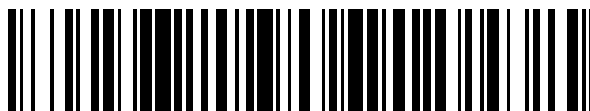


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 686 561**

51 Int. Cl.:

A61K 9/08 (2006.01)

A61K 31/436 (2006.01)

A61P 25/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.05.2013 PCT/IB2013/053792**

87 Fecha y número de publicación internacional: **14.11.2013 WO13168131**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.05.2013 E 13730352 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.06.2018 EP 2846770**

54 Título: **Administración intratecal de inhibidores de mTOR para la terapia de enfermedades neurodegenerativas, neuroinflamatorias y neurooncológicas**

30 Prioridad:

11.05.2012 IT MI20120814

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

18.10.2018

73 Titular/es:

**DOLCETTA, DIEGO (100.0%)
Contra' Motton San Lorenzo 11
36100 Vicenza, IT**

72 Inventor/es:

**CASSANO, TOMMASO;
GIOVAGNOLI, STEFANO;
MAGINI, ALESSANDRO y
EMILIANI, CARLA**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 686 561 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

Administración intratecal de inhibidores de mTOR para la terapia de enfermedades neurodegenerativas, neuroinflamatorias y neurooncológicas

5

Campo de la invención

La presente invención se refiere al uso de inhibidores de la enzima mTOR cinasa (diana en mamíferos de la rapamicina) en el tratamiento de la esclerosis tuberosa, la enfermedad de Alzheimer y la afasia progresiva primaria mediante administración intratecal, preferentemente intraventricular, de estos inhibidores. El inhibidor de mTOR utilizado en la presente invención es everolimus.

10

Antecedentes de la invención

El fundador de la familia de inhibidores de mTOR, rapamicina o sirolimus, se propuso inicialmente como un fármaco antibiótico y antifúngico de la familia de los macrólidos. Más tarde se descubrió que poseía propiedades inmunosupresoras potentes. Éstas se convirtieron en la principal aplicación del fármaco. mTOR tiene un papel clave en la adaptación de las funciones celulares a las condiciones ambientales. En presencia de sustratos energéticos, nutrientes y aminoácidos, se activa y promueve, por ejemplo, la síntesis de proteínas y la mitosis, mientras que se inhibe durante el ayuno, es decir, cuando estos faltan. Lo que se promueve en este caso es la autofagia, es decir, el proceso catabólico en el que el sustrato consiste en elementos que pertenecen a la propia célula (fuente de aminoácidos y energía). Los inhibidores de mTOR promueven, de este modo, el ahorro de energía. mTOR es la subunidad catalítica de 2 complejos moleculares: mTORC1 y mTORC2. mTORC1 integra las 4 señales que derivan de nutrientes, factores de crecimiento, energía y estrés, y, de los 2 es el más sensible a la rapamicina. mTORC2 es sensible indirectamente a la rapamicina. Esta cascada, altamente conservada desde el punto de vista evolutivo, tiene el fin de mantener el equilibrio energético y adaptar las funciones celulares al mismo.

15

20

25

La eficacia de los inhibidores de mTOR (diana en mamíferos de la rapamicina) se ha demostrado ampliamente en el tratamiento de numerosas patologías que implican al sistema nervioso central (SNC).

30

Esto es cierto para muchas enfermedades neurodegenerativas, neurooncológicas y neuroinflamatorias. Se han realizado o se están realizando una serie de estudios clínicos para evaluar los beneficios de los inhibidores de mTOR en el tratamiento de la esclerosis tuberosa (ET), un síndrome tumoral genético. Desde 2006 (Franz DN et al., *Ann. Neurol.*) se ha sabido que los inhibidores de mTOR son eficaces en la inducción de la regresión de los astrocitomas típicos de esta afección (Astrocitomas Subependimarios de Células Gigantes, ASCG). En 2008, Ehninger et al. (*Nat Med* 2008) descubrieron una reversión del déficit de aprendizaje en un modelo de ratón de ET después de la administración de inhibidores de mTOR, a pesar de que el tratamiento se inició después de que se detuviera el desarrollo. La ET se asocia a alteraciones profundas en la citoarquitectura cerebral y esto se considera la causa de manifestaciones epilépticas (con frecuencia no tratables) y trastornos cognitivos y de conducta graves, frecuentes en niños con ET, que habitualmente se clasifican dentro del espectro autista.

35

40

Todo esto condujo a Ehninger y Silva (*Trends in Mol. Med.*, 2011) a plantear la hipótesis de un beneficio del tratamiento con un inhibidor de mTOR en trastornos del espectro autista.

45

Los ASCG, junto con las neoplasias renales (angiomiolipoma, quistes y carcinoma de células renales) son la causa más frecuente de muerte en la ET (Shepherd et al., *Mayo Clin. Proc.*, 1991). Por tanto, la administración de inhibidores de mTOR en pacientes con ET tiene un efecto beneficioso no solo en la inducción de la regresión de ASCG -mediante el aprovechamiento del efecto antimitótico- sino también -a través de diferentes mecanismos- en el aprendizaje, la memoria, las convulsiones y el comportamiento de los pacientes.

50

Los inhibidores de mTOR también se han usado en modelos animales de la enfermedad de Alzheimer (EA).

En enero de 2012, S. Oddo resumió (*Front. Biosci. (Schol Ed.)*) los resultados de los últimos años sobre los efectos de la administración de un inhibidor de mTOR (rapamicina, también conocida como sirolimus) a modelos de ratón de la enfermedad de Alzheimer.

55

En 2010, su grupo (Caccamo et al., *Biol Chem*) publicó el efecto de la administración oral de inhibidores de mTOR a un modelo de ratón de la enfermedad de Alzheimer (ratón 3xTg-EA); observaron una mejora en la acumulación tanto de neurofibrillas Tau como de amiloide beta en el cerebro (junto con la pérdida neuronal, características anatomopatológicas clave del Alzheimer), con una mejora en el aprendizaje y la memoria. El efecto parece deberse a la inducción de la autofagia mediada por el inhibidor de mTOR. El impulso hacia la autofagia induce la degradación intracelular de las acumulaciones patológicas de proteína en la enfermedad de Alzheimer. El vínculo entre esto y el efecto cognitivo beneficioso observado en la enfermedad de Alzheimer aún no se conoce por completo.

60

En otro artículo publicado por su grupo (Majumder et al., *PLoS One* 2011), el inhibidor de mTOR se propone como un tratamiento terapéutico eficaz si se administra al inicio de la progresión de la enfermedad.

