

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 682 619**

51 Int. Cl.:

A61K 9/72 (2006.01)

A61K 38/18 (2006.01)

A61P 9/10 (2006.01)

A61K 9/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.07.2006 PCT/CU2006/000007**

87 Fecha y número de publicación internacional: **25.01.2007 WO07009404**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.07.2006 E 06761631 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.07.2018 EP 1997483**

54 Título: **Formulaciones nasales rh-EPO con concentración de ácido siálico para el tratamiento de enfermedades del sistema nervioso central**

30 Prioridad:

22.07.2005 CU 1382005

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

21.09.2018

73 Titular/es:

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO DE MEDICAMENTOS (CIDEM) (100.0%)
Calle 26 No.1605 entre Boyeros y Puentes
Grandes Nuevo Vedado, Plaza
C.P. 10400 Ciudad de la Habana, CU**

72 Inventor/es:

**MUÑOZ CERNADA, ADRIANA;
GARCÍA RODRÍGUEZ, JULIO CÉSAR;
NUÑEZ FIGUEREDO, YANIER;
PARDO RUIZ, ZENIA;
GARCÍA SELMAN, JORGE DANIEL;
SOSA TESTÉ, ILIANA;
CURBELO RODRÍGUEZ, DAVID;
CRUZ RODRÍGUEZ, JANETTE y
SUBIROS MARTÍNEZ, NELVYS**

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 682 619 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

Formulaciones nasales rh-EPO con concentración de ácido siálico para el tratamiento de enfermedades del sistema nervioso central

5 Objeto de la invención

10 Esta invención está relacionada con la industria biofarmacéutica y en particular con la producción de una medicación intranasal de rhEPO con bajo contenido de ácido siálico (básico) a partir de células de ovario de hámster chino mediante ingeniería genética para el tratamiento de enfermedades cerebrovasculares, neurodegenerativas y psiquiátricas.

Antecedentes de la invención

15 La eritropoyetina (EPO) es una hormona glicoproteica cuyo peso molecular está dentro del rango de 34 kDa; la fracción de proteína consiste en aproximadamente 166 aminoácidos; se produce en las células de los riñones, el hígado y el sistema nervioso central y participa en la proliferación, diferenciación y maduración de los eritrocitos y de otras células hematopoyéticas.

20 En 1998, Sakanaka y sus colaboradores informaron sobre las propiedades de protección neuronal de rhEPO contra la lesión isquémica *in vivo* después de la oclusión de la arteria carótida común, un modelo de isquemia global seguido de la infusión de rhEPO en los ventrículos laterales de los jerbos. Esos autores observaron una reducción de la lesión isquémica en las neuronas del hipocampo CA1.

25 Los efectos protectores de neuronas de rhEPO pueden deberse a diferentes factores, que incluyen: antagonismo de la citotoxicidad inducida por glutamato, aumento en la expresión de enzimas antioxidantes, disminución en la formación de óxido nítrico (NO) mediado por radicales libres, normalización de flujo sanguíneo cerebral, influencia en la liberación de neurotransmisores, promoción de neoangiogénesis, inhibición de la apoptosis inducida por excitotoxina u óxido nítrico, aumento en la expresión de genes antiapoptóticos, efecto neurotrópico, disminución de la excitabilidad neuronal, efecto antiinflamatorio cerebral, inhibición de la apoptosis inducida por kainato y la producción de citoquinas proinflamatorias, efectos angiogénicos y neurogénicos. Además, el rhEPO contribuye al preconditionamiento isquémico. En conjunto, estas consideraciones pueden justificar el uso de rhEPO en el tratamiento de enfermedades cerebrovasculares, neurodegenerativas, psiquiátricas.

35 Las propiedades de protección de neuronas de rhEPO pueden prevenir o revertir la muerte de neuronas, una ocurrencia que caracteriza muchas enfermedades del sistema nervioso central, tales como isquemia, trauma neural y enfermedades neurodegenerativas y neuroinflamatorias.

40 También se ha descrito que los procesos neurodegenerativos contribuyen a desencadenar la fisiopatología de la esquizofrenia. Esta es la razón por la cual los fármacos protectores de las neuronas pueden ser una alternativa terapéutica efectiva para el tratamiento de esta enfermedad.

45 Una vez que el organismo ha estado expuesto a ciertas condiciones patológicas, como hipoglucemia o despolarización de neuronas fuertes, o debido a la generación de especies reactivas de oxígeno por las mitocondrias, la expresión de repu aumenta notablemente.

50 En otro aspecto, los procesos de inflamación aumentan la lesión cerebral a través de diferentes mecanismos, e incluso directamente inhiben la producción de EPO localmente. De hecho, aunque la repe se produce endógenamente en el cerebro después de la isquemia, su expresión se ve notablemente inhibida por las citoquinas inflamatorias. Esta inhibición reduce la capacidad de protección de neuronas de rhEPO y justifica la administración exógena de rhEPO como especialmente beneficioso para el tratamiento de enfermedades cerebrovasculares, neurodegenerativas o psiquiátricas.

55 Además, es bien sabido que la afinidad de la molécula de rhEPO por su receptor (y, por lo tanto, la efectividad de la respuesta fisiológica a esta molécula) está inversamente relacionada con el porcentaje de ácido siálico asociado a ella.

60 El efecto neuroprotector de la rhEPO administrada por vía intravenosa a modelos murinos de isquemia cerebral [LM Brines and cols, PNAS97 (19): 10526-10531, 2000] reduce la lesión causada por isquemia entre 50 y 75%, y un efecto similar se produce en humanos (documento WO 0354475). Sin embargo, los resultados clínicos y experimentales del uso de eritropoyetina humana recombinante (rhEPO) aún no han valorado el impacto potencialmente negativo a medio plazo del uso de esta molécula en la inducción de eritropoyesis, dado que la baja permeabilidad de la barrera hematoencefálica (BBB) y la baja afinidad de los receptores de rhEPO en el SNC, se requieren cantidades relativamente grandes de rhEPO durante un tiempo relativamente prolongado para lograr un efecto farmacológico efectivo. Bajo estas condiciones, uno corre el riesgo de una mayor viscosidad de la sangre y de una mayor posibilidad

65

de eventos trombolíticos que conducen a la isquemia cerebral. Estas consecuencias negativas de la aplicación de rhEPO ácida han sido reportadas como complicaciones en pacientes nefríticos tratados con esta molécula.

Se han realizado estudios para desarrollar métodos que aumenten la permeabilidad de la BBB, que se considera un paso crítico en la incorporación de sustancias a los tejidos cerebrales (US 5260308, WO 8901343, US 4801575, US 5442043, JP 57146710 y JP 01149718). Muchos de estos métodos implican los denominados vehículos (documento US 5442043) que forman un conjugado peptídico o utilizan péptidos quiméricos (documento US 4801575) para la incorporación de las sustancias al cerebro. Se ha reportado la preparación de liposomas que contienen eritropoyetina (documento JP 08231417).

El uso de la vía intranasal para hacer que las moléculas lleguen al SNC ha sido reportado para gangliósidos (US 4639437), así como para agentes neuronales terapéuticos que llegan al cerebro a través de su absorción por la membrana mucosa de la nariz y su posterior transporte a través de los nervios vía olfativa (documento EP 504263).

Existen varias patentes relacionadas con la protección de formulaciones líquidas de rhEPO, las más representativas de las cuales se enumeran a continuación:

Preparaciones líquidas en las que el principio activo utilizado es rhEPO, y en el que la proteína se presenta en todos los casos en forma inyectable (por ejemplo: CIPO-2041989; CIPO-2353553). Esta forma de administración indica que el rhEPO utilizado ha sido del tipo ácido, es decir, más del 40% de la molécula estaría cubierta con ácido siálico; de lo contrario, habría sido inactivado por las enzimas hepáticas y no sería clínicamente efectivo.

La patente CIPO-2074820 utiliza la vía intranasal para la administración de la proteína. En este caso, las ciclodextrinas se usan como un componente de la formulación y, asimismo, se busca una absorción sistémica de la rhEPO, de modo que la proteína también tiene que ser ácida.

Existen publicaciones científicas que se refieren al uso de agentes bioadhesivos para aumentar el tiempo de residencia de las proteínas en la cavidad nasal Polireddy D y col, International Journal of Pharmaceutics (127): 115 - 133, 1996); sin embargo, no existen informes sobre el uso de agentes bioadhesivos en formulaciones que contienen rhEPO.

La patente CIPO-2353553 justifica la administración exógena de rhEPO para el tratamiento de la isquemia cerebral, pero, al igual que en casos anteriores, se persigue que la proteína pase directa o indirectamente al torrente sanguíneo para que sea efectiva, de modo que también estamos en presencia de rhEPO con alto contenido de ácido siálico.

La patente CIPO-2408685 cubre diferentes formulaciones de rhEPO, pero en este caso están destinadas para el tratamiento de la anemia, por lo que es rhEPO ácida, ya que la rhEPO básica no puede promover la proliferación, diferenciación y maduración de los eritrocitos.

La patente CIPO-2437333 especifica que las formulaciones protegidas comienzan a partir de alfa eritropoyetina, es decir, a partir de rhEPO ácido.

En todos los casos expuestos anteriormente y revisados en la literatura, se hace referencia a rhEPO ácido, mientras que la patente que solicitamos está destinada a la protección de formulaciones líquidas a partir de rhEPO básico.

Wang et al., Journal of Neurochemistry, 91: 4 p, 900-910 (2004) se refiere a los efectos neuroprotectores asociados con administración intraperitoneal de asialoeritropoyetina.

Erbayraktar et al., PNAS, 100: 11, p. 6741-6747 (2003) se refiere a los efectos neuroprotectores asociados con la administración intravenosa de asialoeritropoyetina.

Descripción de la invención

Durante la producción de rhEPO, la glicoproteína se obtiene con diferentes contenidos de ácido siálico. La proteína que tiene menos del 40% de su molécula protegida con ácido siálico (básico) normalmente se elimina, ya que no es biológicamente activa por vía sistémica. Esta rhEPO básica, con un bajo contenido de ácido siálico, representa el 70% de la producción total de rhEPO. Sorprendentemente, hemos encontrado que la administración intranasal de rhEPO básica puede tener valores terapéuticos más elevados que la rhEPO ácida; los resultados de esta invención permiten aprovechar las isoformas básicas de rhEPO, que en este momento no se recuperan y son de fácil adquisición. Esto representa una gran ventaja económica porque permite recuperar lo que actualmente constituye un desperdicio de la producción de rhEPO.

La invención proporciona una formulación según la reivindicación 1.

La invención también proporciona una formulación para su uso de acuerdo con la reivindicación 7.

Esta formulación puede usarse para el tratamiento y/o la prevención de enfermedades del sistema nervioso central, incluyendo trastornos cerebrovasculares, neurodegenerativos y psiquiátricos, de forma ambulatoria a nivel del sistema de atención primaria de salud. Las ventajas de la solución propuesta incluyen el empleo de rhEPO con bajo contenido de ácido siálico con fines terapéuticos que permite un mayor efecto protector con dosis más pequeñas.

Se logra una llegada rápida del agente terapéutico al lugar de acción, y esto es crítico para lograr efectos terapéuticos satisfactorios en presencia de hipoxia cerebral. En el caso específico de las enfermedades cerebrovasculares, en la fase aguda es necesario comenzar con la intervención terapéutica antes de que se hayan producido ciertos procesos de isquemia en cascada. Esto se llama período de ventana terapéutica.

