

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 989 042**

51 Int. Cl.:

A23L 33/155 (2006.01)
A61K 31/59 (2006.01)
A61K 31/593 (2006.01)
A23L 33/17 (2006.01)
A61K 38/17 (2006.01)
C07K 14/435 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.09.2017 PCT/US2017/053279**

87 Fecha y número de publicación internacional: **29.03.2018 WO18058050**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.09.2017 E 17788336 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.07.2024 EP 3515212**

54 Título: **Composiciones que contienen apoecurina y vitamina D y métodos de uso de las mismas**

30 Prioridad:
23.09.2016 US 201662398669 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
25.11.2024

73 Titular/es:
**QUINCY BIOSCIENCE LLC (100.0%)
726 Heartland Trail
Madison, WI 53717, US**

72 Inventor/es:
UNDERWOOD, MARK, Y.

74 Agente/Representante:
ARIAS SANZ, Juan

Observaciones:

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

ES 2 989 042 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

Composiciones que contienen apoecurina y vitamina D y métodos de uso de las mismas

5 **Campo de la invención**

Esta invención se refiere generalmente a composiciones útiles para el mantenimiento de la homeostasis del calcio. En particular, esta invención está dirigida a composiciones que contienen apoecurina y vitamina D útiles para prevenir y/o aliviar enfermedades o síntomas asociados con el desequilibrio de calcio y la deficiencia de vitamina D.

10

Antecedentes de la invención

El calcio es el quinto elemento más abundante en el cuerpo humano y se encuentra principalmente en los huesos. Más del 99 % del calcio del cuerpo se almacena en el esqueleto, que intercambia constantemente su aporte con el 1 % restante disuelto en los fluidos corporales y los tejidos blandos, tales como la sangre. El control de este intercambio está determinado en gran medida por el sistema endocrino, que detecta la concentración de calcio ionizado en el plasma y dirige el intercambio de calcio para mantener este equilibrio crítico. Sólo una pequeña fracción del 1 % del calcio presente en los fluidos intersticiales y los tejidos blandos está ionizado y es soluble. El calcio restante en los fluidos y tejidos está unido a las proteínas, particularmente las proteínas que se unen al calcio (CaBP). Se sabe que las CaBP funcionan en el mantenimiento de la homeostasis del calcio.

15

20

Como el cuerpo requiere concentraciones específicas de iones de calcio para llevar a cabo los procesos fisiológicos necesarios, el mantenimiento de la homeostasis del calcio es de importancia crítica para la salud corporal. La comunidad médica entiende que las concentraciones adecuadas de calcio iónico en el plasma y los fluidos corporales son fundamentales para las funciones corporales, incluyendo, pero sin limitación, excitabilidad neuronal, contracción muscular, permeabilidad de membrana, división celular, secreción hormonal y mineralización ósea. Una alteración de la homeostasis del calcio, es decir, un desequilibrio de calcio, se asocia con muchas enfermedades, síndromes y afecciones, incluyendo, pero sin limitación, cáncer, enfermedades cardíacas y enfermedades neurodegenerativas.

25

En el pasado, se han recetado ampliamente antagonistas del canal de calcio, que bloquean el flujo de calcio entre el interior de las células y el fluido intersticial, como agentes farmacéuticos útiles en la prevención de trastornos relacionados con el calcio, incluyendo hipertensión, angina de pecho, asma, migrañas y deterioro neuronal. Por ejemplo, se ha descubierto que la nimidopina mejora la sintomatología clínica y las funciones cognitivas en la demencia al aliviar un desequilibrio de calcio que causa deterioro neuronal. Sin embargo, muchos de estos antagonistas de los canales de calcio tienen efectos secundarios no deseados, incluyendo, pero sin limitación, malestar general, retención de líquidos, ardor de estómago, frecuencia cardíaca errática, mareos, malestar estomacal y, en casos raros, desmayos, fiebre y sangrado excesivo.

30

35

A pesar de estos avances, todavía se necesitan terapias nuevas y alternativas que alivien o prevengan el desequilibrio del calcio. En particular, se desean composiciones farmacéuticas o nutracéuticas que tengan efectos secundarios reducidos en comparación con los agentes anteriores y, si se descubren, satisfarían una necesidad sentida durante mucho tiempo en las comunidades de salud médica y nutricional.

40

Los documentos WO 2009/114597 A1;

45

"Jellyfish Protein Shows Potential to Help With Memory", cita de Internet, 15 de octubre de 2008, páginas 1-2, XP002528809, obtenido de Internet: URL: <http://www.reuters.com/article/pressRelease/idUS219580+15-Oct-2008+PRN20081015> [consultado el 19-05-2009]; US 2014/294874 A1;

50

J. A. Detert *et al.*: "Pretreatment with Apoaequorin Protects Hippocampal CA1 Neurons from Oxygen-Glucose Deprivation", *PLOS ONE*, vol. 8, n.º 11, 11 de noviembre de 2013, página e79002, XP055425497, DOI: 10.1371/journal.pone.0079002 y CN 1 752 101 A describen el uso de apoecurina para el tratamiento de diferentes enfermedades;

55

H. Taniura *et al.*: "Chronic vitamin D3 treatment protects against neurotoxicity by glutamate in association with upregulation of vitamin D receptor mRNA expression in cultured rat cortical neurons", *JOURNAL OF NEUROSCIENCE RESEARCH*, vol. 83, n.º 7, 1 de enero de 2006, páginas 1179-1189, XP055426534, US, ISSN: 0360-4012, DOI: 10.1002/jnr.20824 y

60

Kajta M *et al.*: "Neuroprotection by co-treatment and post-treating with calcitriol following the ischemic and excitotoxic insult *in vivo* and *in vitro*", *NEUROCHEMISTRY INTERNATIONAL*, vol. 55, n.º 5, 1 de octubre de 2009, páginas 265-274, XP026251694, ISSN: 0197-0186, DOI: 10.1016/J.NEUINT.2009.03.010 [consultado el 26-03-2009] describen el uso de la vitamina D. El segundo documento divulga que la vitamina D protege contra la muerte neuronal causada por la hipoxia.