65

Los inhibidores de mTOR también podrían usarse en el tratamiento de enfermedades neuroinflamatorias. El grupo de Roberto Furlan (Esposito M. et al., *J neuroimmunology* 2010) ha demostrado la eficacia del tratamiento con inhibidores de mTOR también en modelos animales de enfermedades neuroinflamatorias tales como la encefalitis alérgica experimental (EAE) y el modelo animal de la esclerosis múltiple (EM).

Uno de los modelos tratados, creado mediante la inmunización de ratones SJL con un péptido (aminoácidos 139-151), parte de la proteína proteolípídica de mielina (PPL), representa la enfermedad humana mejor que otros, ya que expresa una forma clínica caracterizada, como en los pacientes, por ataques y remisiones que se producen a intervalos cortos, con un empeoramiento gradual de la discapacidad. La administración de rapamicina antes de que la enfermedad se manifestara propiamente fue extremadamente eficaz, ya que inhibió sustancialmente su aparición y recaídas sucesivas. La administración después del primer ataque redujo la gravedad y el número de ataques posteriores. El ensayo también demostró que cuando el fármaco se suspendió, la enfermedad reanudó su curso, como en los sujetos sin tratar.

Una forma de demencia en la que el aspecto inflamatorio parece importante es la afasia progresiva primaria (APP). Inicialmente descrita por M. Mesulam a finales de la década de 1980, esta forma de demencia frontotemporal se ha asociado desde hace tiempo a un mecanismo patogénico autoinmunitario. Se ha observado con una alta incidencia en pacientes que se sometieron a vasectomía; con frecuencia se encuentran anticuerpos anti-esperma en pacientes masculinos. También se encuentran con frecuencia en pacientes del sexo femenino, por razones desconocidas.

Decker y Heilman (*Arch Neurol* 2008) han notificado beneficios significativos que se obtuvieron a través de la administración de esteroides en un caso de APP.

En una revisión de los resultados de las autopsias realizadas en 60 casos de demencia frontotemporal, publicada por Kertesz et al. (*Brain*, 2005), la mayoría de las necropsias de APP mostraron las características patológicas de la enfermedad de Alzheimer (EA), lo que sugiere que una degeneración similar a la EA representa con frecuencia la evolución natural de la APP.

Por tanto, con respecto tanto a la patogenia inflamatoria inicial (los inhibidores de mTOR son sobre todo inmunosupresores potentes) como a la evolución similar a la EA, la administración de un fármaco inmunosupresor potente como un inhibidor de mTOR parece representar una opción muy interesante. Obviamente no existen modelos animales de afasia progresiva.

Las condiciones clínicas descritas anteriormente son solo ejemplos de enfermedades en las que la eficacia de la administración de un inhibidor de mTOR se ha demostrado clínicamente (ET) o preclínicamente (EA y EM) o simplemente es probable (APP). Estas aplicaciones aparentemente pueden estar lejos del campo principal en el que se usan los inhibidores de mTOR: inmunología de trasplantes. La aplicación en la esclerosis múltiple permanece en este plano, pero la aplicación en la esclerosis tuberosa aprovecha el efecto antimitótico, mientras que en la enfermedad de Alzheimer aprovecha el aumento de la autofagia.

Las nuevas aplicaciones, por ejemplo, en el caso de la esclerosis tuberosa, han dado origen a grandes inversiones y ensayos clínicos. En todos los estudios realizados, la administración sistémica condujo a un equilibrio incierto en la relación riesgo-beneficio, sobre todo debido a la acción principal inmunosupresora del fármaco y los consecuentes efectos secundarios indeseables de tipo infeccioso. En el *N Eng J Med* en 2010, Krueger DA notificó los resultados de un estudio clínico de fase II que evaluaba el efecto de la administración sistémica de everolimus (inhibidor de mTOR) sobre la ET asociada a astrocitomas (ASCG). El estudio, realizado en 28 pacientes afectados por ET, alcanzó el criterio de valoración (reducción volumétrica en los ASCG), pero hubo muchas reacciones adversas, con un ASCG, pero hubo muchas reacciones adversas, con un grado de gravedad de 1-3, la mayoría de ellos de origen infeccioso.

El problema de los efectos secundarios relacionados con la administración sistémica de inhibidores de mTOR se siente mucho en la técnica y sobre todo por pacientes que tendrán que tomar fármacos sistémicos y tolerar los efectos secundarios asociados durante largos períodos, si no durante toda su vida. Es por esta razón que hay muchas publicaciones destinadas a apoyar la tolerabilidad del tratamiento a largo plazo (por ejemplo, Krueger DA, *Neurology* 2013).

Yalon et al. *Childs Nerv. Syst.* (2011) 27: 179-181 describe la administración oral de everolimus en el tratamiento del complejo de esclerosis tuberosa.

Sumario de la invención

La presente invención permite superar este problema proporcionando un método para administrar inhibidores de mTOR, en particular everolimus, que sirve para reducir los efectos secundarios que normalmente se producen con la administración sistémica.

Breve descripción de las figuras

La invención se describirá a continuación en detalle, también con referencia a las figuras adjuntas, en las que:

- 5 - La Figura 1 muestra: a) los niveles de p70S6K (Total), fosfo-p70S6K (pThr389) y actina en el cerebro, hígado y bazo de ratones de control (CTRL) y ratones tratados con Everolimus (Ever), determinados mediante análisis por inmunotransferencia; la figura muestra una transferencia Western que representa tres experimentos diferentes; b) análisis densitométrico de p70S6K, total y pThr389, normalizado frente a actina ($P < 0,01$ (ratones tratados con Ever frente a ratones de CTRL), usando un ensayo de t de Student de dos colas para muestras independientes);
- 10 - La Figura 2 muestra la actividad enzimática de mTOR en los ratones tratados con Everolimus (Ever). ($P < 0,01$ (ratones tratados con Ever frente a ratones de CTRL), usando un ensayo de t de Student de dos colas para muestras independientes);
- 15 - La Figura 3 muestra el peso corporal de ratones con EAE tratados y ratones de control;
- La Figura 4 muestra el curso clínico de ratones con EAE tratados con everolimus frente a los ratones de control;
- La Figura 5 muestra el rendimiento cognitivo de ratones 3xTg-EA de 6 meses de edad y ratones de control del mismo sexo y edad; los ratones de control aprenden a encontrar alimento en el espacio de aproximadamente 8 días, mientras que los ratones con EA tienen dificultades para aprender el camino apropiado dentro del límite de tiempo de 15 días.
- 20

Descripción detallada de la invención

25 La invención se refiere, por tanto, al uso de inhibidores de mTOR, en particular everolimus, para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas, enfermedades neuroinflamatorias y enfermedades neurooncológicas, en el que dichos inhibidores se administran por vía intratecal. Preferentemente, la administración intratecal tiene lugar dentro de los ventrículos laterales (administración intraventricular).

30 La administración intratecal de acuerdo con la invención puede ser pulsada, preferentemente a intervalos regulares, o también continua.