La administración intranasal de rhEPO básica elimina el riesgo de inducir eritropoyesis. Un incremento en la concentración de eritrocitos aumentaría la viscosidad sanguínea, poniendo en peligro la reperusión después de un episodio de oclusión o hemorragia, de modo que el flujo sanguíneo cerebral disminuiría y, por lo tanto, la llegada de oxígeno y nutrientes a los tejidos cerebrales se vería obstaculizada.

La vía intranasal tiene mayores ventajas que otras formas de administración, lo que permite un acceso rápido al cerebro; es menos invasivo que las vías endovenosa o intracerebroventricular, y un porcentaje de la rhEPO puede alcanzar el líquido cefalorraquídeo sin tener que pasar antes al flujo sanguíneo; esto evita el primer metabolismo del paso hepático, evitando así su consiguiente inactivación. La aplicación intranasal no es traumática y elimina los riesgos quirúrgicos y otras posibles implicaciones dadas por las formas traumáticas. Constituye una forma alternativa de acceso al cerebro sin dañar el BBB. El uso de una vía de administración alternativa a la vía vascular asegura la llegada de la molécula a las áreas del sistema nervioso central con riego sanguíneo pobre o nulo, por difusión a través del fluido intersticial.

Teniendo en cuenta que una de las principales limitaciones de la administración intranasal es la eliminación rápida del moco inducida por cilio, esta invención recurre a la estrategia de utilizar polímeros bioadhesivos que aumentan el tiempo de residencia de rhEPO en la cavidad nasal. Durante el desarrollo de la formulación, también se incorporaron otras sustancias auxiliares o receptoras, como conservantes, agentes tensioactivos, reguladores del pH, agentes isotónicos y estabilizadores de proteínas para obtener una formulación con estabilidad física, química y microbiológica que mantenga sus propiedades terapéuticas en todo momento.

El rhEPO utilizado contenía en su molécula menos del 40% de ácido siálico (es decir, rhEPO básico) con una concentración que oscila entre 0.5 y 2 mg/mL. Las formulaciones aquí presentadas son preparaciones líquidas, incoloras, transparentes, libres de impurezas mecánicas, con una viscosidad aparente que varía de 10 a 250 mPas. Como polímeros bioadhesivos, se emplearon hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC) en concentraciones de 0.4 a 0.9%, hidroxipropilcelulosa (HPC) de 0.2 a 0.8% y metilcelulosa (MC) de 0.25 a 0.5%.

El pH se ajustó a un rango de 6.0 a 7.5 usando principalmente tampones de fosfato y citrato en concentraciones de 20 a 100 mM/L.

La presión osmótica puede regularse con diferentes agentes isotónicos, por ejemplo: cloruro de sodio, manitol, sorbitol, glucosa, entre otros, en un rango de 0.05 a 10 g/L.

Los agentes conservantes utilizados fueron: cloruro de benzalconio en concentraciones de 0.01 a 0.02% en combinación con EDTA disódico en concentraciones dentro del rango de 0.01%, clorobutanol de 0.3 a 0.5%, metilparabeno a partir de 0.02 a 0.035% y propilparabeno de 0.01 a 0.02%.

Con el fin de evitar la adherencia de la proteína a las paredes del recipiente, se usaron tensioactivos no iónicos no iónicos, tales como laureato de polietileno sorbitan (Tween 20 a 80), cremophor RH 40, trioleato de sorbitán (spam 35 a 80), en un rango de concentraciones de 0.01 a 1 g/L.

Como estabilizadores de proteínas, se utilizaron diferentes aminoácidos, entre otros: L-triptófano. L-leucina, clorhidrato de L-arginina y clorhidrato de L-histidina en un rango de concentraciones entre 0.1 y 10 mg/mL. El disolvente utilizado en todos los casos fue agua de inyección.

Se llevaron a cabo pruebas de irritabilidad de la membrana mucosa nasal en ratas, y no se encontraron indicios de irritación a este nivel. Esto, junto con la excelente tolerancia del producto, proporciona validación toxicológica para el empleo de rhEPO básico en humanos.

Los estudios de estabilidad mostraron un comportamiento apropiado de las concentraciones de proteínas en el tiempo. Tras la aplicación del método Lowry ($\pm 10\%$), el pH se mantuvo dentro de los límites establecidos.

La invención también proporciona eritropoyetina humana recombinante para uso de acuerdo con la reivindicación 9.

Ejemplos de trabajo

Ejemplo 1:

Purificación de rhEPO con bajo contenido de ácido siálico:

- 5 Para la obtención de eritropoyetina básica con contenido de ácido siálico inferior al 40%, se realizaron tres pasos cromatográficos básicos, a partir de un material de gran complejidad y con gran cantidad de proteínas contaminantes, ya que este material contiene un 5% de suero fetal bovino. Luego se realiza un paso adicional para obtener las isoformas de interés.
- 10 Para la diafiltración y concentración de rhEPO básica se utilizó un sistema de ultrafiltración a escala de laboratorio (SARTOFLOW SLICE 200), acoplado a una bomba peristáltica (IP55 Watson-Marlow). Se utilizó una membrana Hydrosart de 10 kDa. El trabajo se realizó con un flujo de 1.9 ± 0.25 mL/min, una presión de alimentación (P1) de 2.9 ± 0.25 bar, una presión de fracción retenida (P2) de 0.65 ± 0.1 bar y una presión transmembrana (TM) de 1.8 ± 0.2 bar. Para la determinación de la concentración de proteína, se usó un espectrofotómetro Ultrospec TM 3100 a $\lambda = 280$ nm.
- 15 Para el proceso de diafiltración, se usó una solución tampón intranasal de NaH_2PO_4 y Na_2HPO_4 a un pH de 6.0 y una conductividad de 3.25 ms/cm. El pH se controló usando un medidor de pH Sartorius y un conductímetro Omega. El rendimiento del proceso se encuentra en el rango de 75 - 95%.

Tabla 1 muestra los resultados del proceso:

20

Tiempo (h)	pH	Conductividad (ms/cm)	Concentración n (mg/mL)	Volumen de solución intranasal incorporada (mL)	Volumen real (mL)
0	7.12	14.29	1.72	-	290.0
6.0	6.5	4.5	1.3	800	-
12	6.0	3.5	2.1	1100.0	210.0

Ejemplo 2:

- 25 Formulación nasal de rhEPO con bajo contenido de ácido siálico que utiliza HPMC como polímero bioadhesivo, clorhidrato de histidina como estabilizante. Tween 80 como tensioactivos no iónicos y cloruro de benzalconio como conservante.

Método de preparación:

- 30 La preparación de la solución comienza con un volumen de agua de inyección que representa el 30% del volumen total de la formulación. Este volumen se usa para disolver el conservante, el tampón y el agente isotónico. Aparte de esto, en un recipiente de la capacidad adecuada, se coloca un volumen de agua de inyección igual al 15% del volumen total de la formulación y se calienta a una temperatura que varía de 85 a 95 °C, y el polímero se dispersa con agitación fuerte, constante. Una vez que el polímero se humedece, la solución previamente preparada se incorpora al mismo
- 35 mientras se agita vigorosamente hasta la homogeneización total. La agitación se reduce luego para incorporar el volumen correspondiente de rhEPO básico, el tensioactivo no iónico y el estabilizador de proteína. Finalmente, el volumen se completa con agua de inyección hasta el 100% del volumen final de la formulación. La formulación se filtra posteriormente a través de una membrana de acetato de celulosa de 0.2 μm y se prueba el pH para verificar que se mantenga dentro del rango establecido.

40

La composición de la preparación finalizada es la siguiente:

Componente	Proporción
45 rhEPO básico	0.8 mg/ml
hidroxipropilmetilcelulosa	5.0 mg/ml
Clorhidrato de histidina	1.0 mg/mL
50 fosfato de dihidrógeno de sodio	2 mg/ml
fosfato de hidrógeno disódico	0.7 mg/mL
55 Tween 80	0.25 mg/mL

	cloruro de sodio	7.4 mg/mL
	Ácido etilendiaminotetraacético disódico	0.1 mg/mL
5	cloruro de benzalconio	0.2 mg/mL
	Agua de inyección	q.s. 1 ml

Ejemplo 3:

10 Formulación nasal de rhEPO con bajo contenido de ácido siálico similar al ejemplo anterior, pero utilizando metilcelulosa como polímero bioadhesivo.

Método de preparación: similar al ejemplo 2.

15 La composición de la preparación finalizada es la siguiente:

	Componente	Proporción
20	rhEPO básico	0.8 mg/mL
	Metilcelulosa	3.0 mg/mL
	Clorhidrato de histidina	1.0 mg/mL
25	fosfato de dihidrógeno de sodio	2 mg/mL
	fosfato de hidrógeno disódico	0.7 mg/mL
30	Tween 80	0.25 mg/mL
	cloruro de sodio	7.4 mg/mL
	Ácido etilendiaminotetraacético disódico	0.1 mg/mL
35	Cloruro de benzalconio	0.2 mg/mL
	Agua de inyección	q.s. 1 mL

40 Ejemplo 4:

Formulación nasal de rhEPO con bajo contenido de ácido siálico similar al ejemplo 2, pero utilizando Tween 20 como agente tensioactivo no iónico.

45 Método de preparación: similar al ejemplo 2.

La composición de la preparación finalizada es la siguiente:

	Componente	Proporción
50	rhEPO básico	0.8 mg/mL
	Hidroxipropilmetilcelulosa	5.0 mg/mL
55	Clorhidrato de histidina	1.0 mg/mL
	fosfato de dihidrógeno de sodio	2 mg/mL
	fosfato de hidrógeno disódico	0.7 mg/mL
60	Tween 20	0.20 mg/mL
	cloruro de sodio	7.4 mg/mL
65	Ácido etilendiaminotetraacético disódico	0.1 mg/mL

ES 2 682 619 T3

Cloruro de benzalconio 0.2 mg/mL

Agua de inyección q.s. 1 mL

5 Ejemplo 5:

Formulación nasal de rhEPO con bajo contenido de ácido siálico similar al ejemplo anterior, pero con 1.2 mg/mL del principio activo y sin clorhidrato de histidina como estabilizador de proteína.

10 Método de preparación: similar al ejemplo 2, pero sin usar clorhidrato de histidina.

La composición de la preparación finalizada es la siguiente:

15	Componente	Proporción
	rhEPO básico	1.2 mg/mL
	Hidroxipropilmetilcelulosa	5.0 mg/mL
20	fosfato de dihidrógeno de sodio	2 mg/mL
	fosfato de hidrógeno disódico	0.7 mg/mL
	Tween 20	0.20 mg/mL
25	cloruro de sodio	7.7 mg/mL
	Ácido etilendiaminotetraacético disódico	0.1 mg/mL
30	Cloruro de benzalconio	0.2 mg/mL
	Agua de inyección	csp 1 mL

35 Ejemplo 6:

Formulación nasal de rhEPO con bajo contenido de ácido siálico similar al ejemplo 2, pero con 1.2 mg/mL de principio activo y sin clorhidrato de histidina como estabilizador de proteína.

40 Método de preparación: similar al ejemplo 2, pero sin usar clorhidrato de histidina.

La composición de la preparación finalizada es la siguiente:

45	Componente	Proporción
	rhEPO básico	1.2 mg/mL
	Hidroxipropilmetilcelulosa	5.0 mg/mL
50	fosfato de dihidrógeno de sodio	2 mg/mL
	fosfato de hidrógeno disódico	0.7 mg/mL
	Tween 80	0.25 mg/mL
55	cloruro de sodio	7.7 mg/mL
	Ácido etilendiaminotetraacético disódico	0.1 mg/mL
60	Cloruro de benzalconio	0.2 mg/mL
	Agua de inyección	q.s. 1 mL

Ejemplo 7:

65 Formulación basada en rhEPO con bajo contenido de ácido siálico para administración intranasal, similar al ejemplo 2 pero con metilparabeno y propilparabeno como agentes conservantes antimicrobianos.

