros bioquímicos se seguirán de cerca al finalizar cada periodo. La evaluación de los resultados neuropsicológicos incluirá mediciones del mantenimiento de la atención; memoria de trabajo; y capacidad para realizar operaciones complejas. Los pacientes que completen en ensayo clínico, y que se beneficien del tratamiento mostrando una disminución beneficiosa de los niveles de Phe en plasma, recibirán la oferta de continuar con el tratamiento con BH4 a través de un protocolo de tratamiento siempre que las condiciones de seguridad y eficacia lo permitan, o hasta aprobación de la BLA.

### Diagnóstico y criterios de inclusión/exclusión

El paciente puede ser varón o mujer, de edad de doce o más años con un diagnóstico documentado de HPA o PKU leve confirmada por pruebas genéticas y evidencia de niveles elevados de Phe en sangre. El estudio incluirá pacientes de HPA o PKU que no siguen un control dietético estricto. Las pacientes femeninas en edad de procrear deben tener un resultado negativo en una prueba de embarazo ( $\beta$ -hCG en orina) antes de cada dosis y se les aconseja utilizar un método anticonceptivo médicamente aceptable durante la totalidad del estudio. Un paciente quedará excluido de este estudio si el paciente muestra evidencias de una deficiencia primaria en BH4, ha recibido anteriormente varias dosis de BH4 durante más de 1 semana de tratamiento; está embarazada o en periodo de lactancia; ha recibido un fármaco en investigación en los 30 días anteriores a inscribirse en el estudio; o tiene una dolencia médica, enfermedad recurrente grave, u otra circunstancia excluyente que podría disminuir significativamente el cumplimiento terapéutico del estudio.

### 40 Dosis, vía y posología

Los pacientes recibirán BH4 a una dosis de 5-10 mg/kg por día. En el caso en que los niveles sanguíneos de Phe no disminuyan en una cantidad razonable y no se observen beneficios clínicos, la dosis se aumentará según sea necesario. El aumento de la dosis se producirá solamente después de que todos los pacientes hayan experimentado un mínimo de 2 semanas de tratamiento. La dosis de BH4 diaria se administrará por vía oral como líquido, polvo, comprimidos o cápsulas. La dosis diaria total puede proporcionarse como una sola dosis o quizás dividirse en dos o tres dosis diarias. Los pacientes se seguirán clínicamente, así como para cualesquiera reacciones adversas. Si se observa cualquier síntoma inusual, la administración del fármaco del estudio se detendrá inmediatamente, y se tomará una decisión sobre la continuación del estudio.

### Intervención en la dieta

Tras la aleatorización inicial y el período de tratamiento de dos semanas, todos los participantes del estudio se someterán a una asesoría dietética y seguirán una dieta estricta en Phe complementada con alimentos médicos específicos de Phe durante un total de cuatro a seis semanas. Las dietas se gestionarán en el domicilio, y la ingesta se registrará en diarios. El análisis de las ingestas de nutrientes y alimentos médicos y el porcentaje de ingesta diaria recomendada (RDI) se comparará entre los grupos de tratamiento.

### 60 Seguridad de BH4.

El tratamiento con BH4 se considerará seguro si no se producen reacciones farmacológicas agudas o crónicas significativas durante el estudio. La administración a largo plazo del fármaco se determinará como segura si no se observan anomalías significativas en las exploraciones clínicas, resultados del laboratorio clínico, u otros estudios adecuados.

## EJEMPLO 2

## Preparación de una forma estabilizada cristalizada de BH4

5 La solicitud de patente provisional de Estados Unidos con número de serie 60/520.377, titulada "Polymorphs of (6R)-L-erythro-tetrahydrobiopterin dihydrochloride" presentada el 17 de noviembre de 2003 a nombre de los solicitantes Rudolf MOSER, de Schaffhausen, Suiza y Viola GROEHN de Dachsen, Suiza y cedida a Merck-Eprova con el número de expediente 216, y la solicitud de Patente de los Estados Unidos con número de serie titulada "Polymorphs of (6R)-L-erythro-tetrahydrobiopterin dihydrochloride" presentada conjuntamente con la presente el 17 de noviembre de 2004 a nombre de los solicitantes Rudolf MOSER, de Schaffhausen, Suiza y Viola GROEHN de Dachsen, Suiza y al cesionario Merck-Eprova con número de expediente 216/US CIP (ambos de Moser et al. dichas solicitudes se denominan conjuntamente en el presente documento como "solicitudes de Moser" y ambas se han incorporado como referencia en el presente documento en su totalidad. Los ejemplos de dicha memoria descriptiva describen los espectros de rayos X y Raman para caracterizar los polimorfos de BH4. Cada una de las composiciones de la solicitud se puede utilizar en los métodos de tratamientos descritos en el presente documento. La siguiente divulgación proporciona antecedentes adicionales y una caracterización breve de algunas de dichas composiciones ilustrativas.

20 Los resultados que se pueden obtener durante el desarrollo del diclorhidrato de (6R)-L-eritro-tetrahydrobiopterina (véanse las solicitudes de Moser) indican que el compuesto puede suponer problemas polimórficos. El interés continuado en este campo requiere un método eficaz y fiable para preparar las formas polimórficas individuales del diclorhidrato de (6R)-L-eritro-tetrahydrobiopterina y condiciones de cristalización controladas para proporcionar las formas polimórficas, que son preferentemente estables y fáciles de manipular y procesar durante el proceso de fabricación y preparación de formulaciones.

25 Las técnicas de cristalización bien conocidas en la técnica para producir los cristales de fármaco se utilizan para preparar las formas polimórficas. Dichas técnicas incluyen, pero no se limitan a: técnicas como suspensión, precipitación, recristalización, evaporación, métodos de adsorción de agua de tipo solvente o descomposición de los solvatos. Se pueden utilizar soluciones diluidas, saturadas o supersaturadas de la BH4 para la cristalización, con o sin siembra de los agentes nucleantes adecuados. Se pueden aplicar temperaturas de hasta 150 °C para formar soluciones del fármaco. Se puede aplicar un enfriamiento para iniciar la cristalización y precipitación hasta -100 °C y preferentemente hasta -30 °C. Las formas polimórficas metaestables o pseudopolimórficas se pueden utilizar para preparar soluciones o suspensiones de formas más estables y conseguir concentraciones más elevadas de las soluciones.

35 Como se analiza en las solicitudes de Moser, la forma polimórfica se puede obtener mediante la cristalización de BH4 en mezclas de disolventes polares. Las solicitudes de Moser también describen un proceso para preparar la forma polimórfica del diclorhidrato de (6R)-L-eritro-tetrahydrobiopterina, que comprende la disolución, opcionalmente a temperaturas elevadas, de una forma sólida baja en energía derivada de la forma reivindicada del diclorhidrato de (6R)-L-eritro-tetrahydrobiopterina en una mezcla de disolventes polares, adición de semillas a la solución, enfriamiento de la suspensión obtenida y aislamiento de los cristales formados.

45 La disolución se puede llevar a cabo a una temperatura ambiente de hasta 70 °C. Más preferentemente, la disolución se lleva a cabo a temperaturas de hasta 50 °C. El material de partida se puede añadir a la mezcla final de disolventes para su disolución, o alternativamente, el material de partida primero se puede disolver en agua y otros disolventes se puede añadir juntos o uno después de otro. La solución de la BH4 preferentemente está agitada. El enfriamiento puede significar temperaturas de hasta -80 °C, preferiblemente hasta de -40 °C a 0 °C. En algunas realizaciones, para iniciar la cristalización del polimorfo de BH4, la solución se puede sembrar. Las semillas adecuadas pueden incluir una parte de la forma polimórfica de otro lote de cristales, o cristales de una morfología similar o idéntica. Tras el aislamiento, la forma cristalina se puede lavar con acetona o tetrahydrofurano y secarse con las técnicas comúnmente usadas para secar los cristales de los medicamentos.