Sumario de la invención

La presente invención, que se define por las reivindicaciones, proporciona composiciones que son ventajosas en el alivio y/o prevención de síntomas o trastornos asociados al desequilibrio de calcio y la deficiencia de vitamina D.

65

Dichas composiciones incluyen apoecucorina y vitamina D en combinación con vehículos aceptables para su administración a un sujeto mediante una diversidad de vías.

5 En consecuencia, la presente invención se refiere a composiciones para su uso en el tratamiento de un síntoma o trastorno asociado con al menos uno de desequilibrio de calcio y deficiencia de vitamina D, en donde el síntoma o trastorno está relacionado con la muerte celular después de la isquemia que comprende: (a) una cantidad eficaz de apoecucorina; (b) una cantidad eficaz de vitamina D; y (c) un vehículo farmacéuticamente aceptable en donde: (a) la cantidad terapéuticamente eficaz de apoecucorina en la dosis unitaria es de aproximadamente 10 mg a aproximadamente 20 mg; y (b) la cantidad terapéuticamente eficaz de vitamina D en la dosis unitaria es de aproximadamente 25 mcg a aproximadamente 75 mcg.

15 En determinadas realizaciones, las composiciones nutracéuticas incluyen, además de apoecucorina y vitamina D, al menos otro componente reconocido por aportar beneficios nutracéuticos, tal como, por ejemplo, un agente que refuerza el sistema inmunitario, un agente antiinflamatorio, un agente antioxidante, un agente antivírico o mezclas de los mismos. Las composiciones de apoecucorina y vitamina D en ciertas realizaciones se proporcionan en una forma farmacéutica unitaria seleccionada entre un comprimido, una cápsula, una solución, una suspensión, un jarabe, una bebida, una formulación oral u oftálmica o una inyección.

20 Se describe además (no forma parte de la presente invención) un método para tratar un síntoma o trastorno asociado con el desequilibrio de calcio y la deficiencia de vitamina D, que comprende administrar a un sujeto que necesita dicho tratamiento una cantidad eficaz de apoecucorina y vitamina D.

25 Los métodos descritos en el presente documento son útiles para tratar una amplia diversidad de síntomas o trastornos asociados con el desequilibrio de calcio y la deficiencia de vitamina D, incluyendo, pero sin limitación, la calidad del sueño, la calidad de la energía, la calidad del estado de ánimo, el dolor, la calidad de la memoria. En ciertos ejemplos, el desequilibrio de calcio y la deficiencia de vitamina D están relacionados fisiológicamente con la excitabilidad neuronal, contracción muscular, permeabilidad de membrana, división celular, secreción de hormonas, mineralización ósea o muerte celular después de la isquemia. En dichos métodos, la apoecucorina y la vitamina D se administran preferentemente al sujeto en forma de una composición nutracéutica.

30 Se describe además el uso de apoecucorina y vitamina D para la fabricación de una composición nutracéutica para tratar un síntoma o trastorno asociado con el desequilibrio de calcio y la deficiencia de vitamina D en un sujeto al que se le administra la composición nutracéutica. Los síntomas o trastornos ilustrativos tratados por dichas composiciones incluyen aquellos asociados con el sueño, la energía, el ánimo, el dolor o la memoria.

35 La presente invención contempla además la apoecucorina y la vitamina D para su uso en el tratamiento de un síntoma o trastorno asociado con el desequilibrio de calcio y la deficiencia de vitamina D en un sujeto, incluyendo aquellos síntomas o trastornos asociados con, por ejemplo, el sueño, la energía, el ánimo, el dolor o la memoria en un sujeto.

40 La presente invención proporciona diferentes ventajas sobre las composiciones y métodos anteriores en el sentido de que proporciona la mejora general de la salud mental y física de un sujeto a través de sus funciones neuroprotectoras.

Otros objetos, características y ventajas de la presente invención serán evidentes después de la revisión de la memoria descriptiva y las reivindicaciones.

45 **Breve descripción de los dibujos**

50 La figura 1 proporciona un gráfico que muestra el cambio porcentual desde el valor de referencia de las puntuaciones de las áreas: calidad general del sueño, energía, ánimo, dolor y salud general frente a los días 0 a 90.

55 La figura 2 muestra un gráfico que muestra datos en los que 56 participantes tomaron apoecucorina (10 mg) diariamente. Los participantes se evaluaron desde ocho días hasta 30 días. El estudio de la memoria mostró una mejora estadísticamente significativa en la memoria después de 30 días ($p < 0,05$). El 57 % de los participantes tuvo una mejora en la memoria general, el 51 % en la retención de información, el 84 % en recordar indicaciones de manejo y el 66 % en recordar palabras. N=56; 66 % mujeres, 34 % hombres, edad media = 56 años; intervalo 20-78 años.

La figura 3 proporciona un gráfico que muestra el cambio porcentual, desde el valor de referencia, de las puntuaciones del cuestionario de batería cognitiva estandarizada frente a los días 0 al 90.

60 La figura 4 muestra la neuroprotección por AQ (apoecucorina) y vitamina D en cortes de cerebro de hipocampo de rata.

Descripción detallada de la invención

I. EN GENERAL

65 Antes de describir los presentes materiales y métodos, se entiende que la presente invención no se limita a la

metodología particular y los materiales descritos, ya que estos pueden variar. También debe entenderse que la terminología usada en el presente documento tiene el fin de describir realizaciones particulares únicamente y no tiene por objeto limitar el alcance de la presente invención que estará limitada únicamente por las reivindicaciones adjuntas.

5 Cabe señalar que, como se usa en el presente documento y en las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular "un", "uno/a" y "el/la" incluyen referencias en plural, salvo que el contexto indique claramente otra cosa. Del mismo modo, las expresiones "un" (o "uno/a"), "uno/a o más" y "al menos uno/a" se pueden usar indistintamente en el presente documento. También cabe señalar que las expresiones "que comprende/n", "que incluye/n" y "que tiene/n" se pueden usar indistintamente.