Método de preparación:

5 La preparación de la solución comienza con un volumen de agua de inyección que representa el 30% del volumen total de la formulación. Este volumen se usa para disolver el tampón y el agente isotónico. Aparte de esto, en un recipiente de capacidad apropiada, se coloca un volumen de agua de inyección igual al 15% del volumen total de la formulación y se calienta a una temperatura que varía de 90 a 95 °C. Los parabenos se disuelven y el polímero se incorpora con fuertes sacudidas constantes. Una vez que el polímero se humedece, la solución previamente preparada se incorpora al mismo mientras se agita vigorosamente hasta la homogeneización total. La agitación se reduce luego para incorporar el volumen correspondiente de rhEPO básico, el tensioactivo no iónico y el clorhidrato de histidina. Finalmente, el volumen se completa con agua de inyección hasta el 100% del volumen final de la formulación. La formulación se filtra posteriormente a través de una membrana de acetato de celulosa de 0.2 µm y se prueba el pH para verificar que se mantenga dentro del rango establecido.

15 La composición de la preparación finalizada es la siguiente:

Componente	Proporción
20 rhEPO básico	0.8 mg/m
Hidroxiopropilmetilcelulosa	5.0 mg/mL
Clorhidrato de histidina	1.0 mg/mL
25 fosfato de dihidrógeno de sodio	2 mg/mL
fosfato de hidrógeno disódico	0.7 mg/mL
30 Tween 80	0.25 mg/mL
cloruro de sodio	7.5 mg/mL
Metilparabeno	0.33 mg/mL
35 Propilparabeno	0.17 mg/mL
Agua de inyección	q.s. 1 mL

40 Ejemplo 8:

Formulación nasal de rhEPO con bajo contenido de ácido siálico similar al ejemplo anterior, pero utilizando metilcelulosa como polímero bioadhesivo.

45 Método de preparación: (similar al ejemplo 6).

La composición de la forma finalizada es la siguiente:

Componente	Proporción
50 rhEPO básico	0.8 mg/m
Metilcelulosa	3.0 mg/mL
55 Clorhidrato de histidina	1.0 mg/mL
fosfato de dihidrógeno de sodio	2 mg/mL
fosfato de hidrógeno disódico	0.7 mg/mL
60 Tween 80	0.25 mg/mL
cloruro de sodio	7.5 mg/mL
Metilparabeno	0.33 mg/mL
65 Propilparabeno	0.17 mg/mL

Agua de inyección q.s. 1 mL

Ejemplo 9:

5 Formulación nasal de rhEPO con bajo contenido de ácido siálico similar al ejemplo 7, pero usando Tween 20 como tensioactivo no iónico.

Método de preparación: similar al ejemplo 7.

10 La composición de la preparación finalizada es la siguiente:

Componente	Proporción
15 rhEPO básico	0.8 mg/m
Hidroxipropilmetilcelulosa	5.0 mg/mL
20 Clorhidrato de histidina	1.0 mg/mL
fosfato de dihidrógeno de sodio	2 mg/mL
fosfato de hidrógeno disódico	0.7 mg/mL
25 Tween 20	0.20 mg/mL
cloruro de sodio	7.5 mg/mL
30 Metilparabeno	0.33 mg/mL
Propilparabeno	0.17 mg/mL
Agua de inyección	q.s. 1 mL

35 Ejemplo 10:

Formulación basada en rhEPO con bajo contenido de ácido siálico similar al ejemplo anterior, pero sin clorhidrato de histidina como estabilizador y utilizando glucosa como agente isotónico.

40 Método de preparación: similar al ejemplo 7:

La composición de la preparación finalizada es la siguiente:

Componente	Proporción
45 rhEPO básico	1.2 mg/m
Hidroxipropilmetilcelulosa	5.0 mg/mL
50 fosfato de dihidrógeno de sodio	2 mg/mL
fosfato de hidrógeno disódico	0.7 mg/mL
55 Tween 20	0.20 mg/mL
Glucosa	48.0 mg/mL
Metilparabeno	0.33 mg/mL
60 Propilparabeno	0.17 mg/mL
Agua de inyección	q.s. 1 mL

Ejemplo 11:

65

Formulación basada en rhEPO con bajo contenido de ácido siálico similar al ejemplo anterior, pero con Tween 80 como tensioactivo no iónico.

Método de preparación: similar al ejemplo 7:

5

La composición de la preparación finalizada es la siguiente:

	Componente	Proporción
10	rhEPO básico	1.2 mg/m
	Hidroxipropilmetilcelulosa	5.0 mg/mL
	fosfato de dihidrógeno de sodio	2 mg/mL
15	fosfato de hidrógeno disódico	0.7 mg/mL
	Tween 80	0.25 mg/mL
20	Glucosa	48.0 mg/mL
	Metilparabeno	0.33 mg/mL
	Propilparabeno	0.17 mg/mL
25	Agua de inyección	q.s. 1 mL

Ejemplo 12:

30 Formulación nasal de rhEPO con bajo contenido de ácido siálico similar al ejemplo 7, pero utilizando clorobutanol como agente conservante antimicrobiano.

Método de preparación: similar al ejemplo 7:

35 La composición de la preparación finalizada es la siguiente:

	Componente	Proporción
40	rhEPO básico	0.8 mg/mL
	Hidroxipropilmetilcelulosa	5.0 mg/mL
	Clorhidrato de histidina	1.0 mg/mL
45	fosfato de dihidrógeno de sodio	2 mg/mL
	fosfato de hidrógeno disódico	0.7 mg/mL
50	Tween 80	0.25 mg/mL
	Cloruro de sodio	6.2 mg/mL
	Clorobutanol	5.0 mg/mL
55	Agua de inyección	q.s. 1 mL

Ejemplo 13:

60 Formulación basada en rhEPO con bajo contenido de ácido siálico similar al ejemplo anterior, pero con metilcelulosa como polímero bioadhesivo.

Método de preparación: similar al ejemplo 2:

La composición de la preparación finalizada es la siguiente:

65

	Componente	Proporción
--	------------	------------

	rhEPO básico	0.8 mg/mL
5	Metilcelulosa	3.0 mg/mL
	Clorhidrato de histidina	1.0 mg/mL
	fosfato de dihidrógeno de sodio	2 mg/mL
10	fosfato de hidrógeno disódico	0.7 mg/mL
	Tween 80	0.25 mg/mL
15	Cloruro de sodio	6.2 mg/mL
	Clorobutanol	5.0 mg/mL
	Agua de inyección	q.s. 1 mL

20 Ejemplo 14:

Formulación nasal de rhEPO con bajo contenido de ácido siálico similar al ejemplo 12, pero usando Tween 20 como agente tensioactivo no iónico.

25 Método de preparación: similar al ejemplo 2:

La composición de la preparación finalizada es la siguiente:

30	Componente	Proporción
	rhEPO básico	0.8 mg/mL
	Hidroxipropilmetilcelulosa	5.0 mg/mL
35	Clorhidrato de histidina	1.0 mg/mL
	fosfato de dihidrógeno de sodio	2 mg/mL
40	fosfato de hidrógeno disódico	0.7 mg/mL
	Tween 20	0.20 mg/mL
	Cloruro de sodio	6.2 mg/mL
45	Clorobutanol	5.0 mg/mL
	Agua de inyección	q.s. 1 mL

50 Ejemplo 15:

Formulación nasal de rhEPO con bajo contenido de ácido siálico similar al ejemplo 5, pero con clorobutanol como conservante antimicrobiano.

55 Método de preparación: similar al ejemplo 2:

La composición de la preparación finalizada es la siguiente:

60	Componente	Proporción
	rhEPO básico	1.2 mg/mL
	Hidroxipropilmetilcelulosa	5 mg/mL
65	fosfato de dihidrógeno de sodio	2 mg/mL
	fosfato de hidrógeno disódico	0.7 mg/mL

	Tween 20	0.20 mg/mL
5	Cloruro de sodio	6.5 mg/mL
	Clorobutanol	5.0 mg/mL
	Agua de inyección	q.s. 1 mL

Ejemplo 16:

Evaluación "in vitro" de la acción estimulante en células de origen nervioso de la formulación nasal de eritropoyetina humana recombinante con un bajo contenido de ácido siálico.

15 Con el fin de demostrar el efecto inductivo sobre la actividad específica de la enzima Glutacion-S-Transferasa (GST) de rhEPO en células de origen nervioso, así como para demostrar que la eritropoyetina humana recombinante ácida y básica tiene efectos similares sobre las células de origen nervioso, se realizó un estudio in vitro en células PC12. Las células se mantuvieron indiferenciadas en medio DMEM suplementado con 2 mM de L-Glutamina, 100 Unidades/ml de penicilina G, 100 microgramos/ml de estreptomycin (GIBCO), 10% (v/v) que contenía 10 mM de tampón Hepes. El medio de cultivo se preparó con suero de caballo entero al 10%. A las células se les añadieron eritropoyetina humana recombinante 0.6 y 15 nanomolar, con bajo contenido de ácido siálico (ejemplos 5 y 6) o eritropoyetina ácida (completamente glucosilada). Como controles, las células se añadieron a cantidades similares de rhEPO, previamente inactivadas por calor. Los valores de actividad específica de la GST obtenidos en estos cultivos se consideraron como 100%. Para la determinación de la actividad específica de la GST, se utilizó el homogeneizado de las células cultivadas con rhEPO ácido o básico; esto se llevó a cabo en un sistema de homogeneización completamente hecho de vidrio a 4 °C, con tampón de fosfato 0.1 M, pH = 6.95. El homogeneizado libre de células se obtuvo por centrifugación a 16000 X g, a 4 grados Celsius, en una centrífuga de alta velocidad refrigerada. El homogeneizado así obtenido se mantuvo en un baño de agua helada y se usó para la determinación de la actividad específica de la GST de acuerdo con el método de Habig, (Habig, W.H., Pabst, J.J., y Jakoby, W.B. 1974; Biol. Chem. 249 (22): 7130-7139). La determinación de proteína se llevó a cabo por el método de Bradford (Bradford Anal MM. Biochem. 72, (176) 158). El principal resultado obtenido fue que las células de origen nervioso respondían a la presencia de rhEPO modificando la actividad de la enzima GST. Los valores en el gráfico (Fig. 1) representan el valor medio de tres cultivos independientes. La respuesta a eritropoyetina humana recombinante con bajo contenido de ácido siálico fue similar a la respuesta a rhEPO ácida.

Ejemplo 17:

Eficacia terapéutica de la administración intranasal de rhEPO con bajo contenido de ácido siálico.

40 Se utilizaron jerbos de Mongolia de ambos sexos con un peso corporal entre 60 y 70 gramos. Tomaban agua y se alimentaron ad libitum en ciclos de 12 horas de luz alternadas con 12 horas de oscuridad durante todo el período experimental.

45 Los animales se sometieron a oclusión unilateral permanente de la carótida derecha bajo anestesia profunda por vía intraperitoneal, con diazepam (5.0 mg/kg) como preanestésico. Se usaron ketamina (47 mg/kg) y atropina (0.02 mg/kg) como agente anestésico. La carótida derecha se expuso bajo el estereoscopio, doblemente ligada y cortada. Los animales simulados se prepararon con las mismas manipulaciones, pero sin ligadura o corte de la carótida.