55 Las formas polimórficas de BH4 descritas en las solicitudes de Moser son formas cristalinas muy estables del fármaco. El polimorfo se puede eliminar mediante filtración fácilmente, secarse y molerse hasta los tamaños de partículas deseado para las formulaciones farmacéuticas. Estas propiedades excepcionales convierten esta forma polimórfica en especialmente factible para la aplicación farmacéutica. La estabilidad de la forma polimórfica de BH4 se determinó una vez que la BH4x2HCl (la forma polimórfica) estuvo almacenada durante 8 meses en una bolsa con minisujeciones a 40 °C y una humedad relativa del 75 %. La calidad se comprobó en diferentes intervalos durante el periodo de 8 meses mediante HPLC. Después de 8 meses, la calidad y la estabilidad del polimorfo fueron sorprendentemente similares a la estabilidad observada al principio:

	0 meses (al principio)	después de 1 semana	después de 1 mes	después de 3 meses	después de 8 meses
HPLC [% área]	98,4	99,4	98,3	99,1	98,1

De acuerdo con ello, las solicitudes de Moser proporcionan descripciones de composiciones farmacéuticas que comprenden una forma polimórfica del diclorhidrato de (6R)-L-eritro-tetrahidrobiopterina y un transportador o diluyente farmacéuticamente aceptable. Dichas composiciones serán de utilidad en los métodos terapéuticos descritos en el presente documento.

Además de las solicitudes de Moser, los expertos en la materia también deben consultar las patentes de Estados Unidos con números 6.596.721; 6.441.168; y 6271.374, que describen diferentes métodos y composiciones para producir sales cristalinas estables de ácido 5-metiltetrahidrofólico y métodos y composiciones para producir formas estables de ácido 6R-tetrahidrofólico, y métodos y composiciones para producir formas estables de los ácidos 6S y 6R tetrahidrofólico. Cada una de estas patentes enseña métodos para producir formas cristalinas de agentes y técnicas para caracterizar dichos agentes. Dichos métodos se pueden utilizar para producir formas estables de BH4 para su uso en composiciones farmacéuticas para los métodos de tratamiento enseñados en el presente documento.

Todas las composiciones y/o métodos divulgados en el presente documento pueden ser formuladas y ejecutadas sin experimentación excesiva, considerando la presente divulgación. Aunque la invención se ha descrito en términos de realizaciones preferidas, será evidente para los expertos en la técnica que dichas variaciones se pueden aplicar a la invención y en las etapas o en la secuencia de etapas del método descrito en el presente documento. Más específicamente, será evidente que determinados agentes que están química y fisiológicamente relacionados se pueden sustituir por los agentes descritos en el presente documento siempre que se obtengan resultados análogos o similares. Todas estas sustituciones y modificaciones evidentes para el experto en la materia se consideran incluidas en la invención definida por las reivindicaciones adjuntas.

### EJEMPLO 3

Administración de tetrahidrobiopterina a seres humanos con elevados niveles de Phe en suero

Se llevó a cabo un estudio abierto, de dosis individual y múltiple en un total de 20 pacientes para demostrar la seguridad y eficacia de la tetrahidrobiopterina en seres humanos con elevados niveles de fenilalanina en sangre (> 600  $\mu\text{mol/l}$ ). Los criterios para la inclusión incluyeron (1) valor inicial de los niveles de Phe en sangre de >600  $\mu\text{mol/l}$ , (2) edad a menos de 8 años. Los criterios para la exclusión del estudio incluyeron (1) embarazo o lactancia, (2) enfermedades o dolencias concurrentes que requieren medicación o tratamiento, (3) tratamiento concurrente con cualquier fármaco conocido para inhibir la síntesis de folato, y (4) tratamiento con cualquier fármaco en investigación en los últimos 30 días. Cada uno de los pacientes se identificó también por tener una mutación en el gen de la fenilalanina hidroxilasa (PAH). Los sujetos del estudio se sometieron a evaluaciones de los valores iniciales incluyendo los antecedentes médicos con evaluación de la fenilcetonuria (PKU) o signos y síntomas relacionados con la hiperfenilalaninemia (HPA) exploración física, signos vitales, niveles de aminoácidos en suero sanguíneo (es decir, fenilalanina, tirosina, y triptófano), y ensayos de laboratorio rutinarios (química, hematología, y análisis de orina) antes de la inclusión en el estudio.

El fármaco ensayado era (6R)-5,6,7,8-tetrahidrobiopterina, conocido también como 2-amino-6-(1,2-dihidroxiopropil)-5,6,7,8-tetrahidro-3H-pteridin-4-ona tetrahidrobiopterina, o sapropterina (BH4 o 6R-BH4). El fármaco se obtuvo en comprimidos orales de 10 mg o 50 mg de Schircks Laboratories, Suiza (producto n.º 11.212 diclorhidrato de (6R)-5,6,7,8-tetrahidro-L-biopterina). La semivida de la sal de diclorhidrato 6R-BH4 de Schircks es de aproximadamente de 3,5 horas

No se permitió la administración de fármacos conocidos por inhibir la síntesis del folato tales como bactrim metotrexato, o 5-FU durante el estudio. Antes del inicio de la dosificación con 6R-BH4 se requirió un periodo de descanso terapéutico de 7 días para algunos fármacos conocidos por inhibir la síntesis del folato. No se permitió tomar fármacos en investigación durante la participación en el estudio o en un plazo de 30 días antes de la inscripción en el estudio.

En un máximo de 4 semanas tras la finalización de las evaluaciones de los valores iniciales, los sujetos candidatos comenzaron la primera etapa del estudio. Se administraron por vía oral dosis individuales crecientes de 10 mg/kg, 20 mg/kg y 40 mg/kg de 6R-BH4, con un periodo de descanso terapéutico de al menos 7 días antes de cada dosis y se vigilaron los sujetos 24 horas después de cada dosis. Los sujetos se sometieron a una evaluación de la seguridad y la medición de los niveles de aminoácidos en sangre (es decir fenilalanina, tirosina, y triptófano) antes y 24 horas después de cada dosis de 6R-BH4. Se midió la tensión arterial 30 minutos y 1 hora después de cada dosis. Las evaluaciones de la seguridad incluyeron exámenes físicos, signos vitales, evaluación en serie de los signos y síntomas relacionados con PKU o HPA, registro de episodios adversos y vigilancia de cambios en los parámetros de laboratorio (química, hematología, y análisis de orina). Se pidió a los sujetos para que continuaran su dieta usual sin ninguna modificación, y a registrar la ingesta diaria de alimentos y bebidas durante el estudio.

Después que se completara la primera etapa del estudio, los sujetos iniciaron la segunda etapa del estudio durante la cual recibieron 10 mg/kg de 6R-BH4 diariamente en una forma farmacéutica oral, durante un total de 7 días. Tras un periodo de descanso terapéutico de 7 días, cada sujeto recibió 20 mg/kg de 6R-BH4 diariamente durante un total de 7 días. Durante la segunda etapa del estudio, se vigiló a los sujetos antes de la dosificación, a las 24 y 72 horas

después de la primera dosis. y en el 7<sup>o</sup> día de la dosificación en cada uno de los dos niveles de la dosis. La vigilancia incluyó una evaluación de la seguridad como se ha descrito anteriormente, la medida de los niveles de aminoácidos en suero sanguíneo (es decir, fenilalanina, tirosina, y triptófano) y la evaluación de la captación oral de fenilalanina y tirosina. Se pidió a los sujetos que continuaran su dieta usual sin ninguna modificación, y a registrar la ingesta diaria de alimentos y bebidas durante el estudio

Tras una dosis única de 6R-BH4 (10 mg/kg), la Phe en sangre disminuyó en un  $10\% \pm 0,26\%$  del valor inicial. Las dosis individuales de 6R-BH4 a 20 mg/kg y 40 mg/kg mostraron declives medios del  $17\% \pm 0,28\%$  y  $27\% \pm 0,25\%$  respectivamente. La reducción de los niveles de Phe en sangre pareció ser dependiente de la dosis

La Figura 16 muestra el nivel medio de fenilalanina en sangre después de 10 y 20 mg/kg de 6R-BH4 diariamente durante 7 días, en 14 de 20 pacientes que respondieron al tratamiento. Para los fines de este estudio una disminución en los niveles de Phe en sangre del 30 % se consideró que era "sensible", aunque los pacientes que presentan menos de la disminución se beneficiarían también del tratamiento con BH4. El ensayo de siete días mostró una disminución sustancial de la concentración de Phe en un 70 % de los pacientes (14/20) tomando 20 mg/kg. de aquellos 14 pacientes, 10 (71 %) respondieron favorablemente a 10 mg/kg/día. Se observó que la tirosina en sangre aumenta en algunos, pero no en todos los pacientes algunos pacientes tuvieron aumentos de >80 % de los niveles de tirosina en los valores iniciales. Las respuestas de Phe en sangre individuales a las dosis múltiples de 10 mg/kg de BH4 se muestran en 11 adultos (Figura 17) y 9 niños (Figura 19). Las respuestas de Phe en sangre individuales a dosis múltiples de 20 mg/kg de BH4 se muestran en 11 adultos (Figura 18) y en 9 niños (Figura 20).