10 A menos que se defina lo contrario, todos los términos y las expresiones científicas y técnicas usadas en el presente documento tienen los mismos significados que el que entiende comúnmente un experto habitual en la materia a la que pertenece la presente invención. Aunque se pueden usar en la práctica o en el ensayo de la presente invención cualquier método y material similar o equivalente a los que se describen en el presente documento, a continuación, se describen los métodos y materiales preferidos.

II. LA INVENCION

20 La ecurina es una fotoproteína aislada originalmente de medusas luminiscentes y otros organismos marinos. El complejo de ecurina comprende una proteína de apoecurina de 22.285 dalton, oxígeno molecular y el luminóforo coelenteracina. Cuando tres iones de Ca^2 se unen a este complejo, la coelenteracina se oxida a coelentermida, con una liberación simultánea de dióxido de carbono y luz azul. La ecurina no es exportada ni secretada por las células, ni está compartimentada o secuestrada dentro de las células. En consecuencia, las mediciones de ecurina se han utilizado para detectar cambios del Ca^2 que se producen durante periodos relativamente largos. En varios sistemas experimentales, la luminiscencia de la ecurina fue detectable muchas horas o días después de la carga de la célula. Se sabe además que la ecurina tampoco altera las funciones celulares ni el desarrollo embrionario.

30 Debido a su luminiscencia dependiente del Ca^2 , el complejo de ecurina se ha utilizado ampliamente como indicador de Ca^2 intracelular. La ecurina de *Aequorea victoria* se ha utilizado de manera específica para: (1) analizar la respuesta de secreción de las células cromafines suprarrenales individuales a los agonistas colinérgicos nicotínicos; (2) aclarar el papel de la liberación del Ca^2 en el daño del músculo cardíaco; (3) demostrar la liberación masiva de Ca^2 durante la fecundación; (4) estudiar la regulación de la expresión de la bomba de Ca^2 del retículo sarcoplásmico en el desarrollo de mioblastos de pollo; y (5) calibrar micropipetas con volúmenes de inyección de tan solo tres picolitros.

35 La apoecurina tiene un peso molecular aproximado de 22 kDa. La apoecurina se puede utilizar para regenerar ecurina mediante la reducción del enlace disulfuro en la apoecurina. La apoecurina cargada con calcio conserva la misma estructura compacta y el patrón de plegamiento general que las fotoproteínas sin reaccionar que contienen un sustrato unido.

40 La purificación convencional de la ecurina de la medusa *Aequorea victoria* requiere procedimientos de extracción laboriosos y, a veces, produce preparaciones que son sustancialmente heterogéneas o que son tóxicas para los organismos en estudio. Dos toneladas de medusas suelen producir aproximadamente 125 mg de la fotoproteína purificada. Por el contrario, la ecurina recombinante se produce preferentemente mediante la purificación de la apoecurina a partir de *Escherichia coli* genomanipulada, seguida de la reconstitución del complejo de ecurina *in vitro* con coelenteracina pura. Se ha descrito apoecurina útil en la presente invención y se puede obtener de manera comercial a través de esquemas de purificación y/o síntesis conocidos por los expertos en la materia. S. Inouye, S. Zenno, Y. Sakaki y F. Tsuji. High level expression and purification of apoaequorin. (1991) *Protein Expression and Purification* 2,122-126.

50 La vitamina D es un grupo de secoesteroides liposolubles encargados de aumentar la absorción intestinal de calcio, hierro, magnesio, fosfato y zinc. La vitamina D es producida por el cuerpo en respuesta a la exposición de la piel a los rayos ultravioleta de la luz solar. También se encuentra en alimentos naturales tales como el pescado, aceites de hígado de pescado, yemas de huevo y en productos de cereales y lácteos fortificados. En los suplementos dietéticos, las dos formas compuestas más comunes de vitamina D son la vitamina D3 (colecalciferol) y la vitamina D2 (ergocalciferol).

60 La vitamina D es una vitamina liposoluble que es biológicamente inerte y debe sufrir dos hidroxilaciones en el cuerpo para activarse. La primera ocurre en el hígado y convierte la vitamina D en 25-hidroxivitamina D [25(OH)D], también conocida como calcifediol. La segunda se produce principalmente en el riñón y forma la 1,25-dihidroxivitamina D [1,25(OH)2D] fisiológicamente activa, también conocida como calcitriol. La forma activa de la vitamina D, calcitriol, circula como hormona en la sangre, regulando la concentración de calcio y fosfato en el torrente sanguíneo y fomentando el crecimiento saludable y la remodelación de los huesos.

65 La vitamina D fomenta la absorción de calcio y mantiene las concentraciones adecuadas de calcio y fosfato sérico para permitir la mineralización normal de los huesos y prevenir la tetania hipocalcémica. También se usa para el crecimiento óseo y la remodelación ósea por osteoblastos y osteoclastos. También se ha demostrado que desempeña

un papel en la modulación del crecimiento celular, la función neuromuscular e inmunitaria y la reducción de la inflamación.

5 Se describe en el presente documento la administración de composiciones que contienen apoecurina y vitamina D a un sujeto para corregir o mantener el equilibrio de calcio y los niveles de vitamina D en ese sujeto. La deficiencia de vitamina D puede contribuir a los desequilibrios de calcio. Se entiende que el mantenimiento de las concentraciones de calcio iónico en el plasma y los líquidos corporales es fundamental para una amplia diversidad de funciones corporales, incluyendo, pero sin limitación, excitabilidad neuronal, contracción muscular, permeabilidad de membrana, división celular, secreción de hormonas, mineralización ósea o la prevención de la muerte celular después de la isquemia. La alteración de la homeostasis del calcio, es decir, un desequilibrio de calcio, se entiende que provoca y/o se correlaciona con muchas enfermedades, síndromes y afecciones. Dichas enfermedades, síndromes y afecciones incluyen aquellas asociadas con la calidad del sueño, la calidad de la energía, la calidad del estado de ánimo, la calidad de la memoria y la percepción del dolor. El estudio de las CaBP ha llevado a su reconocimiento como factores protectores que actúan en el mantenimiento de los niveles adecuados de calcio iónico.