35 La administración intratecal tiene lugar preferentemente por medio de un dispositivo mecánico o electromecánico, más preferentemente por medio de una bomba de infusión electromecánica. La bomba puede consistir, por ejemplo, en dispositivos plásticos (denominados "puertos") o mecánicos (bombas de infusión). Conectado a la bomba hay un catéter, que se inserta en el espacio intratecal o alcanza el espacio ventricular. Las patologías que pueden tratarse mediante la administración intratecal de inhibidores de mTOR son la enfermedad de Alzheimer, la esclerosis tuberosa, la esclerosis múltiple y la afasia progresiva primaria. En particular, en el caso de la esclerosis tuberosa con inhibidores de mTOR, actualmente administrados por vía sistémica, sus manifestaciones neurológicas se tratan con el sistema propuesto.

40 Por tanto, de acuerdo con la invención, el inhibidor de mTOR everolimus se usa para tratar enfermedades neurodegenerativas, enfermedades neuroinflamatorias y enfermedades neurooncológicas mediante administración intratecal, preferentemente intraventricular.

45 Los inhibidores de mTOR preferentemente utilizables en la administración intratecal -preferentemente dentro de los ventrículos laterales- para el tratamiento de las patologías mencionadas anteriormente se seleccionan de entre: Everolimus, rapamicina (sirolimus), PF04691502, ridaforolimus y temsirolimus.

50 La administración intratecal de fármacos es una técnica que ya se aplica ampliamente en diversas afecciones patológicas y tiene la ventaja de limitar los efectos secundarios sistémicos. La administración intratecal (IT) de fármacos analgésicos o antiespásticos es una práctica clínica bien establecida que se ha realizado desde la década de 1980, cuando los dispositivos de infusión alcanzaron costes moderados y dimensiones reducidas y se volvieron suficientemente confiables. Hasta la fecha, solo unas pocas moléculas han sido aprobadas por la FDA para este método de administración. Entre ellas, mencionaremos:

- 55 - Baclofeno (antiespástico, molécula hidrófila)
- Morfina (analgésico, molécula hidrófila)
- Bupivacaína (analgésico y anestésico, molécula lipófila)
- Clonidina (antihipertensivo y analgésico, molécula lipófila)
- 60 - Ziconotida (analgésico, aprobado solo para IT, molécula hidrófila)

Aparte del baclofeno, un fármaco antiespasmódico, los otros se usan todos para anestesia y para el tratamiento del dolor. La ziconotida es el único fármaco permitido exclusivamente para la administración intratecal. Se conocen análogamente intentos de administrar rapamicina intratecal a partir de publicaciones: Geranton et al. *Neurobiology of Disease*, 2009 y Xu et al. *The Journal of Neuroscience*, 2011.

Estos dos documentos describen una administración intratecal, no intraventricular, de rapamicina en ratones, con el objetivo de comprender la patogenia del dolor neuropático.

5 No existe ninguna publicación conocida que aborde la posibilidad de una administración intratecal, y mucho menos una intraventricular, de inhibidores de mTOR, en particular everolimus, para el tratamiento de las patologías a las que se refiere la presente invención.

10 La administración intratecal de inhibidores de mTOR, en particular everolimus, se realiza por medio de un sistema que requiere un procedimiento quirúrgico simple y absolutamente bien establecido. El sistema de administración, preferentemente una bomba intratecal, puede mantenerse durante varios años, con un mínimo coste de mantenimiento y cuidado. La fiabilidad del dispositivo es totalmente satisfactoria, al igual que su peso y tamaño. El tanque del dispositivo puede contener una cantidad considerable de fármaco, por lo que el procedimiento de recarga puede realizarse a intervalos de tiempo razonablemente largos.

15 Los fármacos que se toleran mejor para la administración intratecal son hidrófilos. Una vez en el líquido cefalorraquídeo (LCR), difunden homogéneamente en el espacio intratecal, penetran en el parénquima y alcanzan las células diana. En parte, son interceptados por el sistema venoso intraparenquimatoso cerebral y, en parte, vuelven al LCR. Después, el LCR es capturado en el espacio subaracnoideo por las granulaciones aracnoideas de Pacchioni que sobresalen dentro de los senos venosos y liberan LCR al torrente sanguíneo.

20 Por tanto, el LCR y los solutos del mismo se diluyen en el nuevo volumen de distribución, siguiendo el catabolismo y la semivida habituales. Mientras esté en el LCR, la concentración del fármaco dependerá de su volumen de distribución, la velocidad de administración y la renovación del LCR; una vez en el torrente sanguíneo se vincula al nuevo volumen de distribución, y para la desintoxicación, los mecanismos catabólicos de los órganos filtrantes (los inhibidores mTOR son degradados principalmente por el hígado) y la semivida de la rapamicina de acuerdo con la FDA (<http://www.fda.gov/ohrms/dockets/ac/99/slides/3529sle/sld002.htm>) es de 62 horas.

30 Por otro lado, los fármacos lipófilos (como casi todos los inhibidores de mTOR) tienden a difundir en los tejidos circundantes y en el torrente sanguíneo (véase, por ejemplo, Castro y Eisenah, *Anesthesiology* 1989). Al mismo tiempo, un fármaco lipófilo puede alcanzar fácilmente el sitio diana en el sistema nervioso central (SNC) en las patologías afectadas, sobre todo si se administra por vía intraventricular. En este caso, una administración pulsátil o intermitente podría permitir que se obtenga el efecto farmacológico al tiempo que se limita el aumento de la concentración plasmática.

35 El líquido cefalorraquídeo (LCR) es producido principalmente por el plexo coroideo en el sistema ventricular. Fluye dentro de él -de forma pulsátil y en sincronía con los latidos cardíacos- desde los ventrículos laterales al cuarto, después sale del sistema ventricular a través de los agujeros de Luschka y Magendie y fluye principalmente en el espacio subaracnoideo para alcanzar las granulaciones aracnoideas de Pacchioni, que están situadas en la parte superior del cráneo y sobresalen dentro de los senos venosos; interceptan el LCR y lo transfieren a la sangre venosa del seno sagital.

También fluye a lo largo del espacio subaracnoideo alrededor de la médula espinal y, muy débilmente, en el conducto vertebral central.

45 El LCR puede considerarse un ultrafiltrado de plasma: en condiciones fisiológicas contiene iones, poca proteína y muy pocas células.

Su volumen varía entre 135 y 150 ml, pero se produce continuamente a una velocidad de 500 ml/día. Por tanto, se reemplaza completamente aproximadamente 3,5 veces al día.