Por tanto, un ensayo de carga de dosis única fue inadecuado para identificar pacientes que respondían al tratamiento de BH4 con una reducción en el nivel de Phe en sangre del 30 % o más. Un ensayo de carga en el día 7 identificó satisfactoriamente un alto porcentaje de pacientes sensibles los 20 mg/kg. El ensayo de carga en el día 7 con 6R-BH4 identificó el 70 % de los pacientes con PKU que respondieron a los 20 mg/kg de BH4. De los 14 respondedores 71 % mostró también un 30 % o más de reducción en el nivel de Phe en sangre con la dosis inferior de 10 mg/kg de 6R-BH4.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Tetrahidrobiopterina (BH4), u opcionalmente una forma de sal de la misma, para su uso en el tratamiento de un sujeto con fenilcetonuria (PKU), en la que BH4 es para administrarse por vía oral una vez al día a una dosis diaria de 5 mg/kg a 30 mg/kg, y en la que la BH4 es para administrarse en combinación con una dieta restringida en proteínas.
- 10 2. La BH4 para su uso en el tratamiento de la reivindicación 1, en la que dicha BH4 se formula como una sal de diclorhidrato.
3. La BH4 para su uso en el tratamiento de la reivindicación 1 o 2, en la que la dosis diaria es de 10 mg/kg a 20 mg/kg.
- 15 4. La BH4 para su uso en el tratamiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que la dosis diaria es de 5 mg/kg, 6 mg/kg, 7 mg/kg, 8 mg/kg, 9 mg/kg, 10 mg/kg, 11 mg/kg, 12 mg/kg, 13 mg/kg, 14 mg/kg, 15 mg/kg, 16 mg/kg, 17 mg/kg, 18 mg/kg, 19 mg/kg o 20 mg/kg.
- 20 5. La BH4 para su uso en el tratamiento de las reivindicaciones 1 a 4, en la que el sujeto padece una PKU clásica severa.
6. La BH4 para su uso en el tratamiento de las reivindicaciones 1 a 4, en la que el sujeto padece PKU leve.
- 25 7. La BH4 para su uso en el tratamiento de las reivindicaciones 1 a 4, en la que el sujeto tiene una fenilalanina hidroxilasa mutante (PAH).
8. La BH4 para su uso en el tratamiento de la reivindicación 7, en la que la PAH mutante comprende una mutación en el dominio catalítico de la PAH.
- 30 9. La BH4 para su uso en el tratamiento de la reivindicación 7, en la que la mutación comprende una o más mutaciones seleccionadas entre el grupo que consiste de F39L, L48S, I65T, R68S, A104D, S110C, D129G, E178G, V190A, P211T, R241C, R261Q, A300S, L308F, A313T, K320N, A373T, V388M, E390G, A395P, P407S y Y414C,
- 35 10. La BH4 para su uso en el tratamiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que dicho sujeto es una mujer embarazada.

Modelo de difracción de rayos X en polvo del diclorhidrato de (6R)-L-eritro-tetrahidrobiopterina, Forma B

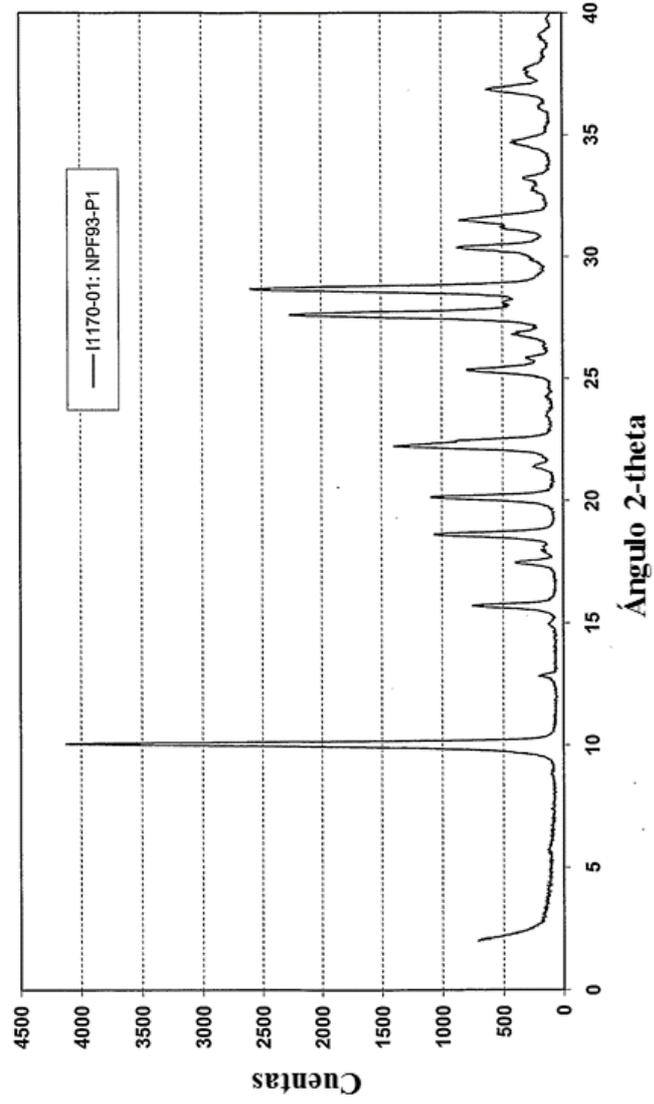


Figura 1

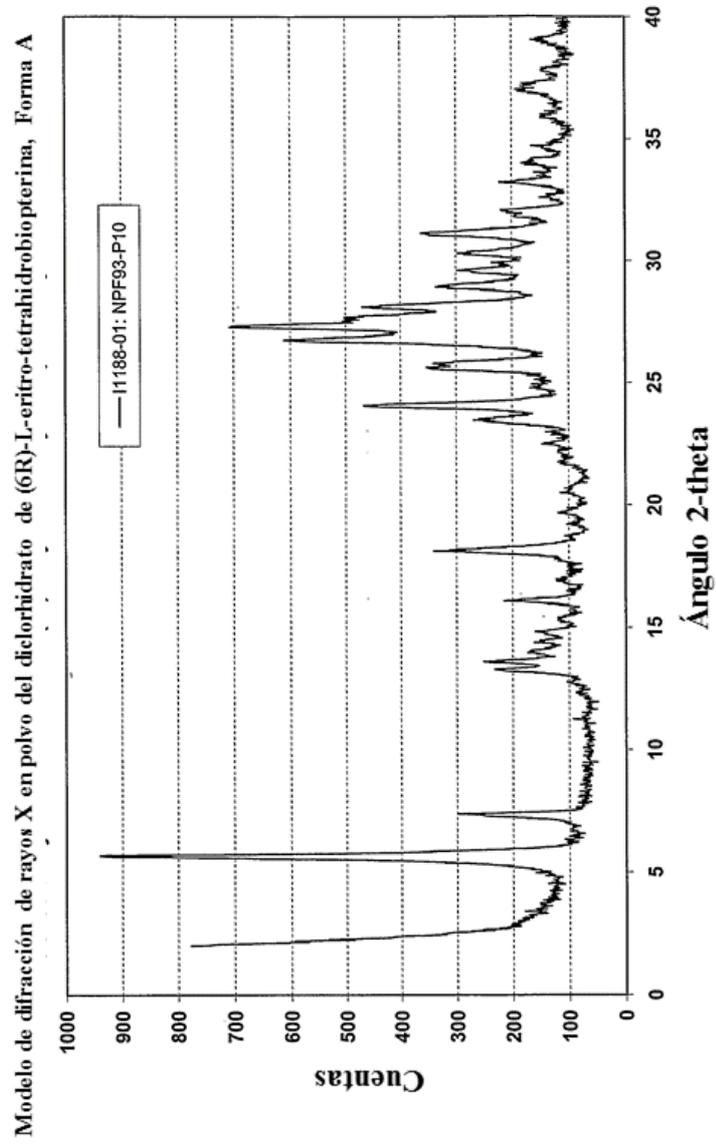


Figura 2

Modelo de difracción de rayos X en polvo del diclorhidrato de (6R)-L-eritro-tetrahidrobiopterina, Forma F