50 Para la evaluación clínica e histopatológica, los grupos experimentales fueron: Grupo control: carótida aislada, sin ningún otro procedimiento (simulación) (n = 10). Grupo de animales lesionados sin tratamiento: Animales lesionados, sin haber sido sometidos a ningún otro procedimiento (n = 20).

Grupo de animales lesionados con tratamiento: carótida aislada, doblemente ligado y cortado, con administración intranasal de rhEPO con bajo contenido de ácido siálico (ejemplo 10) (n = 20).

55 El tratamiento consistió en la aplicación en la cavidad nasal de 10 µl de rhEPO o su vehículo cada 8 horas diarias, desde una hora después de la operación hasta el cuarto día posterior a la operación.

60 Cada animal fue examinado para determinar su estado neurológico de acuerdo con una escala de 2 a 5 que incluía el tono corporal, la fuerza prensil y las alteraciones en la postura y la marcha. Un animal sobreviviente sin signos patológicos tiene un valor de 5 en esta escala.

65 La evaluación funcional se realizó observando la actividad exploratoria espontánea de los animales, es decir, contando el número de acciones de crianza (es decir, las instancias de pie sobre las puntas de las patas traseras) hechas por los roedores al explorar un nuevo receptor. El destinatario utilizado fue una caja cilíndrica vertical de 30 cm de diámetro y 25 cm de alto. Cada jervo se colocó en el centro de esta caja y se contaron las acciones de cría realizadas durante un rango de 3 minutos.

5 Siete días después de la operación, los animales se perfundieron a través del ventrículo izquierdo con solución de formaldehído al 4% en solución tampón de fosfato (PBS) a pH = 7.0. Los cerebros se extrajeron y se mantuvieron en esta solución durante algunos días. Más tarde, los cerebros se incluyeron en parafina, se cortaron en rodajas de 4 µm de grosor y se tiñeron con hematoxilina y eosina. Las secciones se evaluaron a 10 x y 40 x sin conocimiento previo de su identidad.

10 Para la evaluación del edema cerebral, se utilizaron 90 hembras de entre 60 y 70 g de peso corporal, comprendidas en los 3 grupos experimentales:

Animales simulados (n = 20).

Animales heridos sin tratamiento (n = 35).

15 Animales heridos con tratamiento (n = 35)

20 Tres, 12 y 24 horas después de la lesión, los animales fueron anestesiados y perfundidos con solución salina. El cerebro se extrajo de la cavidad craneal y los hemisferios se separaron el uno del otro. La determinación del contenido de agua se llevó a cabo de acuerdo con el método gravimétrico descrito por Calapai y col, 2000 según la ecuación: $\text{Agua\%} = \frac{[(\text{Peso húmedo del hemisferio} - \text{Peso seco del hemisferio}) \times 100 \times \text{Peso húmedo}^{-1}]}{1}$. Para el análisis de los datos, se establecieron diferencias entre los grupos y los muestreos para cada variable por medio de la prueba de la t de Student, el ANOVA (prueba de una vía) y la prueba de Dunnett para la comparación múltiple.

25 Para la evaluación del peso corporal de los animales, los machos fueron clasificados al azar en tres grupos experimentales (10 animales cada grupo) siguiendo el mismo esquema de tratamiento utilizado en los experimentos previos. Los animales se pesaron utilizando una escala de Sartorius el día de la operación y más tarde durante 5 semanas en serie (1 vez por semana).

30 Durante los experimentos descritos con la administración nasal de rhEPO, se observó una menor tasa de mortalidad entre los animales tratados durante los días posteriores a la cirugía en ambos sexos, como lo demuestra el análisis de las proporciones (Fig. 2).

35 Veinticuatro horas después de la ligadura unilateral, una parte de los animales mostró afectaciones en el estado neurológico, reveladas por medio del examen descrito y expresado por el puntaje (Fig. 3). Como se puede observar, en los animales heridos sin tratamiento apareció una lesión funcional significativa. La actividad exploratoria funcional motora pareció deprimida en animales isquémicos no tratados (Fig. 4), mientras que esta actividad en los animales tratados con rhEPO se mantuvo similar a la de los controles.

40 Los efectos de la lesión y la administración intranasal de rhEPO sobre el peso corporal de los animales en el modelo de isquemia unilateral permanente se muestran en la Fig. 5. Una comparación entre el grupo de animales heridos con el grupo lesionado y tratado y con el grupo simulado mostró diferentes comportamientos de las curvas de peso. El grupo de control y el grupo tratado lesionado tenían curvas similares, que contrastaban con la pérdida de peso en los animales lesionados y no tratados. En el transcurso de varias semanas, este grupo no pudo superar el peso promedio con el que comenzó el experimento.

45 Los resultados que consisten en una disminución del edema cerebral se debieron al hecho de que la administración intranasal de rhEPO proporcionó una protección significativa contra la formación de edema cerebral en todos los animales tratados (Fig. 6, a y b). De hecho, no se encontraron diferencias en el contenido de agua entre los animales tratados con rhEPO y los controles. Se encontró una situación diametralmente opuesta en el grupo de animales lesionados, no tratados, en los que el contenido de agua en el hemisferio lesionado (derecha) había aumentado durante todos los tiempos estudiados (3, 12 y 24 horas), y una alta significancia para 24 horas después de que se encontró la lesión ($p < 0.001$).

50 En cuanto a los hallazgos histopatológicos, la frecuencia de animales con el cerebro intacto fue mayor entre los animales de control que entre los animales no tratados ($p = 0.002$), y también fue mayor entre los animales tratados con rhEPO que entre los animales no tratados ($p = 0.03$). (Fig. 7).

60 Los animales no tratados se vieron afectados por edema generalizado y picnosis de todo el hemisferio derecho, así como por hemorragias en la fimbria del hipocampo derecho y en la corteza parietal del hemisferio derecho, áreas edematosas y cromatina difusa y densa en el hemisferio derecho, neuronas picnóticas en el hipocampo (Fig. 8).

Ejemplo 18:

65 Evaluación in vitro de la capacidad antioxidante de la eritropoyetina humana recombinante básica con bajo contenido de ácido siálico (ejemplo 10) en homogeneizado de regiones anatómicas del hipocampo, corteza cerebral y cerebelo de la rata.

Con el fin de demostrar que tanto el rHEPO ácido como el básico son capaces de contrarrestar la producción de malondialdehído (MDA) y 4-hidroxi-alquenos (4HDA) en homogeneizado de cerebro de rata, se realizó un experimento en animales. Para este propósito, se usaron ratas Wistar macho (n = 15) con un peso corporal entre 180 y 200 gramos. Los animales tomaban agua y se alimentaban ad libitum y estaban bajo un régimen de 12 horas de luz alternadas con 12 horas de oscuridad durante todo el período experimental. La metodología aplicada para obtener las regiones anatómicas fue la siguiente:

Los animales se sacrificaron por dislocación cervical y decapitación, el cerebro se extrajo rápidamente de la cavidad craneal y el tejido se congeló inmediatamente a -70 grados Celsius. El hipocampo, la corteza cerebral y el cerebelo de cada animal se disecaron con la ayuda de un atlas estereotáxico (Paxinos, G, y Watson, C., 1986. Academic Press, Nueva York, pp 230-259). Se formó un conjunto de cada una de estas regiones y se preparó un homogeneizado de cada región, que contenía 1: 8 partes de tejido por parte de tampón de fosfato 0.1 M a pH = 7.0. El líquido libre de células se obtuvo por centrifugación a 4 grados Celsius a 10 000 g durante 30 minutos. Los homogeneizados se mantuvieron en un baño de agua helada hasta la determinación de la actividad enzimática, para lo cual se utilizó un espectrofotómetro digital Spectro UV-VIS RS de Labo Med, Inc. El principal resultado obtenido fue que la eritropoyetina humana recombinante con bajo contenido de ácido siálico redujo en un 13% (0 - 23%) la producción de MDA + 4 HDA en los homogeneizados de las tres regiones estudiadas del cerebro de la rata. La disminución fue dependiente de la dosis utilizada. Los niveles más altos de protección se observaron en el hipocampo y el cerebelo, donde se detectaron niveles considerables de receptores de rHEPO. Las respuestas de rHEPO ácido y básico fueron similares (Fig. 9).

Ejemplo 19:

La aplicación de 90 000 UI de eritropoyetina humana recombinante con bajo contenido de ácido siálico (según la formulación del ejemplo 6) no induce una respuesta eritropoyética significativa.

Para demostrar que la eritropoyetina humana recombinante básica con bajo contenido de ácido siálico utilizada en los ensayos no tiene actividad eritropoyética significativa in vivo, se evaluaron sus efectos sobre la eritropoyesis de los jerbos de Mongolia utilizando una dosis de 90 000 UI en un estudio comparativo con 10 animales (5 con administración de rHEPO y 5 controles). Todos los animales fueron monitorizados (antes de la administración, 7 días después de la administración y 14 días después de la administración) para realizar un hemograma completo en sangre total (10 µL de EDTA al 10%/mL de sangre) usando un contador MICROS ABX automatic para procesar las muestras. El paquete estadístico SPSS basado en Windows, tomando p = 0.05 como nivel de confianza, se utilizó para procesar las variables. Se obtuvieron los siguientes resultados (Tabla 1).

Tabla 1. Parámetros hematológicos obtenidos para los diferentes grupos.

		X	1 SD	Muestras 2 X SD	X	3 SD
Grupo 1	HB (g/dL)	13,3	1,1	13,2	0,7	12,8 0,9
	ETO (106/mL)	7,82	0,95	8,04	0,54	7,63 0,59
	HTC (%)	41,9	4,5	43,2	2,8	41,4 3,6
	PLT (103/mL)	612	214	670	101	761 75
	VCM (fL)	53	1	54	1	54 1
	HCM (pg)	17,0	0,7	16,4	0,3	16,8 0,2
	CHCM (g/dL)	31,7	0,9	30,5	0,5	31,0 0,6
	LEUC (103/mL)	9,7	4,9	8,8	3,6	6,0 2,8
	RETIC (%)	1,6	0,7	1,9	0,8	3,0 1,3
	RETIC (106/mL)	0,12	0,05	0,16	0,07	0,22 0,09
Grupo 2	HB (g/dL)	13,4	0,5	14,3	0,3	13,3 0,3
	ETO (106/mL)	8,21	0,55	8,82	0,41	8,13 0,45
	HTC (%)	43,4	2,4	48,1	1,1	43,9 1,7
	PLT (103/mL)	503	213	673	197	714 134
	VCM (fL)	53	2	55	2	54 2
	HCM (pg)	16,4	0,9	16,2	0,6	16,4 0,8
	CHCM (g/dL)	31,0	0,9	29,7	0,5	30,4 0,7
	LEUC (103/mL)	5,4	1,2	4,9	0,9	5,1 0,9
	RETIC (%)	1,3	0,6	1,6	0,5	2,1 1,3
	RETIC (106/mL)	0,11	0,05	0,14	0,04	0,17 0,10

5 La distribución de las poblaciones para cada parámetro hematológico mediante muestreo con $p = 0.05$ y $n = 10$ mostró una distribución normal. En el análisis de la homogeneidad de la varianza se observó que, de forma general, las varianzas tenían un comportamiento homogéneo, excepto HB y HTC en el muestreo I, es decir, LEUC.