50 Si se desea mantener la concentración de una molécula en el líquido cefalorraquídeo (aproximadamente 150 ml) y, por tanto, en el sistema nervioso central (aproximadamente 1400 ml), es necesario administrarla regularmente en el líquido cefalorraquídeo. Con el fin de mantener una concentración terapéutica de un fármaco en el LCR, la cantidad necesaria para alcanzar la concentración en 500 ml de LCR y el volumen de distribución del mismo (LCR y SNC) deben administrarse regularmente en el fluido durante 24 horas.

Cada día, se descarga la misma cantidad gradualmente en el torrente sanguíneo, donde difunde en un mayor volumen de distribución. Por tanto, la concentración sistémica de la molécula dependerá de su semivida y volumen de distribución.

60 Si el fármaco intratecal se distribuye homogéneamente en aproximadamente 1550 ml (SNC+LCR), en una concentración terapéutica, se transferirá la misma cantidad gradualmente al resto del cuerpo y, por tanto, se diluirá 30-60 veces, dependiendo de la masa corporal del sujeto.

65 Esta dosis diaria es muy diferente de la necesaria para alcanzar cualquier efecto farmacológico sistémico, por lo que también existe una menor probabilidad de provocar efectos secundarios.

La mayoría de los inhibidores de mTOR no son muy hidrosolubles. Su administración en un entorno acuoso puede requerir una formulación de microemulsión (por ejemplo, Bespinar et al., *J Ocul Pharmacol Ther* 2008) o encapsulación en nanopartículas de PLGA particulares (por ejemplo, Tosi et al., *J Neural Transm* 2011).

5 Las características químicas del fármaco elegido, en las formulaciones ya descritas por otros autores, pueden ser de manera que difundan rápidamente a través de un volumen de distribución mayor que el deseado. Esta difusión podría ralentizarse por administración intraventricular y/o pulsátil directa. El objetivo de obtener un efecto terapéutico local (SNC) se conseguiría, en cualquier caso, manteniendo al mismo tiempo una concentración sistémica absolutamente tolerable.

10 **MÉTODOS - PARTE GENERAL 1 CONFIGURACIÓN DEL ENSAYO FARMACOLÓGICO, ELECCIÓN DE LA DOSIFICACIÓN EXPERIMENTAL Y CIRUGÍA ANIMAL**

15 **Fármaco:** Con el fin de demostrar la eficacia del fármaco también en esta nueva formulación y método de administración, los inventores sometieron a ensayo el efecto del inhibidor de mTOR everolimus en ratones ([http://www.selleckchem.com/products/Everolimus\(RAD001\).html](http://www.selleckchem.com/products/Everolimus(RAD001).html)), en vista de su eficacia clínicamente demostrada y su semivida relativamente breve (28-32 h, en comparación con más del doble de ese tiempo para la rapamicina).

20 **Infusión intraventricular:** Con anestesia general obtenida con Ketamina/Xilazina, se implantaron por vía subcutánea bombas osmóticas Alzet (http://www.alzet.com/products/guide_to_use/pump_selection.html) en la espalda; un catéter que sale de la bomba alcanzó la bóveda craneal, donde se conectó a un conector (Kit de Cerebro 3, Alzet) implantado estereotáxicamente en el cráneo hasta alcanzar el ventrículo lateral. Estas bombas son capaces de infundir su contenido a una velocidad constante durante 1-4 semanas.

25 **Ensayo de everolimus a través de CL-EM**

Se realizó un análisis cuantitativo de everolimus en muestras de sangre y tejido con el método de dilución isotópica usando la técnica CL-EM. El sistema cromatográfico fue el siguiente: HPLC Agilent 1290 Infinity equipado con una bomba binaria y automuestreador HiP modelo G4226A. El volumen de inyección fue de 2 µl, la columna analítica utilizada fue una columna Phenomenex Kinetics PFP UHPLC (Phenomenex, Milán, Italia) 5,0 x 2,1 mm, 1,7 µm, 100 Å, temperatura controlada a 55 °C. Se realizó una elución en gradiente usando como disolvente A: agua con formiato de amonio 5 mM, disolvente B: metanol con ácido fórmico al 0,1 %. El perfil de elución fue el siguiente: disolvente A 30 %/disolvente B 70 % durante 3 minutos, disolvente A 1 %/disolvente B 99 % de 3 a 6 minutos, a un caudal de 0,25 ml/min. Esta configuración permitió un tiempo de elución de 2,5 minutos. Cada inyección estuvo precedida de un ciclo de lavado del sistema inyector con metanol.

La espectrometría de masas se realizó usando un detector de EM Q-TOF modelo G6540A (Agilent, Alemania) equipado con un sistema de IEN AJS Dual (interfaz de ionización por electronebulización). Los parámetros del instrumento fueron los siguientes: flujo de gas envolvente: 7,5 ml/min, temperatura del gas envolvente: 300 °C, flujo de gas: 6 l/min, temperatura del gas: 300 °C, presión del nebulizador: 35 psi (241,32 kPa), voltaje de pulverización iónica: 5500 V.

Tanto el everolimus como el patrón interno isotópico se detectaron como aductos de amonio en el modo de *ion positivo*.

45 **Preparación de la muestra y validación del método**

Extracción a partir de muestras de sangre completa

Se extrajo everolimus de sangre completa en 1 ml de una solución de metanol que contenía acetato de amonio al 10 % con el fin de permitir la precipitación de la mayor parte de la proteína sérica.

El patrón interno utilizado fue 4d-2C¹³-everolimus isotópico añadido a la solución de extracción a una concentración de 200 ng/ml.

55 Las muestras de sangre se secaron por congelación y posteriormente se extrajeron. El proceso de extracción se realizó en un baño de ultrasonidos durante aproximadamente 10 minutos para garantizar la hemólisis completa y la liberación del fármaco del material celular. Las muestras se centrifugaron (10 minutos, 4000 rpm, 10 °C) y, después, el sobrenadante se separó del sedimento.

60 Después, las soluciones obtenidas de este modo se purificaron por medio de cartuchos de extracción en fase sólida HybridSPE®-Fosfolípido con un volumen total de 1 ml (Sigma Aldrich, Milán) para eliminar el exceso de material lipídico potencialmente presente. El proceso se validó preliminarmente tanto para everolimus como para el patrón interno en solución y en matrices, proporcionando un rendimiento >98 % p/v.

65

Extracción a partir de muestras tisulares de (cerebro)

El proceso de extracción a partir de muestras de cerebro, dividido en los hemisferios derecho e izquierdo, fue similar al de la sangre completa. Las muestras tisulares se pesaron y posteriormente se secaron por congelación. Después del secado por congelación, las muestras se cortaron finamente para facilitar la extracción posterior. Después, se añadió 1 ml de la solución de metanol al 1 % v/v de formiato de amonio con 200 ng/ml de patrón interno. Después, las muestras se sometieron a 10 minutos de tratamiento con ultrasonidos y se agitaron con formación de vórtice para garantizar la extracción completa del fármaco. Después le siguió centrifugación (10 minutos, 4000 rpm, 10 °C) y el sobrenadante se separó del sedimento. Como se ha descrito anteriormente, las soluciones se purificaron por medio de cartuchos de extracción en fase sólida HybridSPE®-Fosfolípido con un volumen total de 1 ml (Sigma Aldrich, Milán) para eliminar el exceso de material lipídico. Después, las muestras se sometieron inmediatamente al análisis por CL-EM.