15 Se entiende que el mantenimiento de los niveles de vitamina D es fundamental para la absorción de calcio, la modulación del crecimiento celular, la función neuromuscular e inmunitaria y la reducción de la inflamación. La deficiencia de vitamina D está más asociada con el raquitismo, una enfermedad en la que el tejido óseo no se mineraliza adecuadamente, lo que provoca huesos blandos y deformidades esqueléticas. Las pautas del Instituto de Medicina establecen que la ingesta diaria recomendada (IDR) de vitamina D es de 600 unidades internacionales (UI) para adultos de entre 1 y 70 años, y de 800 UI para adultos mayores de 70 años para optimizar la salud ósea.

20 En determinadas realizaciones, los métodos descritos en el presente documento comprenden la administración de apoecurina en combinación con vitamina D para tratar el desequilibrio de calcio, para retrasar la progresión del desequilibrio de calcio, para prevenir la aparición del desequilibrio de calcio, para prevenir y/o tratar la recurrencia del desequilibrio de calcio y para tratar la deficiencia de vitamina D. Se describen además métodos que comprenden la administración de apoecurina y vitamina D en combinación con uno o más agentes adicionales que tienen un valor terapéutico o nutracéutico conocido. Las aplicaciones particularmente preferidas de la apoecurina y la vitamina D son el tratamiento de uno o más síntomas y trastornos relacionados con la calidad del sueño, la energía, el estado de ánimo, la memoria y la percepción del dolor.

25 Como se usa en el presente documento, el término "tratar" incluye el tratamiento preventivo, así como el de remisión del trastorno. Como se usa en el presente documento, los términos "reducir", "aliviar", "suprimir" e "inhibir" tienen el significado comúnmente entendido de atenuar o disminuir. Como se usa en el presente documento, el término "progresión" significa aumentar en alcance o intensidad, avanzar, crecer o empeorar. Como se usa en el presente documento, el término "recaída" significa el regreso de una enfermedad después de una remisión.

30 Como se usa en el presente documento, el término "administrar" se refiere poner en contacto un paciente, tejido, órgano o célula con apoecurina y vitamina D. Como se utiliza en el presente documento, la administración se puede lograr *in vitro*, es decir, en un tubo de ensayo, o *in vivo*, es decir, en células o tejidos de organismos vivos, por ejemplo, seres humanos. En realizaciones preferidas, la presente invención abarca la administración de las composiciones útiles en la presente invención a un paciente o sujeto. Un "paciente" o "sujeto", utilizado de manera equivalente en el presente documento, se refiere a un mamífero, preferentemente un ser humano, que: (1) tiene un trastorno relacionado con el desequilibrio de calcio y/o deficiencia de vitamina D que se puede remediar o tratar mediante la administración de apoecurina y vitamina D; o (2) es susceptible a un trastorno relacionado con el desequilibrio de calcio y/o la deficiencia de vitamina D que se puede prevenir administrando apoecurina y vitamina D.

35 Como se usa en el presente documento, las expresiones "cantidad eficaz" y "cantidad terapéuticamente eficaz" se refieren a la cantidad de agentes activos suficiente para producir una respuesta terapéutica deseada sin efectos secundarios adversos indebidos tales como toxicidad, irritación o respuesta alérgica. La "cantidad eficaz" específica variará, obviamente, con factores como la afección particular que se está tratando, el estado físico del paciente, el tipo de animal a tratar, la duración del tratamiento, la naturaleza de la terapia simultánea (si existe) y las formulaciones específicas empleadas y la estructura de los compuestos o sus derivados. En este caso, una cantidad se consideraría terapéuticamente eficaz si diera como resultado uno o más de los siguientes: (1) la prevención de un trastorno relacionado con el desequilibrio de calcio y/o la deficiencia de vitamina D; y (2) la reversión o estabilización de un trastorno relacionado con el desequilibrio de calcio y/o una deficiencia de vitamina D. Las cantidades eficaces óptimas se pueden determinar fácilmente por un experto en la materia utilizando experimentación rutinaria.

40 En ciertas composiciones preferidas para la administración oral a sujetos, la apoecurina está formulada con al menos un vehículo aceptable en una dosis de aproximadamente 10 a 50 mg/dosis, una dosis preferentemente en forma de cápsula, con una dosis recomendada para un sujeto de aproximadamente 20 mg/día. En determinadas composiciones preferidas para administración oral a sujetos, la vitamina D (en forma de colecalciferol D3) se formula en combinación con apoecurina en una dosis de aproximadamente 25-75 mcg/dosis, siendo la dosis recomendada para un sujeto de aproximadamente 50 mcg/día.

45 Las composiciones de acuerdo con la presente invención incluyen formulaciones líquidas o liofilizadas o secadas de

otro modo e incluyen diluyentes de varios contenidos de tampón (por ejemplo, Tris-HCl, acetato y fosfato), pH y fuerza iónica, aditivos tales como albúmina o gelatina para evitar la absorción a las superficies, detergentes (por ejemplo, Tween 20, Tween 80, Pluronic F68, sales de ácidos biliares), agentes solubilizantes (por ejemplo, glicerol, polietilenglicerol), antioxidantes (por ejemplo, ácido ascórbico, metabisulfito de sodio), conservantes (por ejemplo, 5 timerosal, alcohol bencílico, parabenos), sustancias voluminosas o modificadores de la tonicidad (por ejemplo, lactosa, manitol), unión covalente de polímeros tales como el polietilenglicol a la proteína, formación de complejos con iones metálicos o incorporación del material en o sobre preparaciones particuladas de compuestos poliméricos tales como el ácido poliláctico, ácido poliglicólico o hidrogeles, o en liposomas, microemulsiones, micelas, vesículas lamelares o multilamelares, fantasmas de eritrocitos o esferoplastos. Dichas composiciones influirán en el estado físico, solubilidad, 10 estabilidad, la tasa de liberación *in vivo* y la tasa de aclaramiento *in vivo*. Las composiciones de liberación controlada o sostenida incluyen formulaciones en depósitos lipófilos (por ejemplo, ácidos grasos, ceras, aceites).