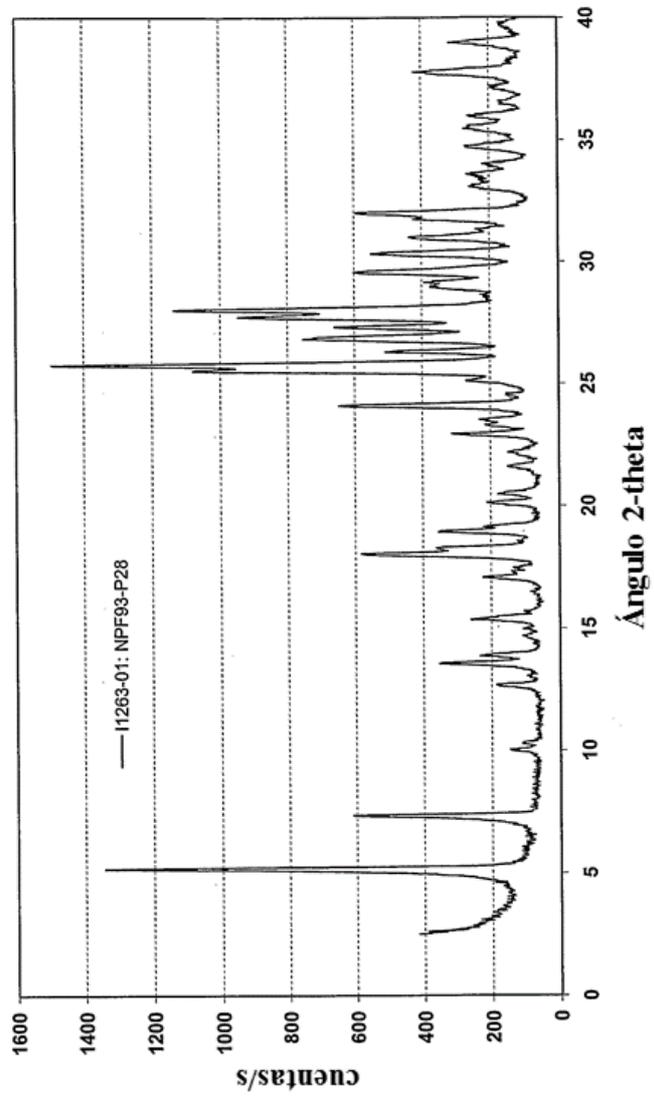


Figura 3

Modelo de difracción de rayos X en polvo del diclorhidrato de (6R)-L-eritro-tetrahidropterina, Forma J

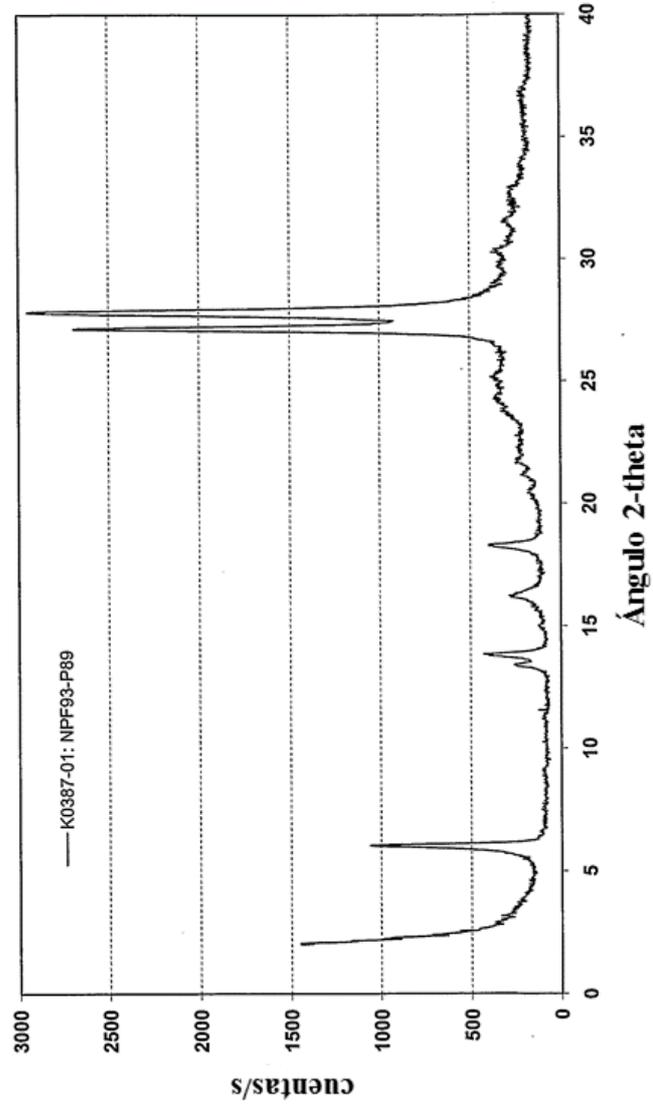


Figura 4

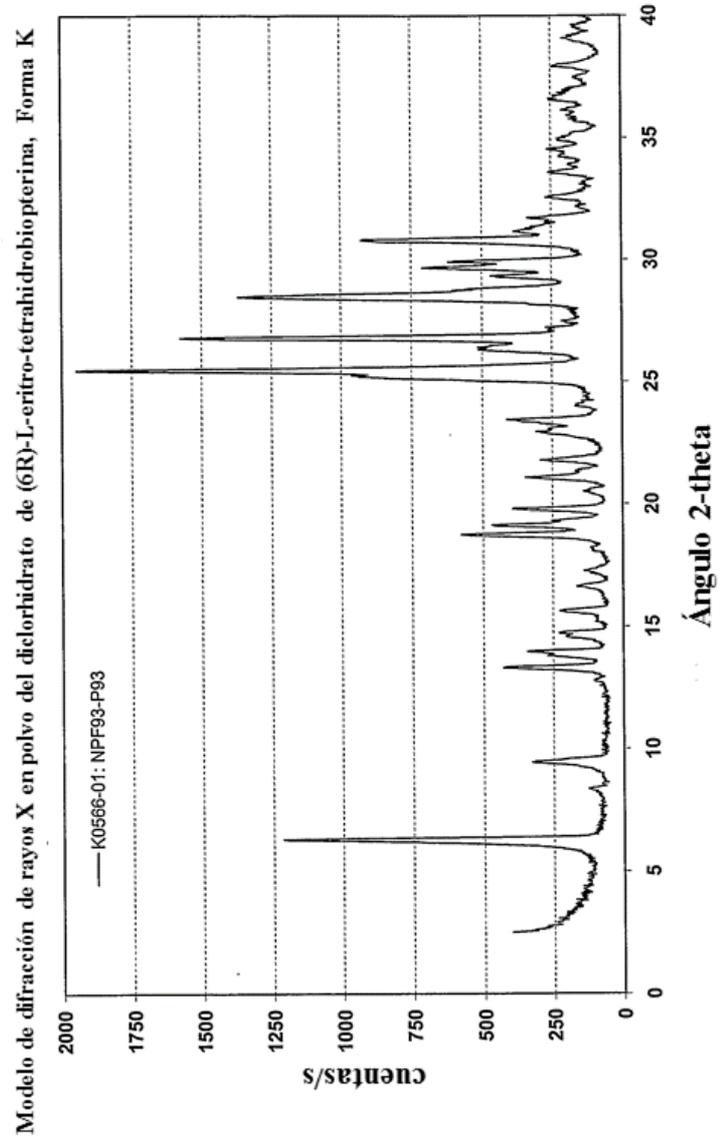


Figura 5

Modelo de difracción de rayos X en polvo del diclorhidrato de (6R)-L-eritro-tetrahidropterina, Forma C