Validación

Tanto el método de extracción como el método analítico se validaron de la siguiente manera:

- a) Extracción: la extracción a partir de tejidos y sangre se validó mediante la determinación del rendimiento para everolimus y para el patrón interno en las mismas condiciones tanto en solución como en las matrices biológicas. Estos rendimientos se midieron mediante muestras contaminantes de animales no tratados con everolimus a una concentración de 100 ng/ml, mientras que el patrón interno se mantuvo a 200 ng/ml. Después, los procesos de extracción y purificación se simularon y la cantidad se midió y se comparó con la cantidad teórica.
- b) Análisis: el método analítico se sometió a ensayo para determinar el LDD y el LDC y la linealidad en la respuesta en presencia o ausencia de las matrices biológicas. Se realizó una calibración de ensayo en el intervalo de 1-200 ng/ml de everolimus para determinar si había alguna interferencia significativa de la matriz, manteniendo el patrón interno a la concentración de 200 ng/ml.

Bioquímica – Transferencia Western: Extracción de proteína y análisis por transferencia Western

Los tejidos de ratón congelados se homogeneizaron en solución de T-PER (Pierce) que contenía un cóctel de inhibidores de proteasa (Sigma-Aldrich) y un cóctel de inhibidores de fosfatasa (Sigma-Aldrich). Las muestras homogeneizadas se sometieron a ultrasonidos 3 veces durante 15 segundos (amplitud de 10 micrómetros) a 4 °C usando un aparato de ultrasonidos MSE soniprep 150 (Sanyo) y se centrifugaron posteriormente a 4 °C durante 30 minutos a 16000g. El sobrenadante se recuperó y las proteínas se cuantificaron mediante un ensayo de Bradford usando BSA como patrón.

Para el análisis por transferencia Western, las proteínas se separaron mediante EGPA-DSS en condiciones reductoras de acuerdo con el método de Laemmli. Posteriormente, las proteínas se transfirieron a una membrana de PVDF (Biorad), que se incubó con los siguientes anticuerpos primarios: anti-fosfo-p70S6K (T³⁸⁹), anti-fosfo-p70S6K (S³⁷¹), anti-p70S6K (Cell Signaling) y anti-actina (Sigma-Aldrich). Después de que se lavara con TBS-Tween (Tris 50 mM, pH 7,5, NaCl 150 mM y Tween 20 al 0,1 %), la membrana se incubó con uno de los siguientes anticuerpos secundarios: anti-IgG de conejo conjugado con HRP (GE Healthcare) y anti-IgG de ratón conjugado con HRP (GE Healthcare). La membrana se desarrolló por medio de ECL *prime* (GE Healthcare).

Actividad de mTOR

Se midió la actividad de mTOR usando el kit de actividad de mTOR K-LISA™ (Calbiochem®), siguiendo el protocolo del fabricante. El kit se basa en un ensayo de actividad ELISA que usa una proteína de fusión, GST-p70S6K, como sustrato de mTOR específico. El sustrato de mTOR se une primero a un soporte sólido y la muestra que contiene mTOR se incuba con ATP en los pocillos de una placa de 96 pocillos recubierta con glutatión. El mTOR activo presente en la muestra fosforila la proteína p70S6K unida a la placa en Thr³⁸⁹. El sustrato fosforilado se detecta usando un anticuerpo primario anti-p70S6K-T³⁸⁹, seguido de la detección con un anticuerpo secundario conjugado con HRP y la adición del sustrato TMB. La actividad asociada se determina mediante la lectura de la absorbancia a longitudes de onda de 450 y 595 nm.

RESULTADOS DE LA PARTE 1 – GENERAL

Búsqueda de la dosificación apropiada mediante espectrometría de masas.

Se verificó la concentración en cerebro de everolimus obtenida mediante administración intraparenquimatosa durante una semana a 3 dosificaciones diferentes. Se eligieron basándose en las dosis más altas publicadas en ensayos con animales (A = 2,5 mg/kg), las utilizadas más habitualmente en ratones (B = 1,25 mg/kg) y las suficientes teóricamente (C = 0,6125 mg/kg).

Como se muestra en la Tabla 1, los inventores obtuvieron diferentes concentraciones en cerebro:

- Concentración en cerebro 1: 11,5 mg/kg
- Concentración en cerebro 2: 25 mg/kg
- Concentración en cerebro 3: 41,7 mg/kg

5

Tabla 1 - Concentraciones en sangre y cerebro en 3 grupos de ratones tratados por vía intraperitoneal durante una semana con dosis graduadas de Ev.

Ratones CD1	Sangre (ng/ml) (n = 2)					
	0,6125 mg/kg		1,25 mg/kg		2,5 mg/kg	
Machos	16±4		42±4		59±3	
Hembras	15±3		25±5		46±4	
	Cerebro (ng/0,25 g)* (n = 2)					
	0,6125 mg/kg		1,25 mg/kg		2,5 mg/kg	
	Hemisferio dx	Hemisferio sx	Hemisferio dx	Hemisferio sx	Hemisferio dx	Hemisferio sx
Machos	14±3	9±2	37±5	25±8	52±6	44±9
Hembras	11±3	12±4	18±6	20±4	33±6	38±10

* el valor está normalizado al peso de un hemisferio (0,25 g)

10 En cualquier caso, el fármaco no alcanzó niveles medibles en la sangre. Todas las dosis parecían ser muy bien toleradas basándose en una evaluación del peso corporal, la motilidad espontánea, la postura y el pelaje.

Después, los inventores decidieron buscar la dosis máxima tolerable mediante la administración intraventricular de everolimus a concentraciones 10 veces mayores que las mostradas en la Tabla 1: A = 25 mg/kg, B = 12,5 mg/kg, C = 6,125 mg/kg.

15

Después de 3 días de tratamiento, los ratones tratados con la dosis A demostraron una reducción en la motilidad espontánea y una reducción de peso muy ligera (ninguna en postura o pelaje). Por tanto, esa dosis se descartó y los ratones se sacrificaron. Las otras 2 dosis parecieron ser bien toleradas. Para la evaluación posterior de la eficacia terapéutica en los diferentes modelos animales, se seleccionó la dosis B (12,5 mg/kg).