Se describen además métodos para administrar composiciones particuladas recubiertas con polímeros (por ejemplo, poloxámeros o poloxaminas). Otras realizaciones de las composiciones incorporan recubrimientos protectores en 15 forma de partículas, inhibidores de la proteasa o potenciadores de la permeación para diversas vías de administración, incluyendo parenteral, pulmonar, nasal y oral. En determinadas realizaciones, la composición se administra por vía parenteral, paracancerígena, transmucosa, intramuscular, intravenosa, intradérmica, subcutánea, intraperitoneal, intraventricular, intracraneal o intratumoralmente.

Asimismo, como se usa en el presente documento, los "vehículos farmacéuticamente aceptables" son bien conocidos por los expertos en la materia e incluyen, pero sin limitación, tampón de fosfato 0,0141 M y preferentemente 0,05 M o 20 solución salina al 0,9 %. Adicionalmente, dichos vehículos farmacéuticamente aceptables pueden ser soluciones, suspensiones y emulsiones. Ejemplos de disolventes no acuosos son propilenglicol, polietilenglicol, aceites vegetales tales como aceite de oliva y ésteres orgánicos inyectables tales como oleato de etilo. Los vehículos acuosos incluyen 25 agua, soluciones alcohólicas/acuosas, emulsiones o suspensiones, incluyendo solución salina y medio tamponado.

Los vehículos parenterales incluyen solución de cloruro sódico, dextrosa de Ringer, dextrosa y cloruro sódico, Ringer lactado y aceites fijos. Los vehículos intravenosos incluyen reponedores de líquidos y nutrientes, reponedores de 30 electrolitos tales como los basados en dextrosa de Ringer y similares. También pueden estar presentes conservantes y otros aditivos, tales como, por ejemplo, agentes antimicrobianos, antioxidantes, intercaladores, gases inertes y similares.

Las composiciones de liberación controlada o sostenida administrables de acuerdo con la invención incluyen la 35 formulación en depósitos lipófilos (por ejemplo, ácidos grasos, ceras, aceites). En el presente documento también se comprenden las composiciones particuladas recubiertas con polímeros (por ejemplo, poloxámeros o poloxaminas) y los compuestos acoplados a anticuerpos dirigidos contra receptores específicos de tejido, ligandos o antígenos o acoplados a ligandos de receptores específicos de tejido.

Otras realizaciones de las composiciones administradas de acuerdo con la invención incorporan formas particuladas, 40 recubrimientos protectores, inhibidores de la proteasa o potenciadores de la permeación para diversas vías de administración, incluyendo parenteral, pulmonar, nasal, oftálmica y oral.

Las entidades químicas modificadas mediante el enlace covalente de polímeros solubles en agua tales como 45 polietilenglicol, copolímeros de polietilenglicol y polipropilenglicol, carboximetilcelulosa, dextrano, alcohol polivinílico, polivinilpirrolidona o poliprolina se sabe que presentan semividas en sangre sustancialmente más largas tras una inyección intravenosa que los compuestos no modificados correspondientes. Dichas modificaciones pueden aumentar también la solubilidad de la entidad química en solución acuosa, eliminar la agregación, potenciar la estabilidad física y química del compuesto, y reducir mucho la inmunogenia y la reactividad del compuesto. Como resultado, se puede 50 conseguir la actividad biológica deseada *in vivo* mediante la administración de dichos aductos de entidades poliméricas con menor frecuencia o en dosis inferiores que con la entidad no modificada.

En otro método más descrito en el presente documento, la composición se puede administrar en un sistema de liberación controlada. Por ejemplo, el agente puede administrarse usando infusión intravenosa, bomba osmótica 55 implantable, un parche transdérmico, liposomas, u otros modos de administración. En una realización, se puede usar una bomba. En otra realización, se puede usar materiales poliméricos. En otra realización más, se puede colocar un sistema de liberación controlada en proximidad a la diana terapéutica, es decir, el cerebro, siendo necesaria, por lo tanto, solo una fracción de la dosis sistémica.

La composición puede comprender apoecurina y vitamina D, o puede incluir además un vehículo farmacéuticamente 60 aceptable y puede estar en forma sólida o líquida tal como comprimidos, polvos, cápsulas, granulados, soluciones, suspensiones, elixires, jarabes, bebidas, emulsiones, geles, cremas, formulaciones oftálmicas o supositorios, incluyendo supositorios rectales y uretrales. Los vehículos farmacéuticamente aceptables también incluyen gomas, almidones, azúcares, materiales celulósicos y mezclas de los mismos. La composición que contiene apoecurina y vitamina D se puede administrar a un paciente mediante, por ejemplo, implantación subcutánea de un granulado. En 65 una realización adicional, un granulado proporciona una liberación controlada de apoecurina y/o vitamina D durante un período de tiempo. La composición puede también administrarse por inyección intravenosa, intraarterial,

intramuscular de un líquido, administración oral de un líquido o sólido, o por aplicación tópica. La administración también puede realizarse mediante el uso de un supositorio rectal o un supositorio uretral.

5 Las composiciones descritas en el presente documento se pueden preparar mediante conocidos procesos de disolución, mezcla, granulación o formación de comprimidos. Para la administración oral, la apoecorina o sus derivados fisiológicamente tolerados tales como sales, ésteres, N-óxidos y similares y/o vitamina D o sus derivados fisiológicamente tolerados tales como sales, ésteres, N-óxidos y similares se mezclan con aditivos habituales para este propósito, tales como vehículos, estabilizantes o diluyentes inertes, y se convierten mediante métodos habituales en formas adecuadas para la administración, tal como comprimidos, comprimidos recubiertos, cápsulas duras o
10 blandas de gelatina, soluciones acuosas, alcohólicas u oleosas.