10 Al comparar las varianzas de la variable hematológica de los grupos en los diferentes muestreos, se observaron diferencias en HB, ETO, HTC y CHCM del muestreo II, donde se evidencian diferencias entre el grupo control y el grupo tratado. Al comparar las varianzas entre los muestreos para cada grupo, se observaron diferencias en CHCM del grupo de control (muestreo I vs, muestreo II), mientras que el grupo tratado mostró diferencias en HB y HTC (muestreo II versus muestreos I y III) y el CHCM (muestreo II vs, muestreo I). Para la evaluación de las diferencias de las variables antes mencionadas entre los grupos por muestreos, el muestreo I fue tomado como muestreo de referencia para las comparaciones.

15 Teniendo en cuenta que se muestran algunas diferencias estadísticas $p = 0.05$ entre los grupos y entre los muestreos, se decidió llevar a cabo una evaluación más integral de los datos obtenidos; para este propósito, se agruparon los valores de muestreo I, un momento en el que los animales no habían sido tratados $n = 10$, y se calculó el rango de esta población $X \pm 2$ SD, luego el comportamiento de los valores medios para cada variable fue graficado (Fig. 10). Los valores medios de las variables también se compararon con los reportados por otros autores para esta especie, y luego se determinó que, en todos los grupos y muestreos, los valores obtenidos fueron similares a los reportados en la literatura (Tabla 2).

25 Aunque las comparaciones estadísticas muestran que las variables HB, ETO y HTC aumentaron significativamente en el muestreo II, al analizar este comportamiento de acuerdo con el rango normal $X \pm 2$ SD y los valores promedio reportados en la literatura (Handbook of Care and Use of Experimental Animals, Canadian Council for Animal Protection. Volumen 1, 2da edición. 1998), se puede observar que este comportamiento carece de importancia biológica, por lo que se puede concluir que la eritropoyetina humana recombinante con bajo contenido de ácido siálico no induce ninguna respuesta eritropoyética significativa en las especies estudiadas.

30 Tabla 2. Valores hematológicos normales para jerbos.

Parámetro	Valores hematológicos normales para jerbos
ERIT ($10^6/\text{mL}$)	8.5 (7.0-10.0)
Hb (g/dL)	15.0 (12.1-16.9)
PCV (L/L)	0.48 (0.41-0.52)
PLT ($10^3/\text{mL}$)	638
LEUC. T ($10^3/\text{mL}$)	4.3-21.6
Neutrófilos ($10^3/\text{mL}$)	0.3-4.1
Linfocitos ($10^3/\text{mL}$)	3.2-9.7
Sangre V. (mg/kg)	60-85

Ejemplo 20:

35 Etiquetado con I^{125} de eritropoyetina humana recombinante con bajo contenido de ácido siálico.

Con el fin de determinar el paso de eritropoyetina humana recombinante con bajo contenido de ácido siálico (ejemplos 3 y 5) a regiones del sistema nervioso central por administración intranasal, rhEPO se marcó con yodo 125 de acuerdo con el método comercial (YODOGEN) de Pierce, Rockford, Illinois 61105, EE. UU. A partir de esta marcación radiactiva, se prepararon formulaciones intranasales. Se utilizaron un total de 18 ratas Wistar machos de un peso corporal entre 180 y 200 g. Los animales se trataron por administración intranasal de esta formulación de eritropoyetina humana recombinante con bajo contenido de ácido siálico marcado con I^{125} . Cada animal recibió administración intranasal de 5 a 100 microlitros de la formulación. A intervalos de 5, 30 o 60 minutos, los animales fueron sacrificados por decapitación bajo anestesia. El cerebro se eliminó rápidamente (en menos de 70 segundos). Las áreas del bulbo olfatorio y el cerebelo se extrajeron. El recuento radiactivo se llevó a cabo con un contador gamma. Se obtuvieron los siguientes resultados: una aplicación de eritropoyetina humana recombinante con bajo contenido de ácido siálico alcanza regiones del cerebro en al menos 5 minutos y disminuye con el tiempo de forma gradual desde la región frontal hasta la región caudal del cerebro. A los 60 minutos de la aplicación, todavía hay algo de rhEPO en las regiones de los bulbos olfatorios y el cerebelo. Estos resultados indican que aproximadamente entre el 1 y el 5% de la rhEPO

5 aplicada por vía nasal llega al cerebro. Entre 80 y 85% de la rhEPO que llega al cerebro se detectó en los bulbos olfatorios, mientras que casi el 20% se detectó en el cerebelo a los 5 minutos de la aplicación. Después de unos 30 minutos, estas concentraciones fueron casi iguales, y después de 60 minutos, el cerebelo tenía 30% y solo 10% de la radioactividad de los bulbos olfatorios. La presencia de la molécula marcada en regiones del cerebelo indica el paso de BBB; por otro lado, la detección de la molécula a nivel de regiones no relacionadas con la vía olfativa (cerebelo) indica que la vía olfativa no solo participa en el paso de las moléculas al cerebro, sino que también lo hace de forma más general, mecanismo más rápido, quizás la difusión a través del moco y la permeación posterior a través de discontinuidades existentes particularmente en regiones del epitelio olfatorio en el área de la mácula cribosa, que permite la llegada de eritropoyetina humana recombinante con bajo contenido de ácido siálico a regiones alejadas de la vía olfativa. La figura 11 representa el paso de eritropoyetina humana recombinante con bajo contenido de ácido siálico desde la cavidad nasal hasta el bulbo olfatorio y el cerebelo. Cada barra en la figura representa el valor promedio de seis animales. La figura muestra cómo la eritropoyetina humana recombinante con bajo contenido de ácido siálico alcanza regiones del cerebro en al menos 5 minutos y disminuye con el tiempo de forma gradual desde la región frontal a la región caudal del cerebro. A los 60 minutos de la aplicación, todavía hay algo de rhEPO en las regiones del bulbo olfatorio y el cerebelo. Entre 80 y 85% de la rhEPO que llega al cerebro se detectó en los bulbos olfatorios, mientras que casi el 20% se detectó en el cerebelo a los 5 minutos de la aplicación. Después de unos 30 minutos, estas concentraciones eran casi iguales, y después de 60 minutos, el cerebelo tenía un 30% y solo el 10% de la radioactividad de los bulbos olfatorios.

20 Ejemplo 21:

Efecto de la rhEPO básica sobre la hemorragia subaracnoidea en conejos.

25 La prueba se llevó a cabo en conejos machos de Nueva Zelanda que pesaban entre 3 y 4 kg, que se anestesiaron con una inyección intramuscular de 40 mg/kg de ketamina. Más tarde, se extrajeron 5 ml de sangre de la arteria central de la oreja y se inyectaron por vía percutánea en la gran cisterna. Los animales fueron monitorizados durante 72 horas.

Los conejos se dividieron en 3 grupos experimentales con 8 animales cada uno:

30 Grupo I: Animales de control.

Grupo II: Animales lesionados.

35 Grupo III: Animales lesionados + rhEPO básico 20 µg (ejemplo 5).

La administración de rhEPO básica se llevó a cabo 5 minutos después de inducir la hemorragia subaracnoidea y se repitió cada 8 horas durante 72 horas.

40 Para la evaluación neurológica, se siguió el comportamiento motor-funcional de los animales según Grasso G. 2002 durante el período de prueba.

Los resultados se muestran en la Tabla I. Se observó un mejor comportamiento motor-funcional entre los animales control (sin lesión) y los animales tratados con rhEPO básica que entre los animales lesionados, no tratados.

Evaluación neurológica observada 72 horas después de la hemorragia inducida.				
Grupos	Escala de evaluación neurológica			
	1	2	3	4
Animales de Control	8	0	0	0
Animales lesionados *	0	0	2	6
Animales lesionados + rhEPO básica	6	2	0	0

El grado de lesión neurológica se clasificó como:

1: Sin indicación de lesión.

2: Lesión mínima.

3: Lesión moderada sin movimientos anormales.

4: Lesión grave con presencia de movimientos anormales.

* Hubo una diferencia significativa entre los animales lesionados y tratados con rhEPO básica y los lesionados por p <0.05.

Ejemplo 22:

Efecto de rhEPO básico para el tratamiento de la demencia

En 36 jerbos mongoles se ató la carótida derecha bajo anestesia. Los animales recibieron administración intranasal de 40 UI de rhEPO (ejemplos 10 y 11) diariamente durante 7 días, comenzando dentro del espacio de tiempo de 1 hora posterior a la cirugía. Otros 24 animales sometidos a un procesamiento similar recibieron una cantidad equivalente de vehículo. Nueve jerbos sometidos al aislamiento de la carótida sin ligadura constituyeron el grupo de control.

Ocho días después de la operación, 27 y 13 animales habían sobrevivido entre los grupos sometidos a isquemia unilateral y tratados con rhEPO y los tratados solo con vehículo, respectivamente. No hubo mortalidad para el grupo de control.

Los animales fueron sometidos a una prueba de habituación un día antes y una semana después de la ligadura unilateral de la carótida. Esta prueba se basa en el recuento de acciones de cría en una caja cilíndrica durante un intervalo de 9 minutos dividido en tres tercios. Las proporciones de las acciones de cría en cada tercio determinan una línea recta de mejor ajuste entre los tres puntos. La pendiente se utilizó para establecer comparaciones entre grupos mediante la prueba U de Mann y Whitney. Las comparaciones antes-después se llevaron a cabo por medio de la prueba de comparación de rango de Wilcoxon de los animales supervivientes. Los resultados fueron los siguientes:

Grupo	Antes	Después	Valor de p
Controles	-14.2	-12.3	0.2
Vehículo	-16.6	-7.9 ^{a, b}	0.01
rhEPO	-15.3	-14.0	0.1

a – Diferente del control; b – Diferente de rhEPO; p < 0.05.

Los resultados muestran una menor pendiente (más cercana a 0) para los animales sometidos a isquemia, una semana después de la isquemia y en comparación con los tratados con rhEPO y los controles. Una pendiente más pequeña demuestra la persistencia del animal en explorar su entorno en los últimos dos tercios del rango de 9 minutos, mostrando una pérdida de la habituación que puede caracterizarse como una disfunción cognitiva inducida por la isquemia. El tratamiento con rhEPO básico previene la aparición de esta disfunción.

El comportamiento de los animales reveló un deterioro cerebral, inducido por la isquemia, que podría expresarse como una pérdida de la capacidad de anidación, que es típica en los machos de esta especie; también como un incremento de agresividad y pérdida del comportamiento de autocuidado durante el tiempo que permanecieron en el cilindro circular. Los resultados se compararon mediante la prueba de independencia chi-cuadrado y se expresan en la tabla por porcentaje:

Grupo	Anidamiento	Agresividad	Autoacicalamiento
Control	88	11	88
Vehículo	23 ^{a, b}	92 ^{a, b}	30 ^a
rhEPO	77	44 ^a	66

a - Diferente de control; b – Diferente de rhEPO; p < 0.05

5 Los animales se sacrificaron por perfusión bajo anestesia con tampón de formalina neutra al 10%. Los cerebros se extrajeron y procesaron para obtener secciones coronales de 8 µm de grosor coloreadas con hematoxilina y eosina. Las secciones se examinaron en un microscopio de campo claro para signos histopatológicos. Las comparaciones se llevaron a cabo mediante la prueba de independencia chi-cuadrado. Los resultados en la tabla se expresan en porcentaje:

Grupo	Picnosis	Gliosis	Edema	Pérdida Neuronal
Control	22	0	0	0
Vehículo	100 ^a	92 a, b	23 a, b	69 a, b
rhEPO Básico	55	44 ^a	0	33 ^a

a – Diferente de control; b – Diferente de rhEPO; p < 0.05.