20

La Tabla 2 muestra las concentraciones en cerebro y en sangre encontradas. Aunque no pudieron cuantificarse, se ha observado en la tabla la presencia de metabolitos derivados de la transformación del fármaco.

25

Tabla 2: Concentraciones en sangre y en cerebro detectadas después de una semana de administración intracerebral a 3 concentraciones diferentes.

	Muestra	Conc / 250 mg de cerebro	Campo del cerebro	Metabolitos	Duración del tratamiento Conc ng/g
A	Sangre	<1	T8 dx	Sin metabolitos	Tratado 3 días 20,4 ng/g
			T8 sx	Metabolito -42	
	Hemisferio derecho	5,3±2,8	T9 dx	Metabolitos -42, -26, +16	
			T9 sx	Sin metabolitos	
	Hemisferio izquierdo	4,9±2,3	T10 dx	Metabolito -42	
			T10 sx	Metabolito -42	
B	Sangre	<1	T4-dx	Metabolitos -42, -10	Tratado 14 días 12-16 ng/g
			T4- sx	Metabolito -26	
	Hemisferio derecho	3,1±1,6	T5-dx	Sin metabolitos	
			T5- sx	Metabolitos -42, -10	
	Hemisferio izquierdo	2,9±0,8	T6 dx	Metabolito-42	
			T6 sx	Sin metabolitos	
C	Sangre	<1	T2- dx	Sin metabolitos	Tratado 14 días 11,8 ng/g
			T2- sx	Sin metabolitos	
	Hemisferio derecho	3,4±0,7	T1- dx	Sin metabolitos	
			T1- sx	Sin metabolitos	
	Hemisferio izquierdo	2,5±0,2	T3-dx	Metabolito-42	
			T3- sx	Metabolito-42	

Verificación de la inhibición de mTOR. Los inventores analizaron la inhibición real de mTOR por TW. mTOR es una cinasa con múltiples sustratos, uno de los cuales es la p70-S6 cinasa. La fosforilación de esta última se considera unánimemente como una medida de la actividad de mTOR. A la dosis seleccionada, la concentración en cerebro alcanzada realmente inhibió el complejo enzimático, como se demuestra en la figura 1: como era de esperar, la p70-S6 cinasa -normalmente muy fosforilada en el cerebro- está en una forma menos fosforilada que en los controles. En paralelo, la p70-S6 cinasa normalmente se fosforila en el bazo y el hígado.

Los ensayos en sangre de everolimus con CL-EM revelaron una concentración en sangre en el intervalo terapéutico en ratones tratados con administración intraperitoneal, mientras que solo fue detectable en trazas (<1 mg/kg) en la sangre de ratones que habían recibido tratamiento intratecal con everolimus. Esto corresponde a una inhibición local, pero no sistémica, de mTOR, como se demuestra por TW, que determina el estado de fosforilación de la p70-S6 cinasa, proporcional a la actividad de mTOR. Esto hace que cualquier efecto farmacológico extracerebral del inhibidor de mTOR sea absolutamente improbable.

PARTE 2 - ESPECIAL: VERIFICACIÓN DE EFICACIA EN MODELOS DE RATÓN

Los inventores realizaron ensayos en modelos de ratón que ejemplifican 3 familias de enfermedades neurológicas:

- EAE (Encefalomiелitis Autoinmunitaria Experimental, modelo de enfermedad neuroinflamatoria): se inmunizaron ratones SJL/j con dos inyecciones subcutáneas, realizadas con 7 días de separación, de proteína proteolípídica (PLP₁₃₉₋₁₅₁), adyuvante de Freund y Mycobacterium tuberculosis inactivado. La gravedad de la enfermedad se calificó con una puntuación clínica: 0 = saludable; 1 = debilidad de la cola; 2 = ataxia y/o paresia de la extremidad posterior; 3 = parálisis de la extremidad posterior y/o paresia de la extremidad anterior; 4 = tetraplejia; 5 = estado de agonía o muerte
- EA (Enfermedad de Alzheimer, modelo de enfermedad neurodegenerativa): ratón transgénico triple con EA (3xTg-EA) suministrado por Jackson Laboratories (<http://jaxmice.jax.org/strain/004807.html>). Su memoria se evaluó usando los ensayos de Evitación Pasiva y Laberinto Radial;
- CET (Complejo de Esclerosis Tuberosa, modelo de enfermedad neurooncológica): ratón TSC1 con gen TSC1 dentro de un casete flox, suministrado por Jackson Laboratories (<http://jaxmice.jax.org/strain/004807.html>)

EAE

Se inmunizaron 30 ratones SJL/j y comenzaron a desarrollar la enfermedad después de 11 días. A medida que desarrollaron el déficit neurológico y alcanzaron una puntuación de 1, fueron operados y se les colocó una bomba Alzet 1004 que contenía everolimus o un vehículo. El propósito de esto era representar la situación clínica habitual en la que el paciente acude al médico con motivo del primer ataque. En términos generales, se hace un diagnóstico y se aplica una terapia con dosis altas de esteroides, con una buena regresión de los síntomas, pero en la mayoría de los casos se producirán otros ataques e irán seguidos de una regresión cada vez menos satisfactoria, con un aumento gradual en la discapacidad residual.

En el conjunto experimental, el peso y la puntuación clínica de los ratones afectados se controlaron a diario.

Los inventores pudieron observar una reducción de la gravedad del primer ataque, al que le siguieron otros 2 ataques de una gravedad que no fue mucho más leve que en los controles. Sin embargo, mientras los controles continuaron manifestando ataques recurrentes con una discapacidad residual cada vez mayor, después del tercer ataque los ratones tratados ya no manifestaron ataques y recuperaron completamente sus habilidades motoras (puntuación 0) y su peso corporal.

La Figura 3 muestra la tendencia en el peso corporal de los ratones SJL. Inicialmente, el peso disminuyó a medida que la enfermedad progresaba, pero después tendió a recuperarse después de los primeros ataques, más violentos. Además, la operación del implante en sí misma provoca una reducción de peso durante varios días.

La Figura 4 muestra la tendencia en la puntuación clínica. Después del tercer ataque, los ratones tratados con fármaco no manifestaron ningún otro ataque, mientras que los ratones tratados con vehículo continuaron teniéndolos. Al final de la 4ª semana, los ratones se sacrificaron y se realizaron análisis bioquímicos e inmunopatológicos.

Esto demuestra que la administración intratecal de Everolimus tiene un efecto inmunosupresor local potente. Aunque es cierto que el método implica un cierto grado de invasividad y no es en absoluto un remedio etiológico, la eficacia clínica es totalmente comparable a la de la administración sistémica, sin efectos inmunosupresores sistémicos, lo que hace que el método sea una opción terapéutica de interés clínico fundamental.