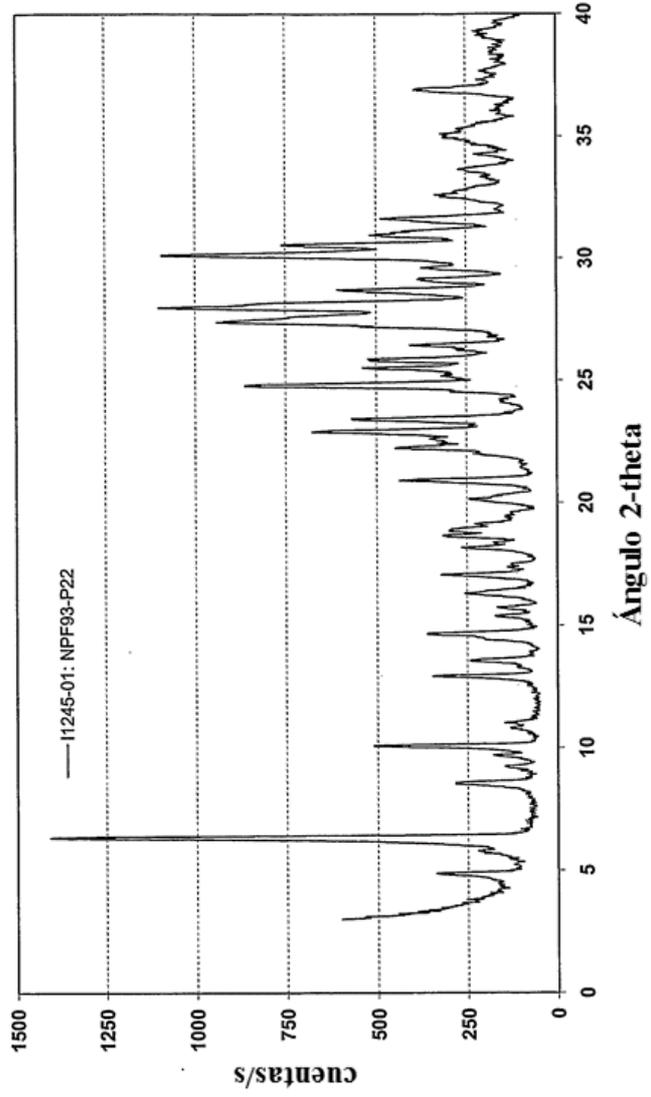


Figura 6

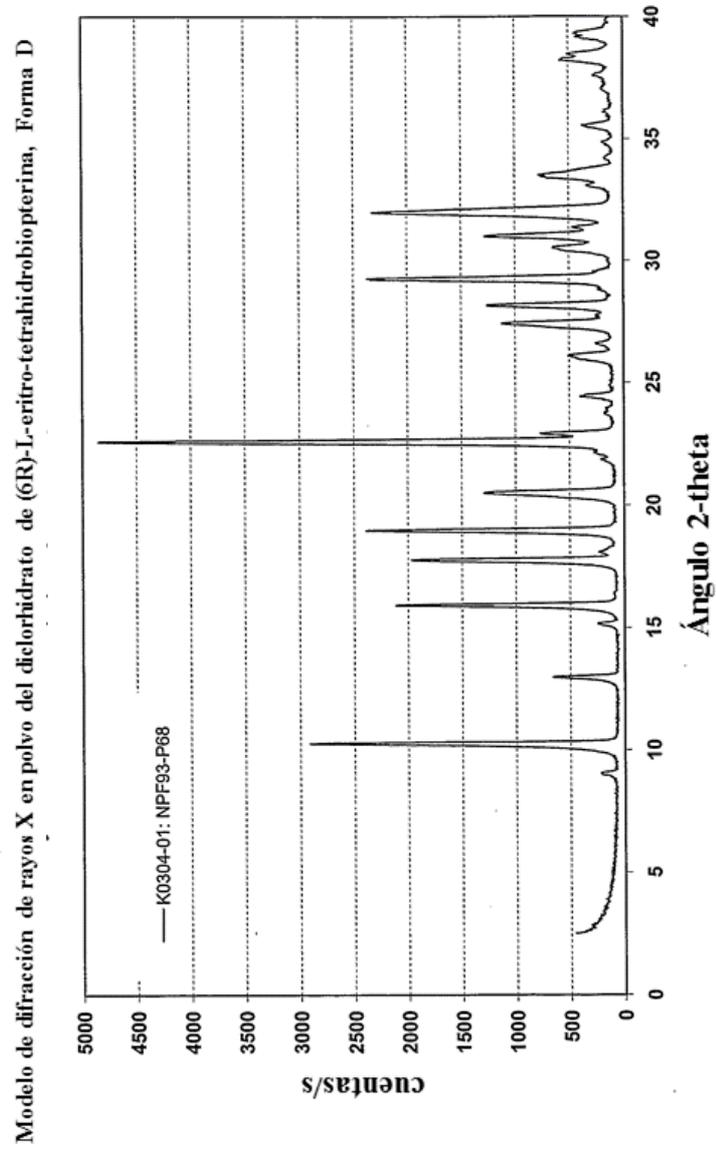


Figura 7

Modelo de difracción de rayos X en polvo del diclorhidrato de (6R)-L-eritro-tetrahidropterina, Forma E

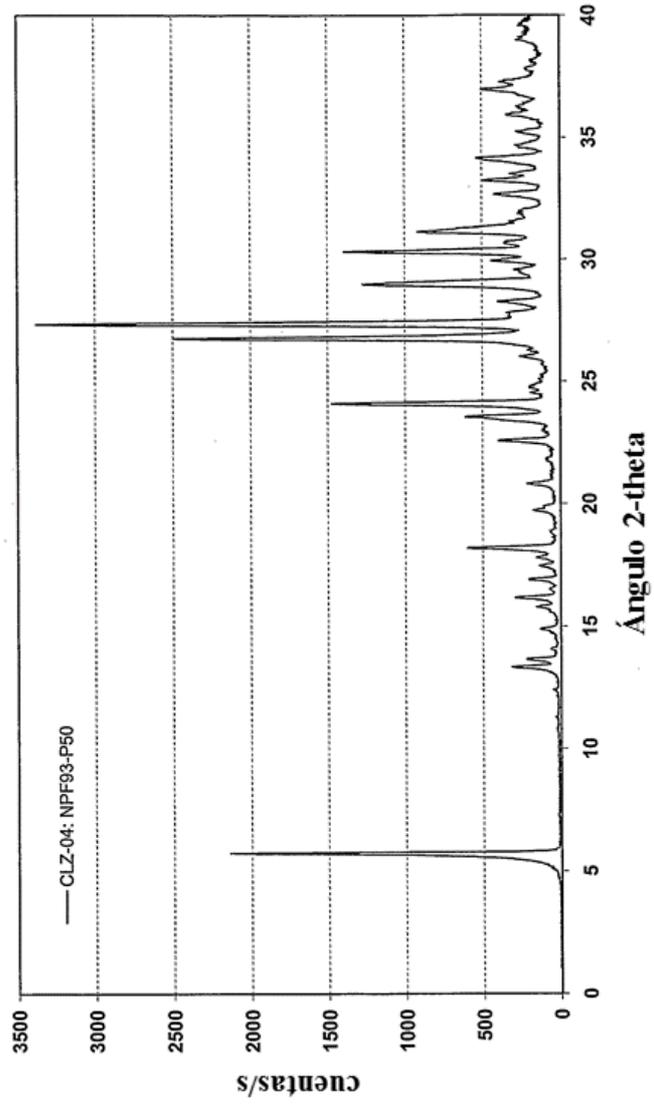


Figura 8

Modelo de difracción de rayos X en polvo del diclorhidrato de (6R)-L-eritro-tetrahidropterina, Forma H