Los ejemplos de vehículos inertes adecuados son bases de comprimidos convencionales tales como lactosa, sacarosa o almidón de maíz en combinación con aglutinantes tales como acacia, almidón de maíz, gelatina, con agentes disgregantes tales como almidón de maíz, almidón de patata, ácido algínico, o con un lubricante tal como ácido esteárico o estearato de magnesio.
15

Los ejemplos de vehículos oleosos o disolventes adecuados son aceites vegetales o animales tales como aceite de girasol o aceite de hígado de pescado. Las composiciones pueden efectuarse tanto como gránulos secos como húmedos. Para la administración parenteral (inyección subcutánea, intravenosa, intraarterial o intramuscular), la entidad química o sus derivados fisiológicamente tolerados tales como sales, ésteres, N-óxidos y similares se convierten en una solución, suspensión o expulsión, si se desea con las sustancias habituales y adecuadas para este fin, por ejemplo, solubilizantes u otros auxiliares.
20

Los ejemplos son líquidos estériles tales como agua y aceites, con o sin la adición de un tensioactivo y otros adyuvantes farmacéuticamente aceptables. Los aceites ilustrativos son los procedentes del petróleo, de origen animal, vegetal o sintético, por ejemplo, aceite de cacahuate, aceite de soja o aceite mineral. En general, agua, solución salina, soluciones acuosas de dextrosa y azúcares relacionados y los glicoles tales como los propilenglicoles o el polietilenglicol son los vehículos líquidos preferidos, en particular, para soluciones inyectables.
25

Se entiende bien en la técnica la preparación de composiciones que contienen un componente activo. Estas composiciones pueden prepararse como aerosoles administrados a la nasofaringe o como inyectables, ya sea en forma de soluciones o suspensiones líquidas; sin embargo, pueden prepararse también formas sólidas adecuadas para solución en, o suspensión en, antes de la inyección. La composición también puede emulsionarse. El principio terapéutico activo se mezcla a menudo con excipientes que son farmacéuticamente aceptables y compatibles con el principio activo. Los excipientes adecuados incluyen, por ejemplo, agua, solución salina, dextrosa, glicerol, etanol o similares o cualquier combinación de los mismos. Además, la composición puede contener cantidades mínimas de sustancias auxiliares tales como agentes humectantes o emulsionantes, agentes tamponantes del pH que potencian la eficacia del principio activo.
30

Se puede formular un componente activo en la composición como formas salinas farmacéuticamente aceptables neutralizadas. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen las sales de adición de ácido, que se forman con ácidos inorgánicos tales como, por ejemplo, ácidos clorhídricos o fosfóricos, o ácidos orgánicos tales como ácido acético, tartárico, mandélico y similares. Las sales formadas a partir de grupos carboxilo libres pueden proceder también de bases inorgánicas tales como, por ejemplo, sodio, potasio, amonio, calcio o férricos, y bases orgánicas, tales como isopropilamina, trimetilamina, 2-etilamino-etanol, histidina, procaína y similares.
35

Para la administración tópica a superficies corporales usando, por ejemplo, cremas, geles, gotas y similares de apoecorina o sus derivados fisiológicamente tolerados y/o vitamina D o sus derivados fisiológicamente tolerados se preparan y aplican como soluciones, suspensiones o emulsiones en un diluyente fisiológicamente aceptable con o sin un transportador farmacéutico.
40

En un método descrito en el presente documento, el componente activo puede administrarse en una vesícula, en particular, un liposoma (véase Langer, *Science* 249:1527-1533 (1990); Treat *et al.*, *Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer*, Lopez-Berestein y Fidler (eds.), Liss, N.Y., pp.353-365 (1989).
45

Las sales de apoecorina y/o vitamina D son preferentemente sales farmacéuticamente aceptables. Otras sales pueden, sin embargo, ser útiles en la preparación de las composiciones de acuerdo con la invención o de sus sales farmacéuticamente aceptables. Las sales farmacéuticamente aceptables adecuadas incluyen sales de adición de ácidos que pueden, por ejemplo, formarse mediante la mezcla de una solución de apoecorina y/o vitamina D con una solución de un ácido farmacéuticamente aceptable tal como ácido clorhídrico, ácido sulfúrico, ácido metanosulfónico, ácido fumárico, ácido maleico, ácido succínico, ácido acético, ácido benzoico, ácido oxálico, ácido cítrico, ácido tartárico, ácido carbónico o ácido fosfórico.
50

Además, las composiciones que contienen apoecorina y vitamina D descritas en el presente documento se pueden proporcionar en forma de composiciones nutracéuticas donde la apoecorina y la vitamina D previenen la aparición o reducen o estabilizan varios trastornos nocivos relacionados con el desequilibrio de calcio y la deficiencia de vitamina
55

D. El término "nutracéutico" o "composición nutracéutica", para los fines de la presente memoria descriptiva, se refiere a un alimento, o una parte de un alimento, que ofrece beneficios médicos para la salud, incluyendo prevención y/o tratamiento de una enfermedad. Una composición nutracéutica de acuerdo con la presente invención puede contener solo apoecuatorina y vitamina D como principios activos, o de manera alternativa, puede comprender además, en mezcla con suplementos dietéticos que incluyen vitaminas, coenzimas, minerales, hierbas, aminoácidos y similares que complementan la dieta mediante el aumento de la ingesta total de esa sustancia.

Por lo tanto, en el presente documento se describen métodos para proporcionar beneficios nutracéuticos a un paciente que comprenden la etapa de administrar al paciente una composición nutracéutica que contiene apoecuatorina y vitamina D. Dichas composiciones generalmente incluyen un "vehículo nutracéuticamente aceptable" que, como se hace referencia en el presente documento, es cualquier vehículo adecuado para la administración oral, incluidos los vehículos farmacéuticamente aceptables mencionados anteriormente adecuados para la vía oral. En determinadas realizaciones, las composiciones nutracéuticas de acuerdo con la invención comprenden suplementos dietéticos que, definidos sobre una base funcional, incluyen agentes inmunoestimulantes, agentes antiinflamatorios, agentes antioxidantes, agentes antivíricos o mezclas de los mismos.

Los agentes inmunoestimulantes y/o antivíricos son útiles para acelerar la cicatrización de heridas y mejorar la función inmunitaria; e incluyen extractos de equináceas, o plantas del género *Echinacea*, extractos de plantas del género *Sambuca* y extractos de sello de oro. Las plantas del género *Astragalus* también son inmunoestimulantes eficaces en sus formas naturales o procesadas. *Astragalus* estimula el desarrollo de células madre en la médula y células inmunitarias activas del tejido linfático. El zinc y sus sales bioactivas, tales como el gluconato de zinc y el acetato de zinc, también actúan como inmunoestimulantes en el tratamiento del resfriado común.