EA (enfermedad de Alzheimer)

El modelo de ratón seleccionado se considera uno de los que mejor representa la afección humana. A partir de los 6 meses de edad, de hecho, manifiesta una acumulación progresiva de amiloide beta intracelular y extracelular, ovillos

neurofibrilares y pérdida neuronal, como en el hombre. Estas características neuropatológicas se asocian a un deterioro cognitivo progresivo, observable sobre todo con un deterioro paralelo del rendimiento cognitivo.

5 La alteración de la memoria, análogamente un síntoma clave de la EA, se mide mediante diversos ensayos. Entre ellos, los universalmente aceptados, que los propios inventores utilizaron, son los ensayos de Evitación Pasiva, Laberinto Radial y Laberinto de Agua.

10 Evasión Pasiva: el aparato de evasión pasiva consiste en dos compartimentos separados por una puerta corredera. El compartimento más pequeño está iluminado, el más grande se mantiene oscuro y las descargas eléctricas pueden aplicarse desde el suelo (2 x 0,4 mA, 50 Hz, 2 s en un intervalo de 5 s). El día de entrenamiento, cada ratón se colocó en el compartimento iluminado, lejos del compartimento oscuro. La puerta corredera se abrió cuando el ratón se dio la vuelta y se le aplicaron descargas en las patas cuando el mouse entró en el compartimento oscuro con las cuatro patas. Se sometió a ensayo la memorización 24 horas después y se registró la latencia para cruzar (límite de tiempo de 180 s).

15 Laberinto Radial: se redujo el peso de los ratones y el peso corporal se mantuvo en un 85 % del peso normal alimentándolos con cantidades de alimento previamente medidas. El laberinto tenía 8 brazos idénticos de 37 centímetros de longitud que se ramificaban desde una plataforma de 7 x 8 cm. Los animales se sometieron a un ensayo por día y su entrenamiento terminó cuando aprendieron las elecciones correctas (hasta un máximo de 15 opciones) o hubieron transcurrido 15 minutos. Una elección se definió como la posición de las 4 patas en un brazo del laberinto.

20 La Figura 5 muestra el rendimiento de ratones con EA frente a controles sanos a los 6 meses cuando se sometieron al ensayo de Laberinto Radial. En un proceso de entrenamiento que implica sesiones diarias, este ensayo mide el número de errores en el reconocimiento de un camino fijado.

Mientras que los ratones sanos mostraron solo unos pocos errores ocasionales después de 8 días, este resultado se alcanzó mediante el modelo de EA después de 15 días.

30 Los inventores aplicaron catéteres intraventriculares y bombas osmóticas secretoras de everolimus implantadas por vía subcutánea en la espalda de 12 ratones con EA durante 4 semanas. Los inventores infundieron un vehículo a un número igual de ratones. Los inventores inyectaron everolimus en 10 ratones sanos y, por último, el vehículo en otros 10. La bomba apropiada se reemplazó después de 4 semanas y se mantuvo en su lugar durante otras 4. Después se sometieron a ensayo los rendimientos cognitivos.

35 Mientras que en los ratones con EAE la aplicación local de Ev mostró una actividad inmunosupresora local eficaz, en este caso, con la misma dosificación, se observó una actividad farmacológica relativamente novedosa del inhibidor de mTOR, una que no se tuvo en cuenta hasta hace unos pocos años: un aumento en la autofagia.

40 Esto se analizó minuciosamente por el grupo de S. Oddo (por ejemplo, Caccamo JBC 2010). A los inventores les gustaría señalar en este caso que incluso aunque la EA tenga una implicación sistémica, ciertamente nunca se ha demostrado que tuviera relevancia clínica. Sin embargo, una terapia con un inhibidor de mTOR tendría efectos secundarios colaterales al efecto inmunosupresor (véase, por ejemplo, Krueger DA, *NEJM* 2010), que un sujeto anciano encontraría difícil de tolerar.

45 Aunque es invasivo y no etiológico, el método propuesto en el presente documento muestra tal eficacia frente a riesgos tan limitados que los inventores creen que la relación coste/beneficio pesa decididamente a favor del denominador.

50 ET (Esclerosis Tuberosa)

No hay modelos animales disponibles que reproduzcan las principales características neurológicas del CET humano, los astrocitomas subependimarios de células gigantes (ASCG). Estos representan la principal causa de muerte en los pacientes y la reducción de su volumen a través de la administración oral de un inhibidor de mTOR es el primer criterio de valoración de los ensayos clínicos sobre este tema.

Sin embargo, sabemos que los efectos secundarios de esta vía de administración son muy graves.

60 A partir de la evidencia presentada en la Parte General, los inventores saben que son capaces de alcanzar localmente, dentro de la duramadre craneal, una concentración de inhibidor mayor que la alcanzada en la misma región a través de la administración sistémica (Tabla 2). A partir eso los inventores también saben que el inhibidor presente en este sitio es capaz de inhibir la vía de señalización de mTOR (Figuras 1 y 2). Los inventores han observado que esta concentración es capaz de realizar una acción inmunosupresora localmente (Figura 4), permaneciendo al mismo tiempo en la sangre a niveles no susceptibles de ensayo (tabla 2) y sin afectar a la actividad normal de mTOR en órganos periféricos (Figuras 1 y 2).

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un inhibidor de mTOR para su uso en el tratamiento, mediante administración intratecal, de patologías seleccionadas entre: esclerosis tuberosa, enfermedad de Alzheimer, afasia progresiva primaria y esclerosis múltiple, en el que el inhibidor de mTOR es everolimus.
2. El inhibidor para el uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicha administración intratecal es una administración intraventricular dentro de los ventrículos laterales.
- 10 3. El inhibidor para el uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que dicha administración intratecal es una administración pulsada, preferentemente a intervalos regulares, o bien una administración continua.
- 15 4. El inhibidor para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dicho inhibidor se formula en microemulsiones.
5. El inhibidor para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dicho inhibidor se encapsula en nanopartículas de poli(ácido láctico-co-glicólico) (PLGA), preferentemente modificado de una manera que sea capaz de cruzar la barrera hematoencefálica.
- 20 6. El inhibidor para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que se usa un dispositivo mecánico o electromecánico, preferentemente una bomba de infusión electromecánica, para dicha administración intratecal.
- 25 7. El inhibidor para el uso de acuerdo con la reivindicación 6, en el que dicho dispositivo mecánico o electromecánico es recargable.