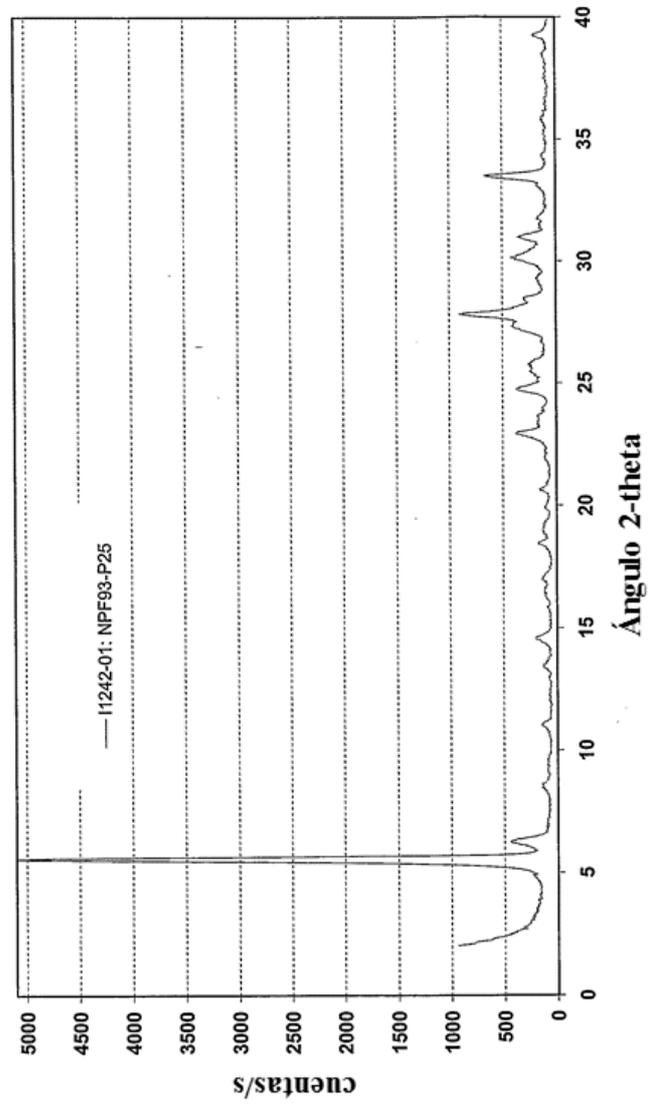


Figura 9

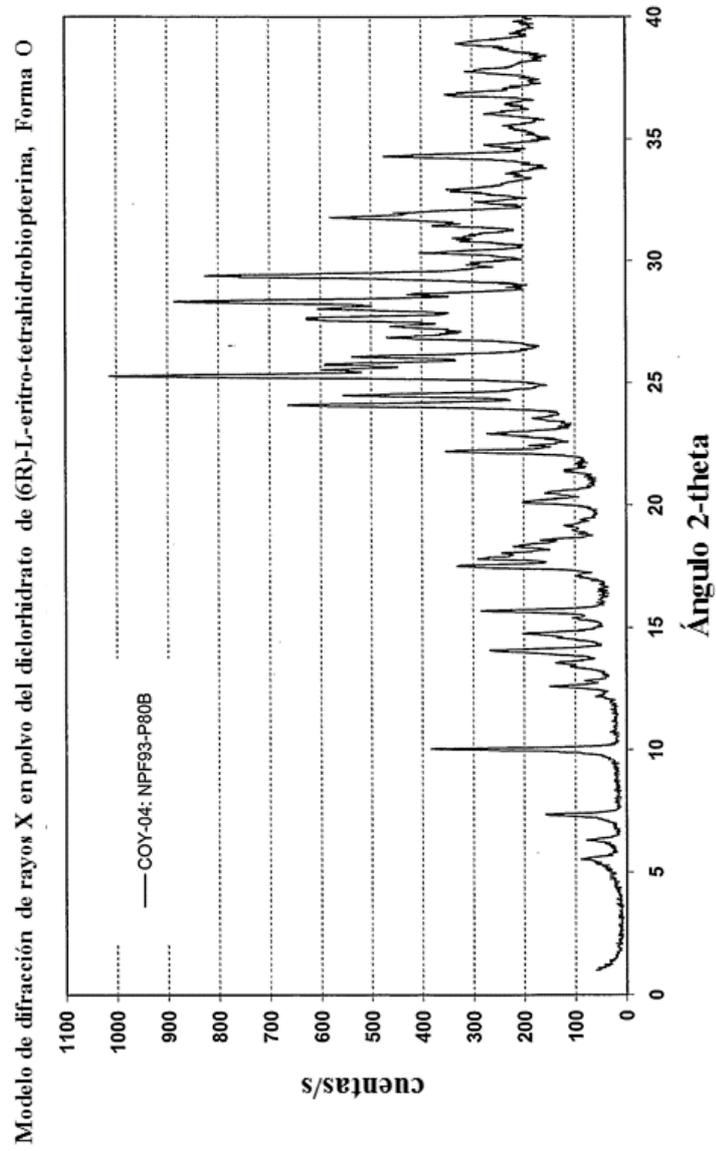


Figura 10

Modelo de difracción de rayos X en polvo del diclorhidrato de (6R)-L-eritro-tetrahidrobiopterina, Forma G

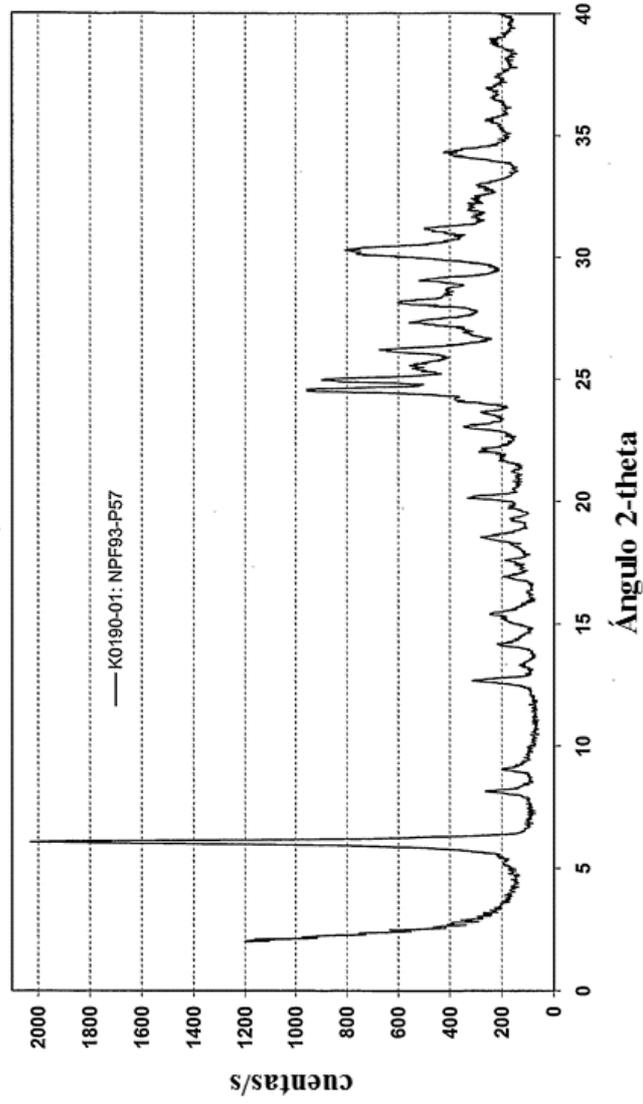


Figura 11

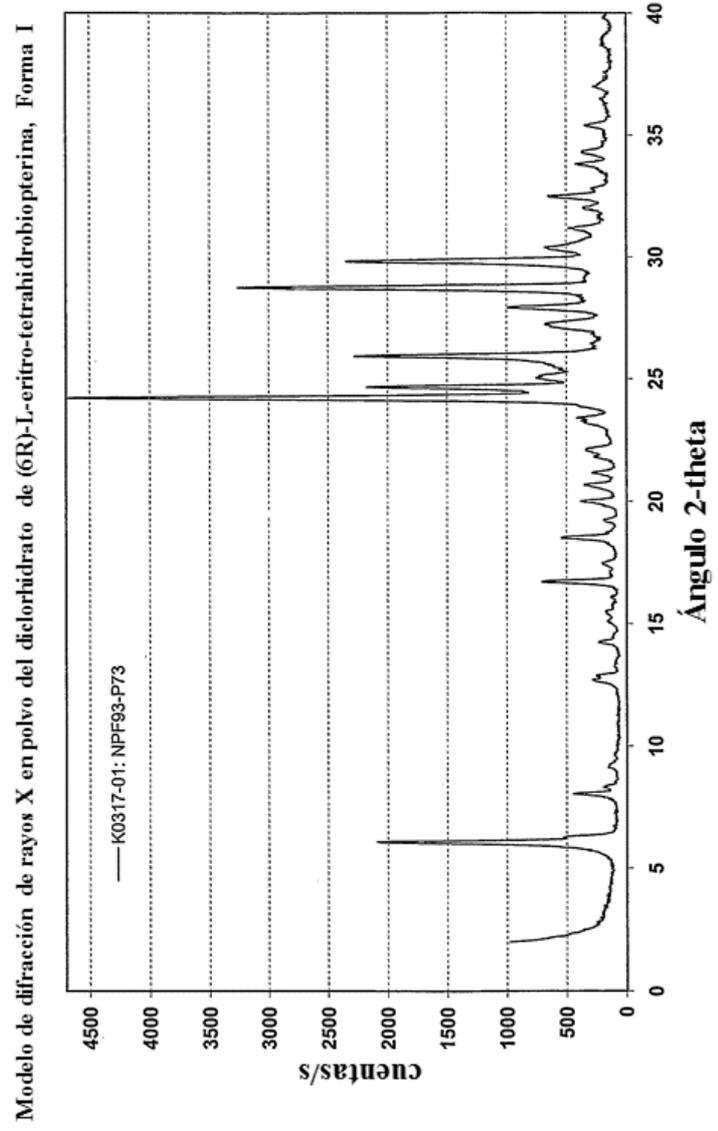


Figura 12

Modelo de difracción de rayos X en polvo del diclorhidrato de (6R)-L-eritro-tetrahidrobiopterina, Forma L