10 Es notable que el tratamiento previene totalmente el edema y reduce a la mitad la incidencia de picnosis, gliosis y pérdida neuronal.

15 El deterioro del comportamiento puede calificarse como un reflejo de la pérdida neuronal y de otros hallazgos histopatológicos observados en el grupo no tratado. El tratamiento con rhEPO evitó el deterioro del comportamiento inducido por la disminución del flujo sanguíneo cerebral en el jerbo de Mongolia, al menos parcialmente. Los resultados son excelentes en el sentido de sugerir una acción protectora de neuronas de rhEPO que es capaz de contrarrestar el deterioro funcional que consiste en la demencia de origen vascular en humanos.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Formulaci3n nasal que comprende eritropoyetina humana recombinante, en la que menos del 40% de la mol3cula de eritropoyetina est3 protegida con 3cido si3lico y la concentraci3n de la prote3na activa est3 en el rango de aproximadamente 0.5 y 2.0 mg/ml.
2. Formulaci3n nasal seg3n la reivindicaci3n 1 caracterizada por el hecho de que la forma terminada es gotas nasales.
- 10 3. Formulaciones nasales seg3n la reivindicaci3n 1, caracterizadas por el hecho de que la forma terminada es un aerosol nasal.
4. Formulaci3n nasal seg3n la reivindicaci3n 1, 2 o 3 caracterizada por el uso de pol3meros bioadhesivos tales como hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC), hidroxipropilcelulosa (HPC) y metilcelulosa (MC).
- 15 5. Formulaci3n nasal seg3n la reivindicaci3n 1, 2 3 caracterizada por el uso de conservantes antimicrobianos tales como cloruro de benzalconio, clorobutanol, metilparabeno y propilparabeno.
- 20 6. Formulaci3n nasal seg3n la reivindicaci3n 1, 2 3 caracterizada por el uso de estabilizantes de prote3nas tales como clorhidrato de L-tript3fano, L-leucina, L-arginina y/o clorhidrato de L-histidina y/o sus sales.
7. Formulaci3n nasal seg3n una cualquiera de las reivindicaciones 1-6 para uso en medicina.
- 25 8. Formulaci3n nasal para su uso seg3n la reivindicaci3n 7, en la que la formulaci3n es para uso en el tratamiento o prevenci3n de trastornos del sistema nervioso central tales como trastornos cerebrovasculares o neurodegenerativos, hipoxia del reci3n nacido, hipoxia de causa cardiovascular, demencia, p3rdida de memoria, disminuci3n de la capacidad mental y deterioro mental.
- 30 9. Eritropoyetina humana recombinante, en la que menos del 40% de la mol3cula de eritropoyetina est3 protegida con 3cido si3lico, para uso en el tratamiento de trastornos del sistema nervioso central tales como trastornos cerebrovasculares y neurodegenerativos; en la que dicho tratamiento implica la administraci3n intranasal de dicha eritropoyetina.