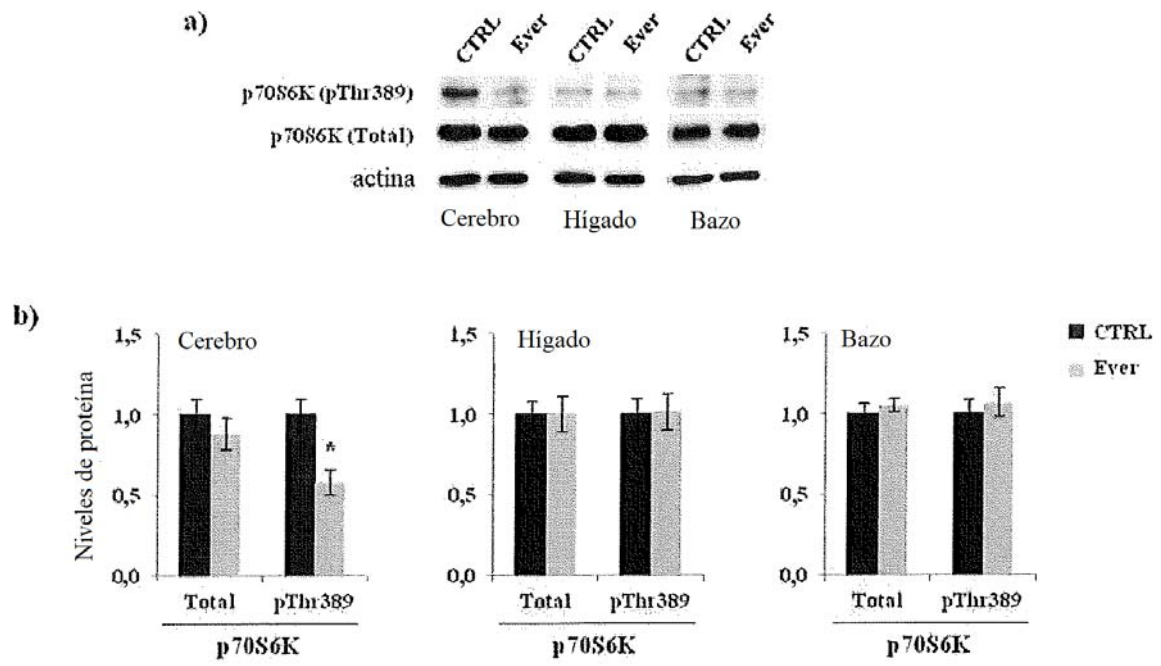


Fig. 1

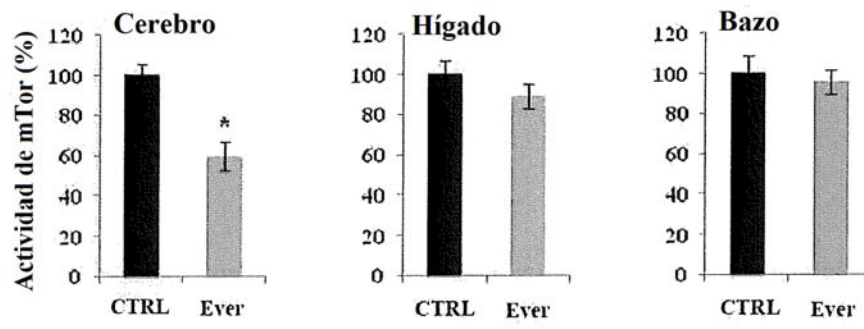


Fig. 2

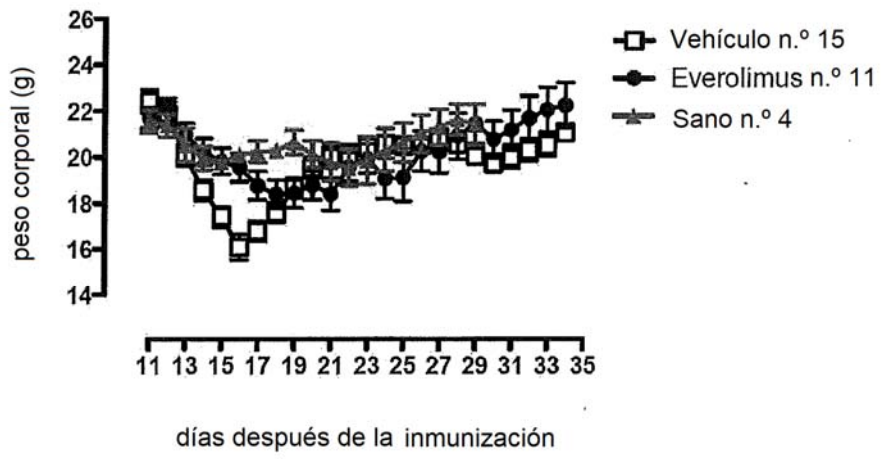


Fig. 3

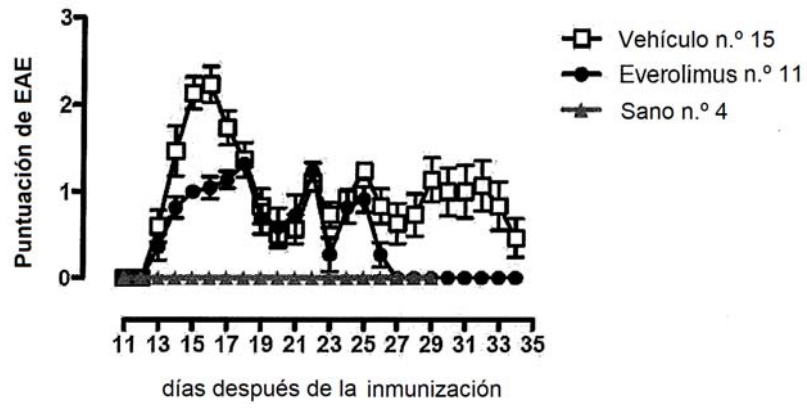


Fig. 4

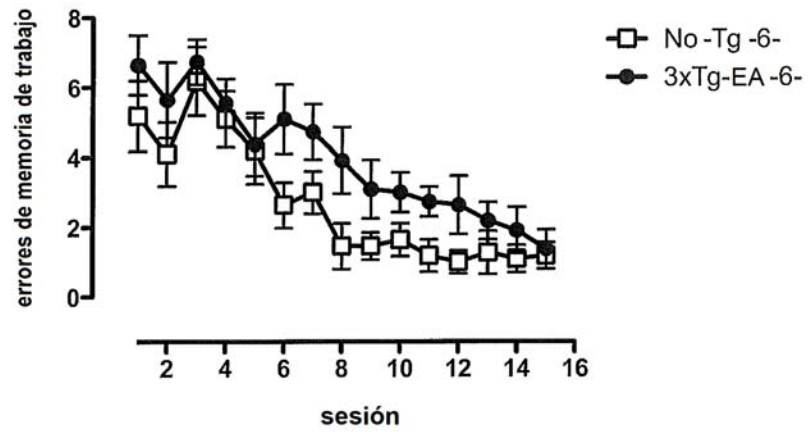


Fig. 5