Los antioxidantes incluyen alicina aminoácido que contiene azufre natural, que actúa para aumentar el nivel de enzimas antioxidantes en la sangre. Las plantas o extractos de plantas, tales como ajo, que contienen alicina, también son antioxidantes eficaces. Las catequinas y los extractos de plantas tales como el té verde que contienen catequinas, también son antioxidantes eficaces. Los extractos del género *Astragalus* también muestran actividad antioxidante. Los bioflavonoides, tales como la quercetina, hesperidina, rutina y mezclas de los mismos, también son eficaces como antioxidantes. El principal papel beneficioso de los bioflavonoides puede ser proteger a la vitamina C de la oxidación en el cuerpo. Esto produce más vitamina C, o ácido ascórbico, disponible para su uso por el cuerpo.

Los bioflavonoides tales como la quercetina también son agentes antiinflamatorios eficaces y pueden utilizarse como tales en las composiciones de la invención. Los suplementos herbales antiinflamatorios y los compuestos antiinflamatorios procedentes de plantas o hierbas también se pueden utilizar como agentes antiinflamatorios en la composición inventiva. Estos incluyen bromelaína, una enzima proteolítica que se encuentra en la piña; téis y extractos de ortiga; cúrcuma, extractos de cúrcuma, o curcumina, un pigmento amarillo aislado de la cúrcuma.

Otro complemento que se puede utilizar en la presente invención es el jengibre, procedente de plantas del género *Zingiber*. Se ha descubierto que posee actividad cardiotónica debido a compuestos tales como el gingerol y el compuesto relacionado shogaol, además de proporcionar beneficios en el tratamiento de mareos y trastornos vestibulares. El jengibre también es eficaz en el tratamiento de las náuseas y otros trastornos estomacales.

Los suplementos que ayudan a reconstruir las estructuras de los tejidos blandos, en particular, en la reconstrucción del cartílago, son útiles en composiciones para tratar el dolor de la artritis y otros trastornos de las articulaciones. La glucosamina, sulfato de glucosamina, y la condroitina pueden proceder de una variedad de fuentes tales como Elk Velvet Antler. También se sabe que los complejos lipídicos marinos, los complejos de ácidos grasos omega 3 y el aceite de pescado son útiles para tratar el dolor asociado con la artritis.

Los suplementos útiles en el tratamiento de las migrañas incluyen la matricaria y *Ginkgo biloba*. El principal principio activo de la matricaria es la partenolida de lactona sesquiterpénica, que inhibe las secreciones de prostaglandinas que a su vez provocan dolor a través de la actividad vasoespástica en los vasos sanguíneos. La matricaria también presenta propiedades antiinflamatorias. El aceite de pescado, debido a su acción estabilizadora de plaquetas y antivasoespástica, también puede ser útil en el tratamiento de dolores de cabeza por migraña. La planta *Ginkgo biloba* también ayuda en el tratamiento de las migrañas mediante la estabilización de las arterias y la mejora de la circulación sanguínea.

Aunque algunos de los suplementos enumerados anteriormente han sido descritos en cuanto a sus efectos farmacológicos, también se pueden usar otros suplementos en la presente invención y sus efectos están bien documentados en la literatura científica.

La invención se comprenderá más completamente tras la consideración de los siguientes ejemplos no limitativos que describen y divulgan los productos químicos, instrumentos, análisis estadísticos y metodologías que se informan en las publicaciones que podrían usarse en relación con la invención.

Ejemplos

Ejemplo 1. La administración de apoecurina durante un período de noventa (90) días mejora la calidad de vida de los sujetos de prueba.

5 El presente análisis, un estudio abierto, de 32 pacientes durante un período de 90 días muestra un aumento en la calidad general del sueño, la energía, el ánimo, el dolor, el estado de salud general. Los cambios en el rendimiento se midieron mediante una batería estandarizada de preguntas. Estas incluyeron evaluaciones de pruebas cognitivas cualitativas, un índice de sueño, un índice de dolor de cabeza y un cuestionario de calidad de vida. El estudio muestra un rendimiento mejorado. Ningún participante abandonó el estudio debido a un acontecimiento adverso.

10 Los resultados ilustrados en la Figura 1 muestran el cambio porcentual desde el valor de referencia de las puntuaciones de las áreas mencionadas; se han excluido las puntuaciones de la memoria para otro gráfico. El análisis aquí se muestra marcado en el gráfico como 1, 2, 3, 4 y 5 frente a los días 0 a 90. El gráfico muestra un aumento en la calidad general del sueño, la energía, el ánimo, el dolor y la salud general. El valor de referencia se conocía desde una fase previa al estudio.

Ejemplo 2. La administración de apoecurina durante un período de treinta (30) días mejora la calidad de vida de los sujetos de prueba.

20 El presente estudio fue un estudio abierto para 56 participantes durante un período de 30 días. Los cambios en el rendimiento se midieron mediante una herramienta de evaluación de la memoria. Como se ilustra en la figura 2, el estudio mostró una mejora en el rendimiento de la memoria ya a los ocho días, pero con una mejora estadísticamente mayor el día 30. Ningún participante abandonó el estudio debido a un acontecimiento adverso.

Ejemplo 3. La administración de apoecurina durante un período de noventa (90) días produce una mejora en la cognición de los sujetos de prueba.

25 El presente análisis, un estudio abierto de 32 pacientes muestra un aumento en la capacidad cognitiva. Los cambios en el rendimiento se midieron a través de una batería cognitiva estandarizada. El estudio mostró una mejora en la cognición a los ocho días, pero con una mejora estadísticamente mayor el día 30, así como 60-90. Ningún participante abandonó el estudio debido a un acontecimiento adverso. Los resultados mostrados en la Figura 3 demuestran el aumento porcentual significativo desde el valor de referencia de las puntuaciones en la capacidad cognitiva. Nota: Más del 51 % de participantes tuvo un aumento en la capacidad cognitiva.