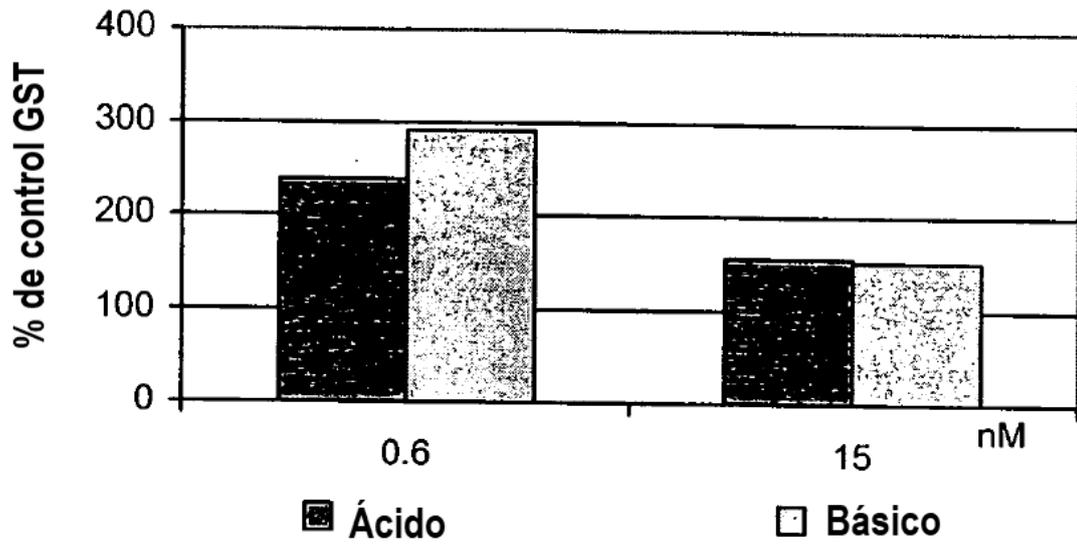


FIG. 1

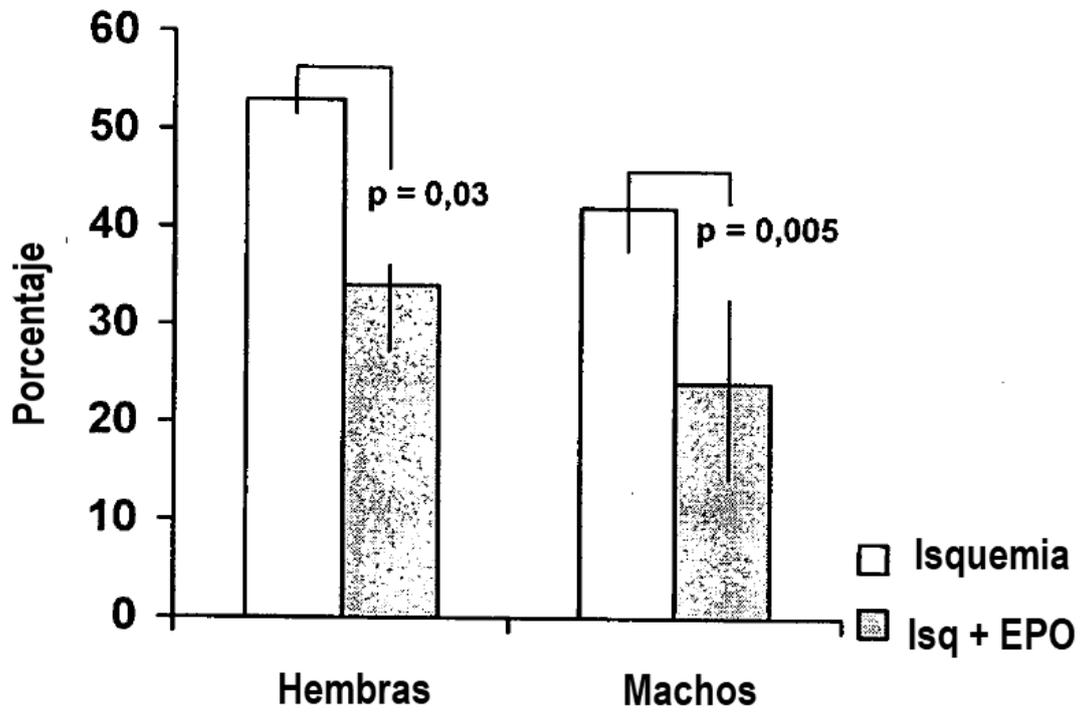


FIG. 2

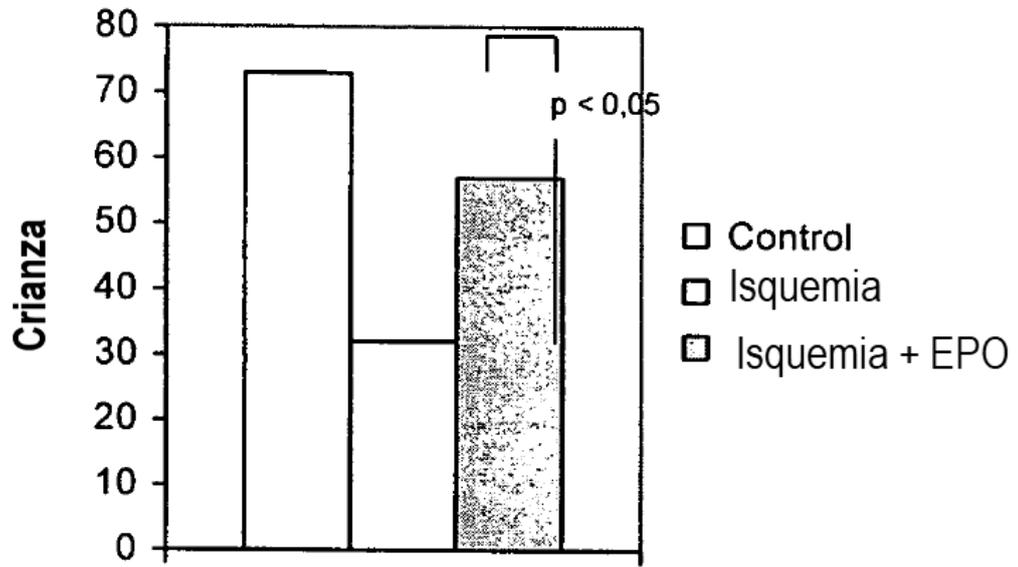


FIG. 3

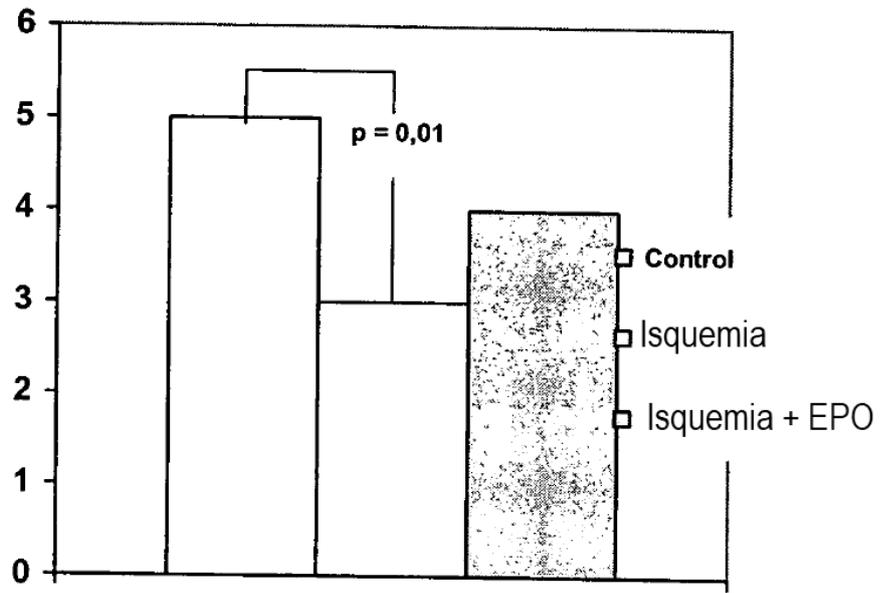


FIG. 4

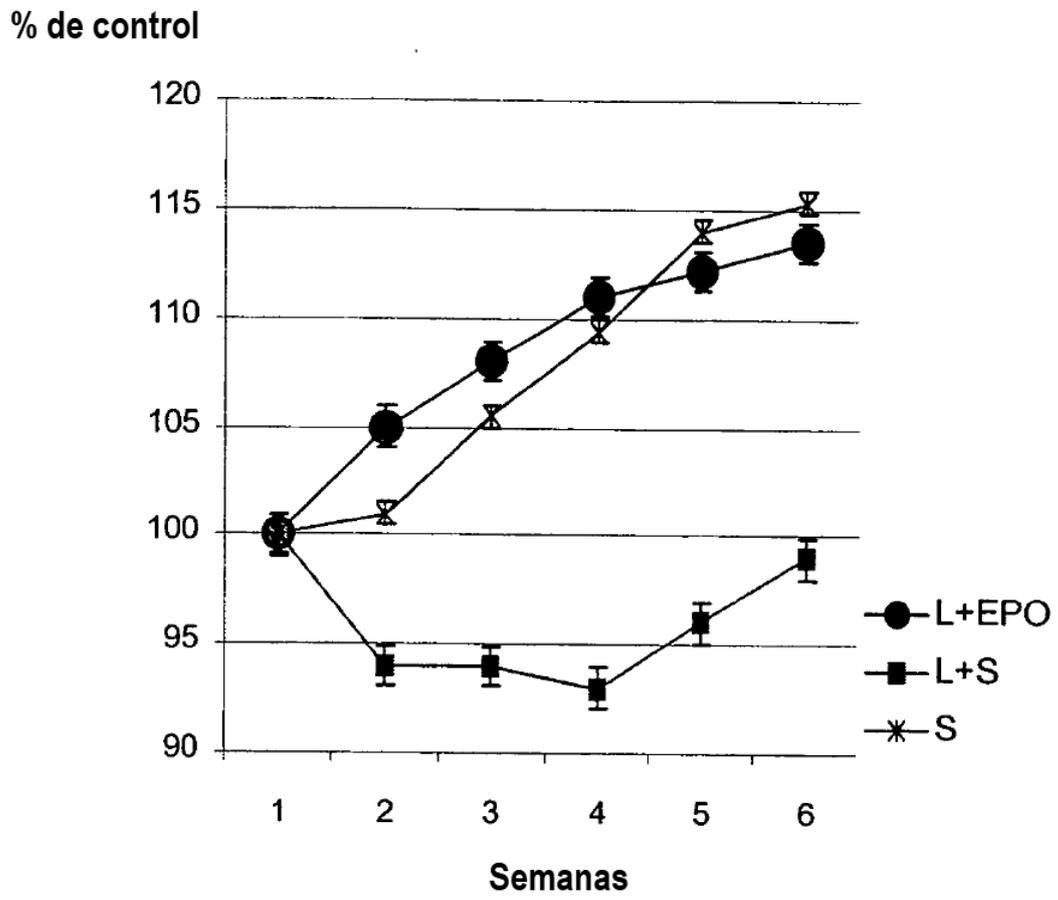


FIG. 5

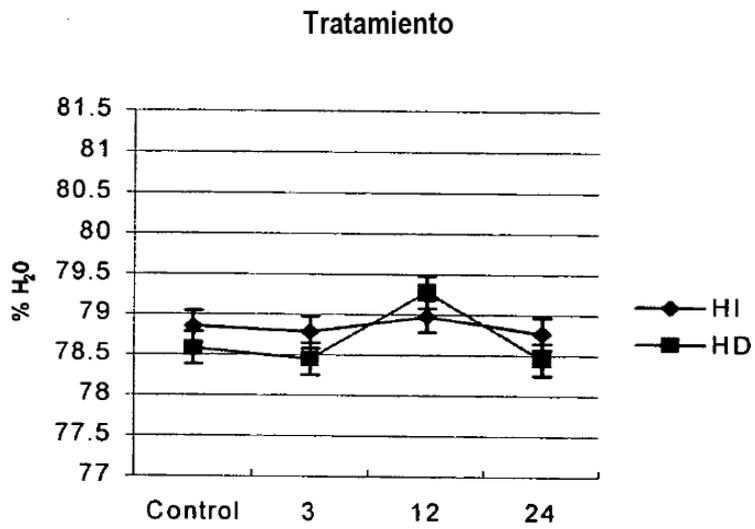


FIG. 6a

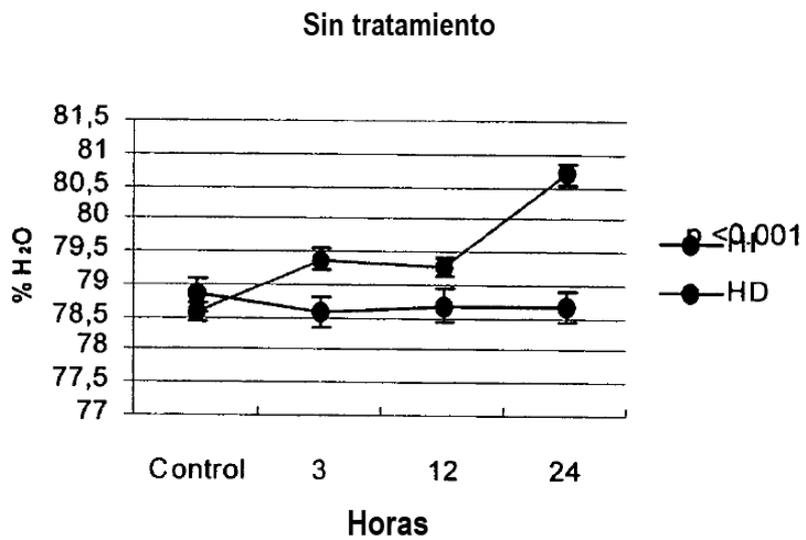


FIG. 6b

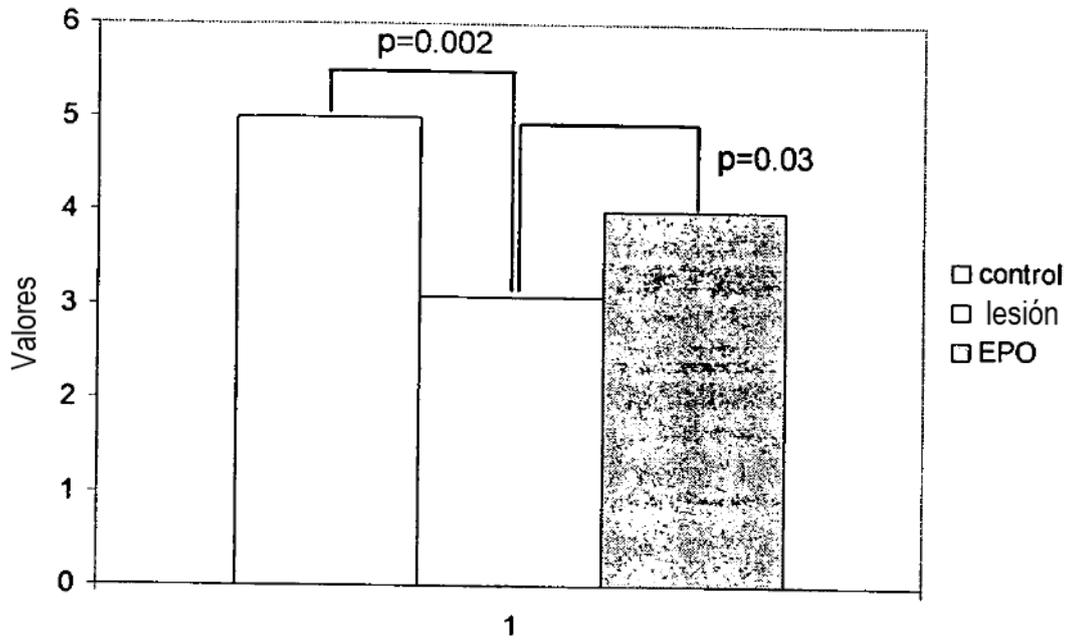


FIG. 7

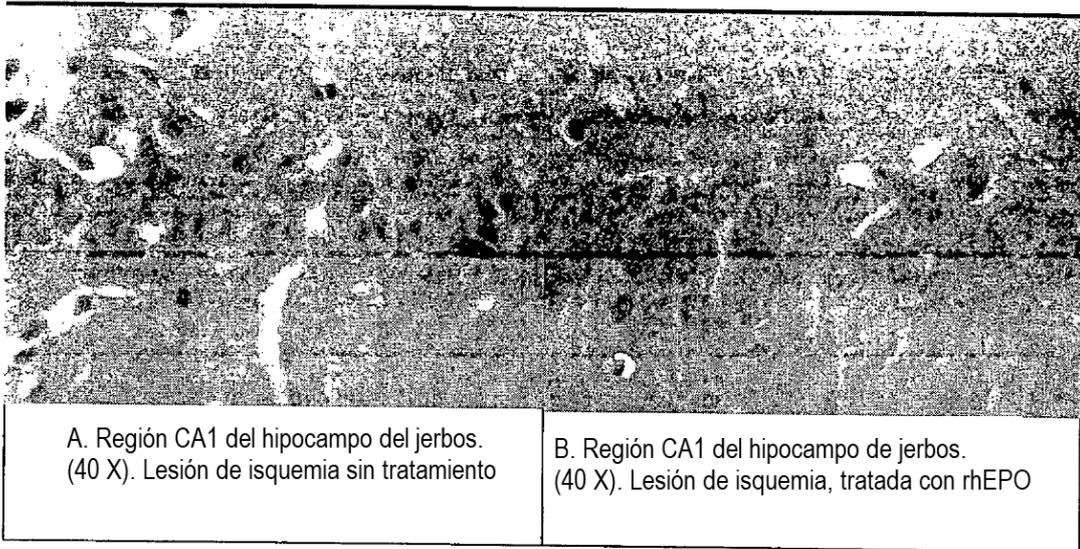


FIG. 8

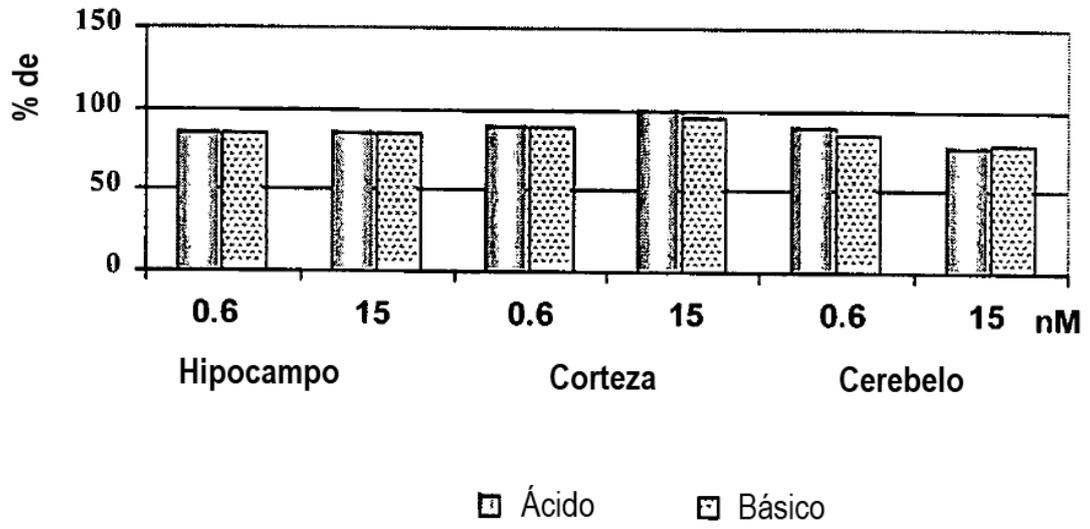
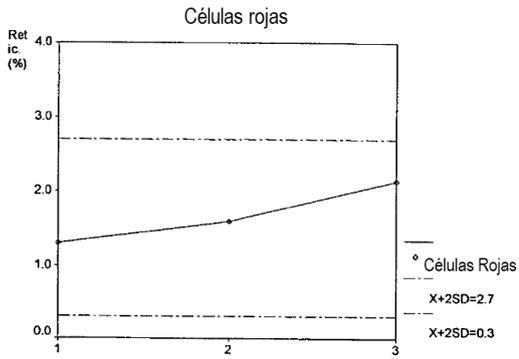