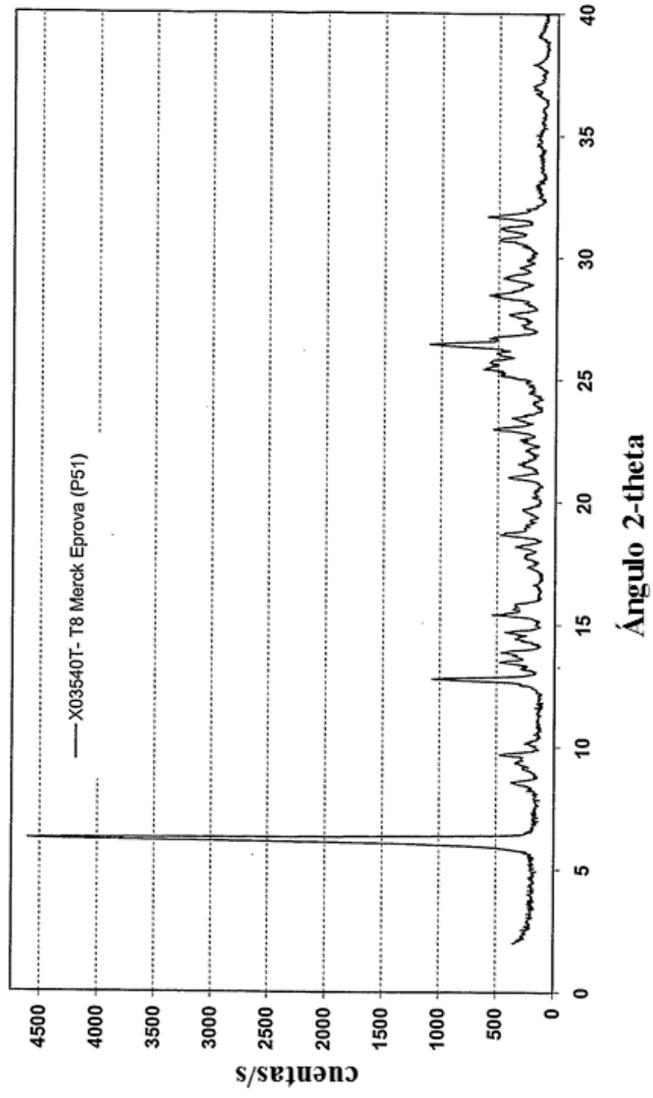


Figura 13

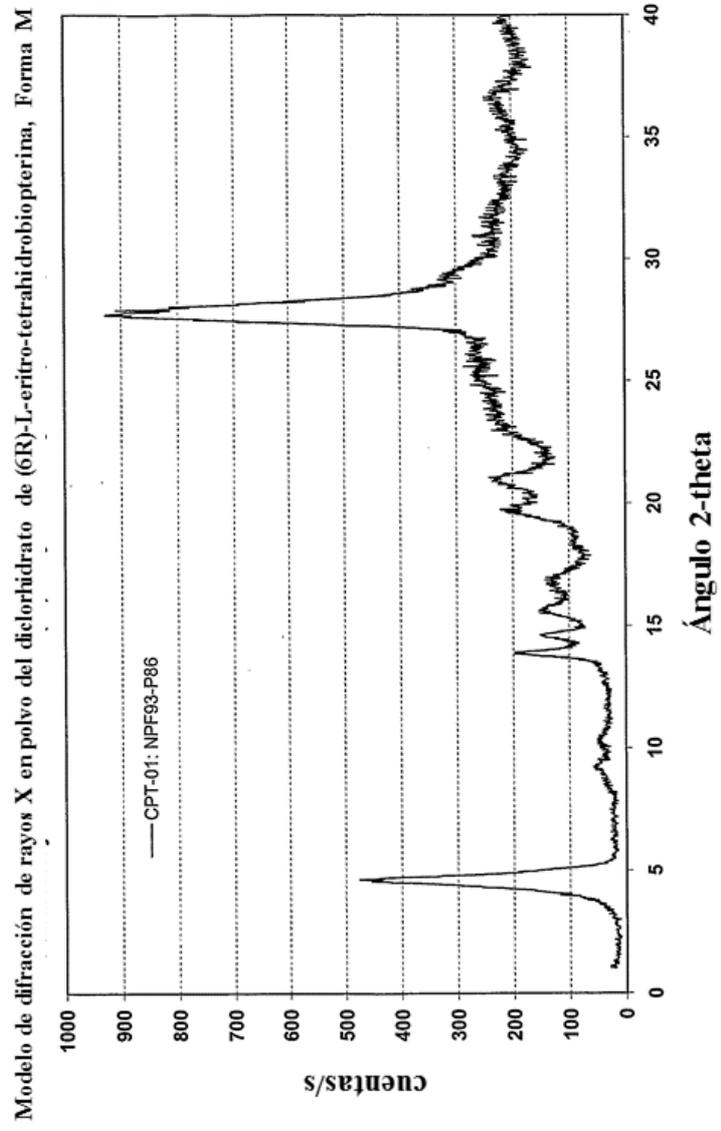


Figura 14

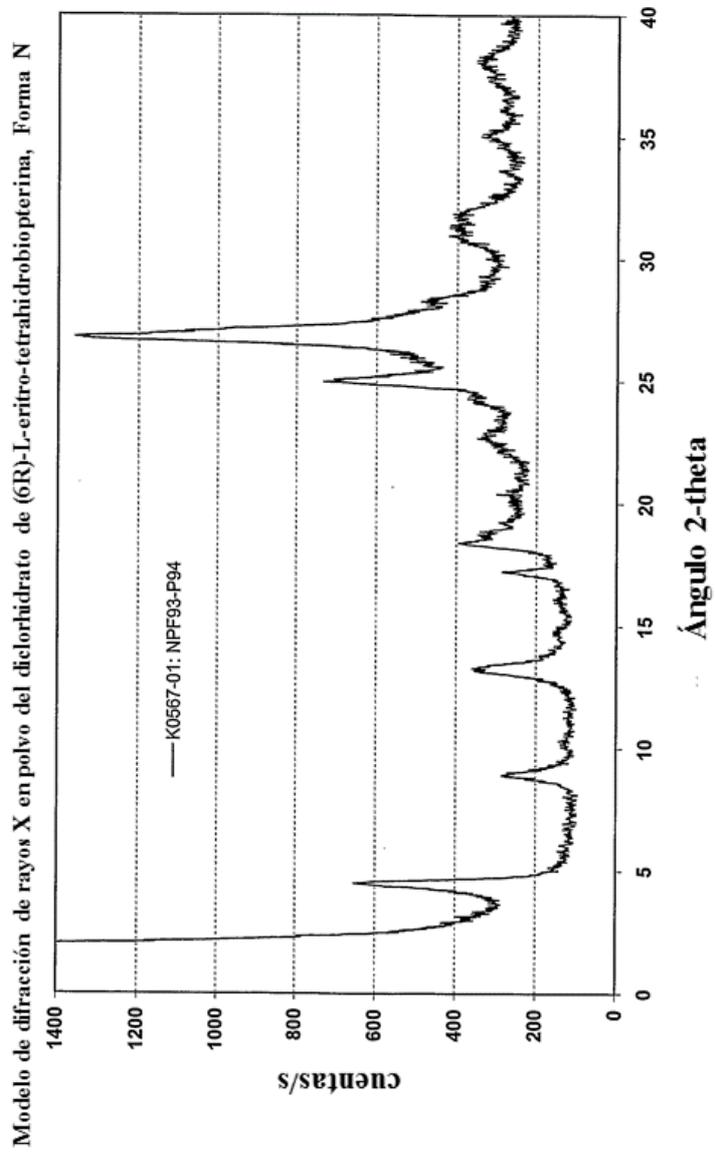
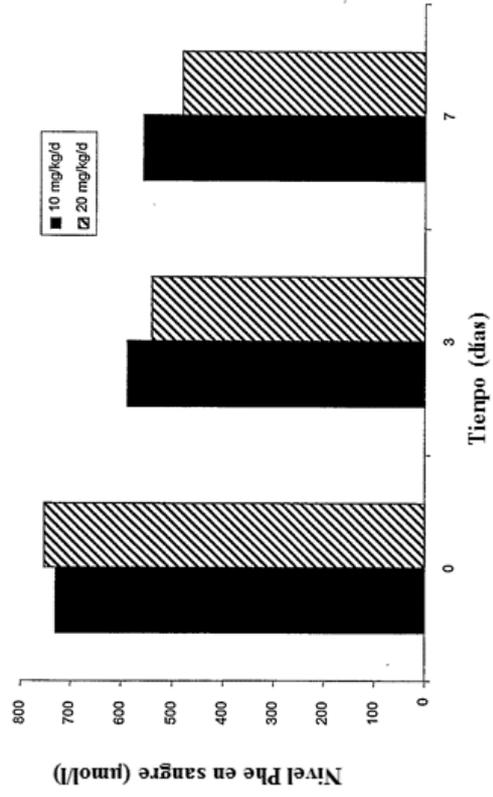