FIG. 9



Leyenda:

- X: Media
- SD: Desviación estándar
- 2 SD: Dos veces SD
- HB: Concentración de hemoglobina (g/dL)
- HTC: Hematocrito (%)
- ETO: Eritrocitos ($\times 10^6/\mu\text{L}$)
- PLT: Plaquetas ($\times 10^3 \mu\text{L}$)
- LEUC.: Leucocitos totales ($\times 10^3 \mu\text{L}$)
- VCM: Volumen corpuscular medio (fL)
- HCM: Hemoglobina corpuscular media (pg)
- CHCM: Concentración de hemoglobina corpuscular media (g/dL)

Fig. 10a

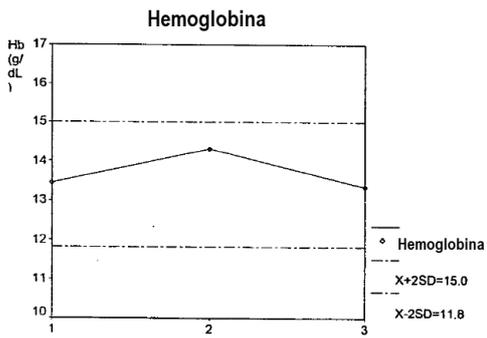


Fig. 10b

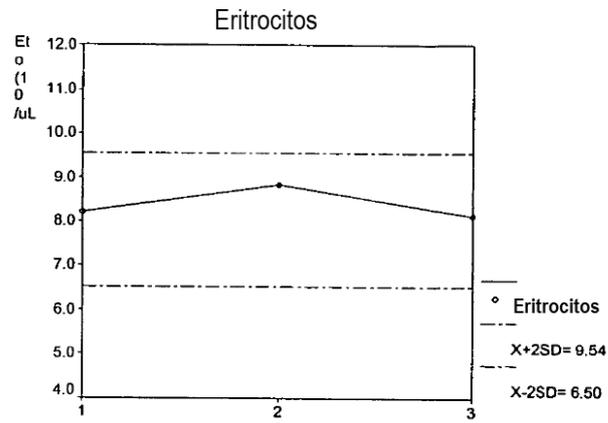


Fig. 10c

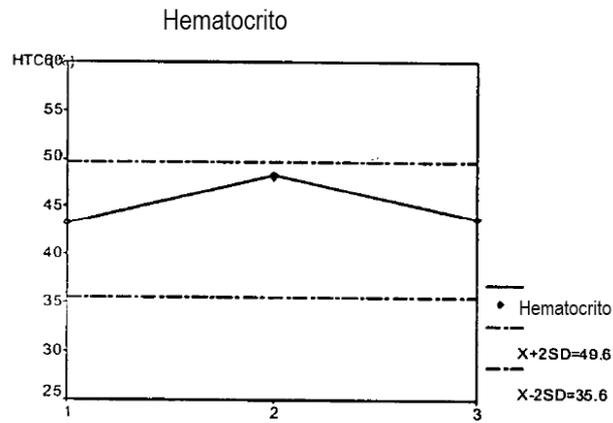


Fig. 10d

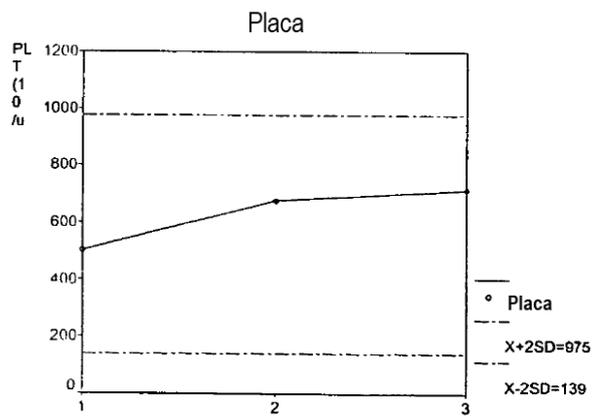


Fig. 10e

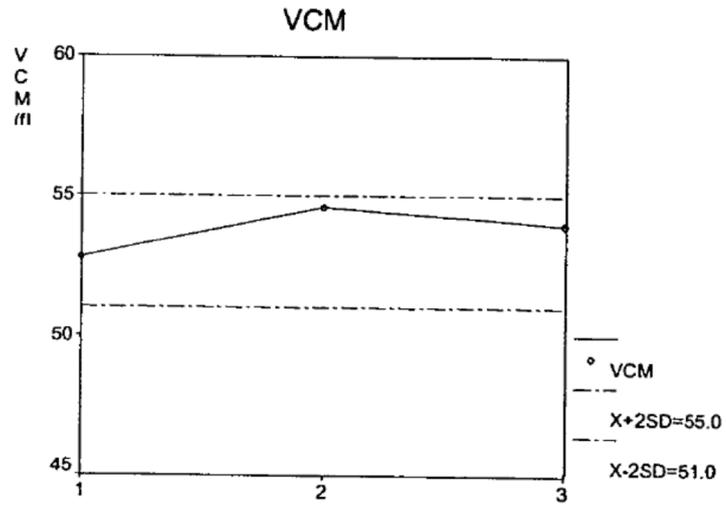


Fig. 10f

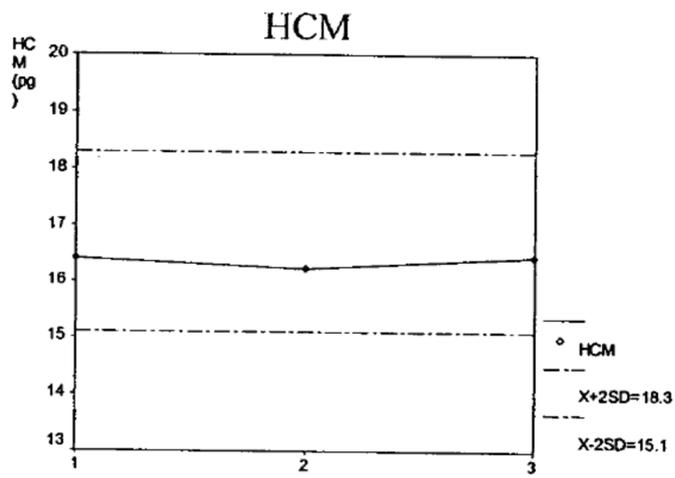


Fig. 10g

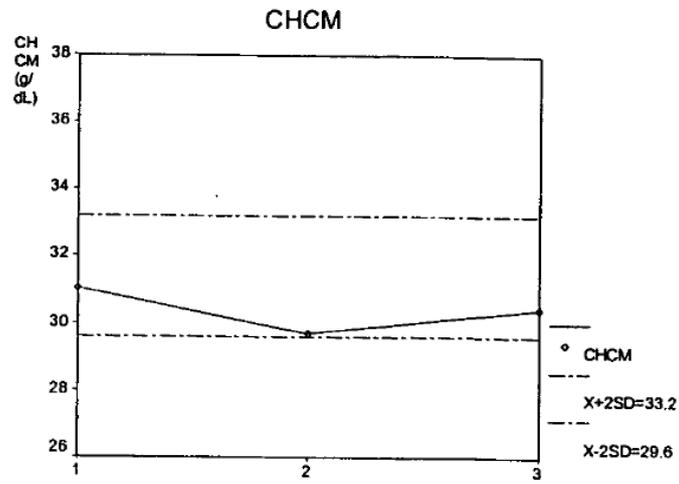


FIG. 10h

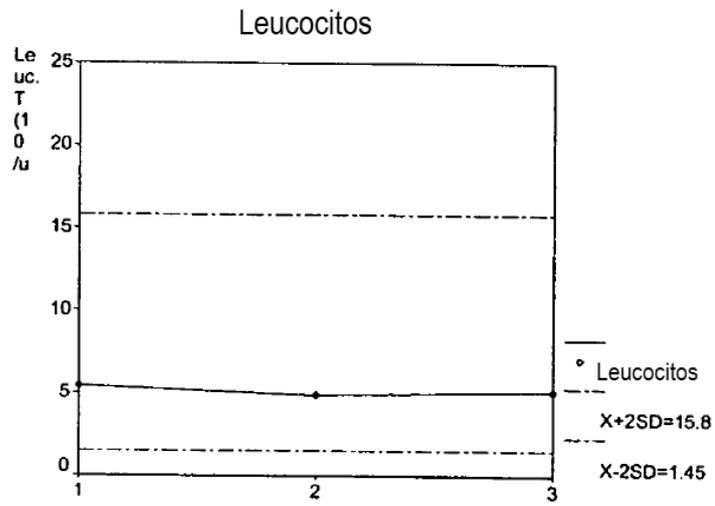


FIG. 10i

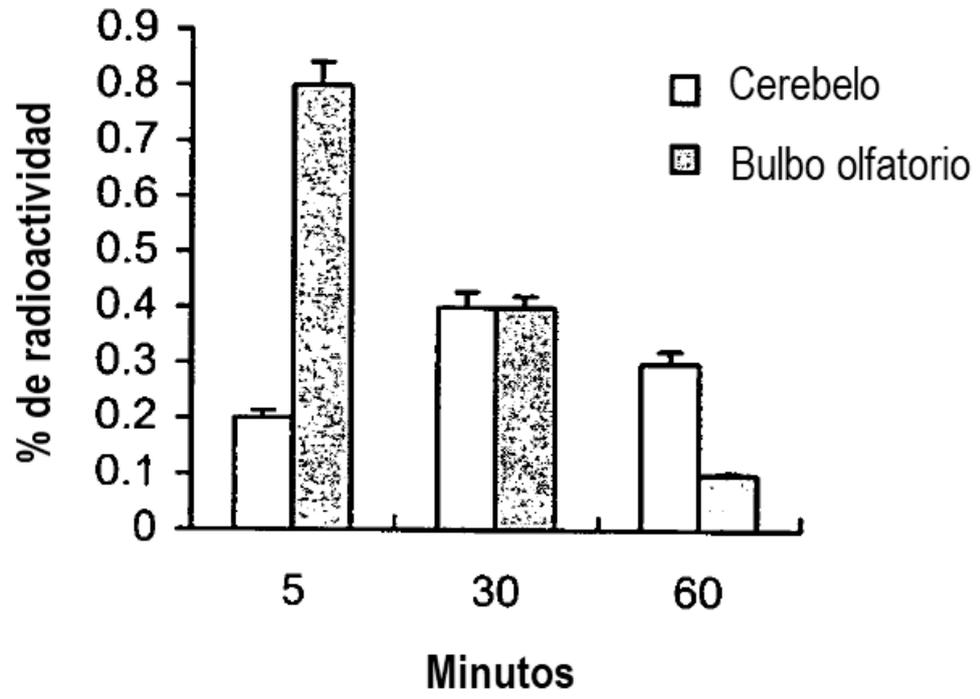


FIG. 11