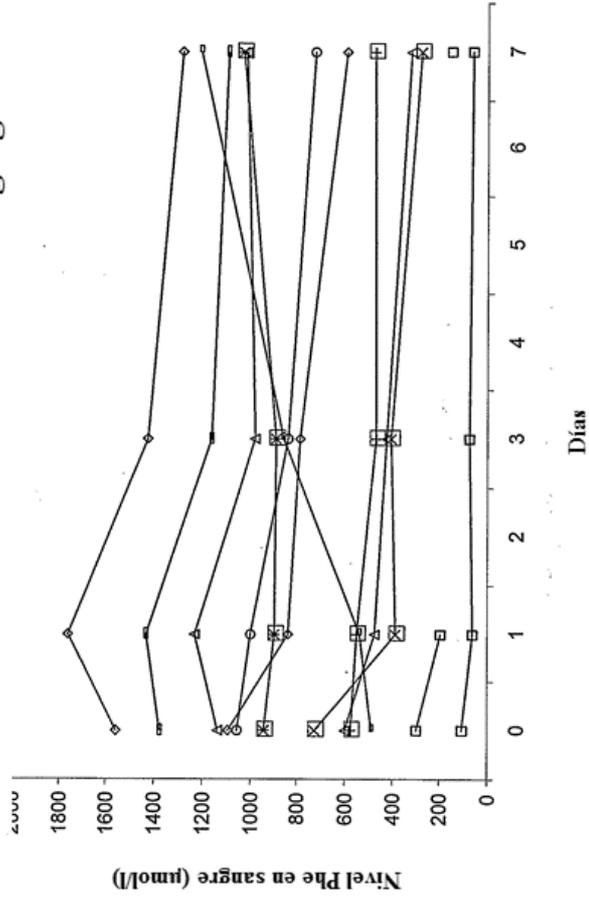
Figura 15

**Nivel medio en sangre de Phe a 3 y 7 días después de múltiples dosis diarias de BH4 de 10 y 20 mg/kg en pacientes de PKU (N=20)**



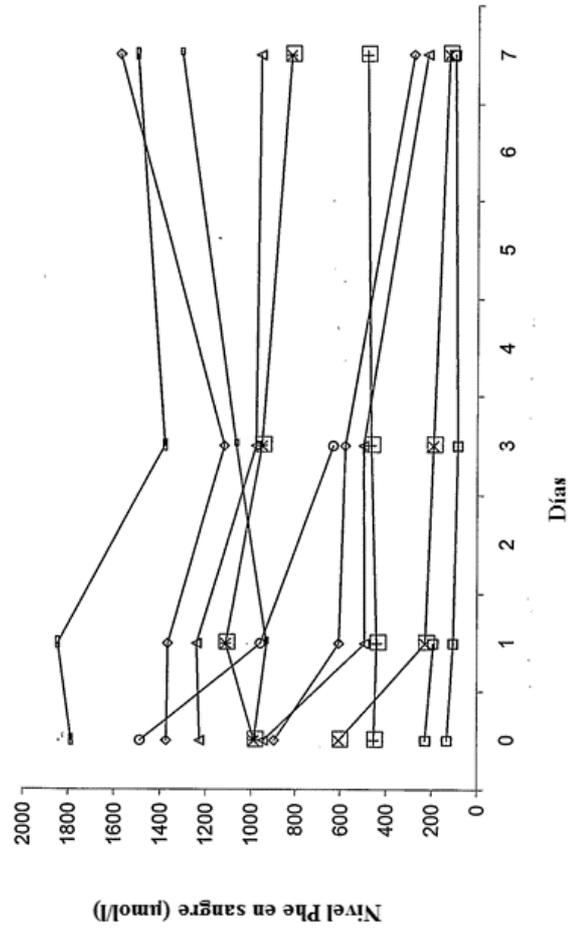
**Figura 16**

**Phe en sangre individual en 12 adultos con PKU  
tratados diariamente con 10 mg/kg de BH4**



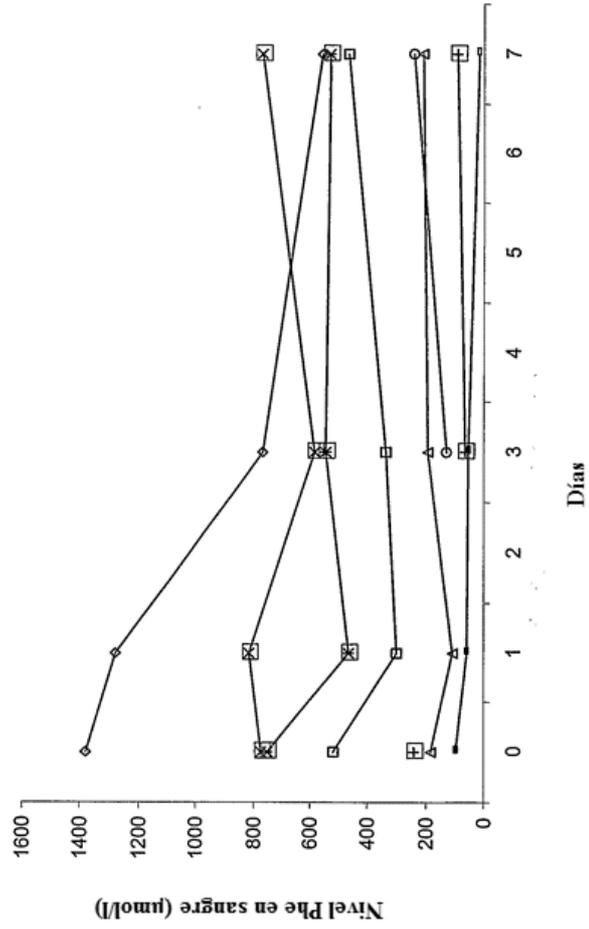
**Figura 17**

**Phe en sangre individual en 12 adultos con PKU  
tratados diariamente con 20 mg/kg de BH4**



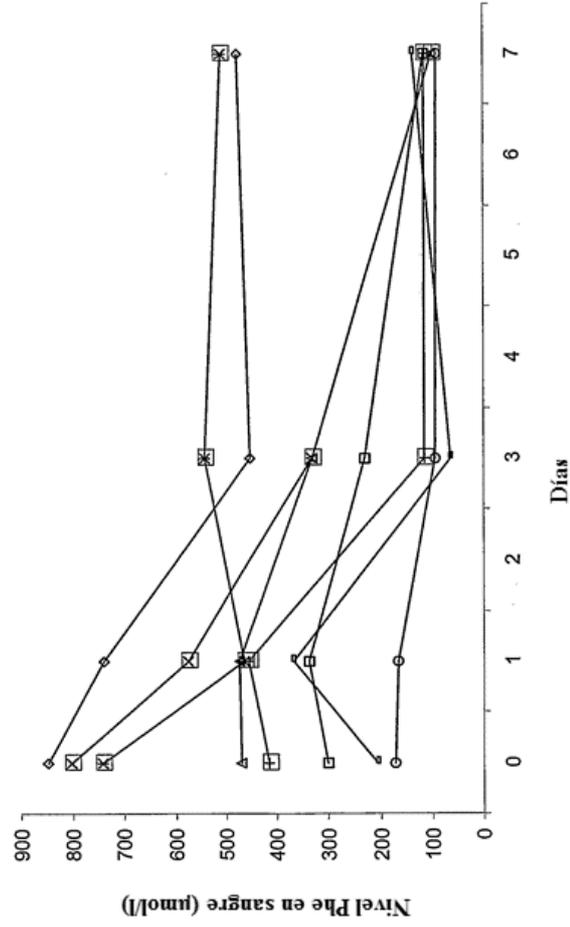
**Figura 18**

**Phe en sangre individual en 8 niños con PKU tratados  
diariamente con 10 mg/kg de BH4**



**Figura 19**

**Phe en sangre individual en 8 niños con PKU tratados  
diariamente con 20 mg/kg de BH4**



**Figura 20**