Ejemplo 4. Administración de la composición que contiene apoecurina y vitamina D.

35 Se administra a un paciente una composición que contiene apoecurina y vitamina D en forma de cápsula que contiene una mezcla de apoecurina y vitamina D3. La composición contiene 50 mcg de vitamina D3 (en forma de colecalciferol D3) y 20 mg de apoecurina. La composición nutracéutica se presenta en una cápsula vegetal nutracéuticamente aceptable (celulosa vegetal, agua). La composición contiene además celulosa microcristalina, azúcar y pequeñas cantidades de acacia (goma arábiga), peptonas de caseína, almidón de maíz, lactosa, estearato de magnesio (fuente vegetal), triglicéridos de cadena media (aceite vegetal), sal, peptonas de soja, DL α -tocoferol, fosfato tricálcico y agua. Una cápsula tomada diariamente proporciona la dosis recomendada. Dicha dosis contiene aproximadamente el 250 % de la dosis diaria recomendada de vitamina D. La vitamina D adecuada para su uso en la invención está comercializada por BASF y se vende como "Dry Vitamin D3 100 GFP/HP". La dosis única puede formularse alternativamente para contener otras cantidades de apoecurina, incluyendo las dosis únicas que contienen 10 mg o 40 mg de apoecurina.

Ejemplo 5. Evaluación de la neuroprotección por AQ (apoecurina) y vitamina D en cortes de cerebro de hipocampo de rata.

50 Los resultados preliminares de un subconjunto de datos experimentales indican una muerte celular significativa después de 5 minutos de privación de oxígeno y glucosa (OGD Fig. 4; imagen superior izquierda) y muerte celular mínima en cortes que no fueron sometidos a OGD de 5 minutos (Fig. 4; imagen superior derecha). La inyección directa de AQ en el hipocampo da como resultado menos células muertas y moribundas (es decir, células teñidas de azul).
55 Las ratas alimentadas con una dieta suplementada con vitamina D (0,0125 mg/kg) durante aproximadamente 10 días también parecen tener menos células muertas o moribundas. La combinación de AQ y vitamina D puede reducir aún más la cantidad de muerte celular (Fig. 4; imagen inferior izquierda). Los cortes de control (aquellos no sometidos a OGD) no parecen variar apreciablemente en función de la condición del tratamiento.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición para su uso en el tratamiento de un síntoma o trastorno asociado con al menos uno de
desequilibrio de calcio y deficiencia de vitamina D, en donde el síntoma o trastorno está relacionado con la muerte
celular después de la isquemia que comprende: (a) una cantidad eficaz de apoecurina; (b) una cantidad eficaz de
vitamina D; y (c) un vehículo farmacéuticamente aceptable en donde: (a) la cantidad terapéuticamente eficaz de
apoecurina en la dosis unitaria es de aproximadamente 10 mg a aproximadamente 50 mg; y (b) la cantidad
terapéuticamente eficaz de vitamina D en la dosis unitaria es de aproximadamente 25 mcg a aproximadamente 75
10 mcg.
2. La composición de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la composición está en forma de una dosis unitaria
que contiene dichas cantidades efectivas de apoecurina y vitamina D.
- 15 3. La composición de acuerdo con la reivindicación 1, en donde: (a) la cantidad eficaz de apoecurina en la dosis
unitaria es de aproximadamente 20 mg; y (b) la cantidad eficaz de vitamina D en la dosis unitaria es de
aproximadamente 50 mcg.
- 20 4. La composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde la vitamina D está en forma
de colecalciferol D3.
5. La composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde la dosis unitaria es una
cápsula.
- 25 6. La composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde la composición es una
composición nutracéutica.

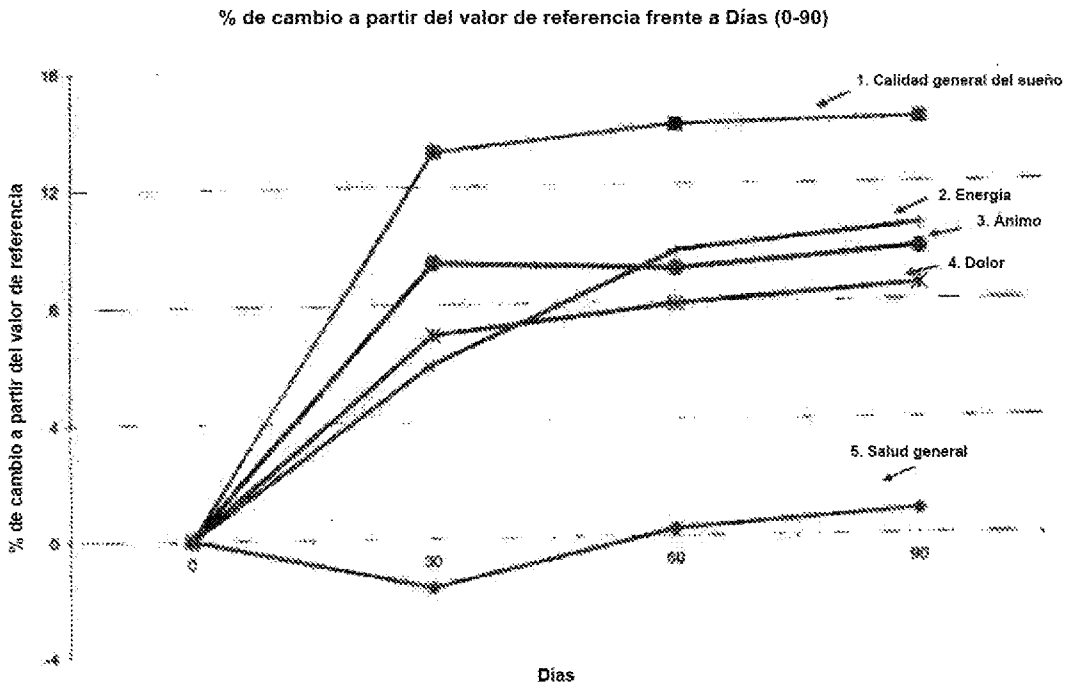


Fig. 1

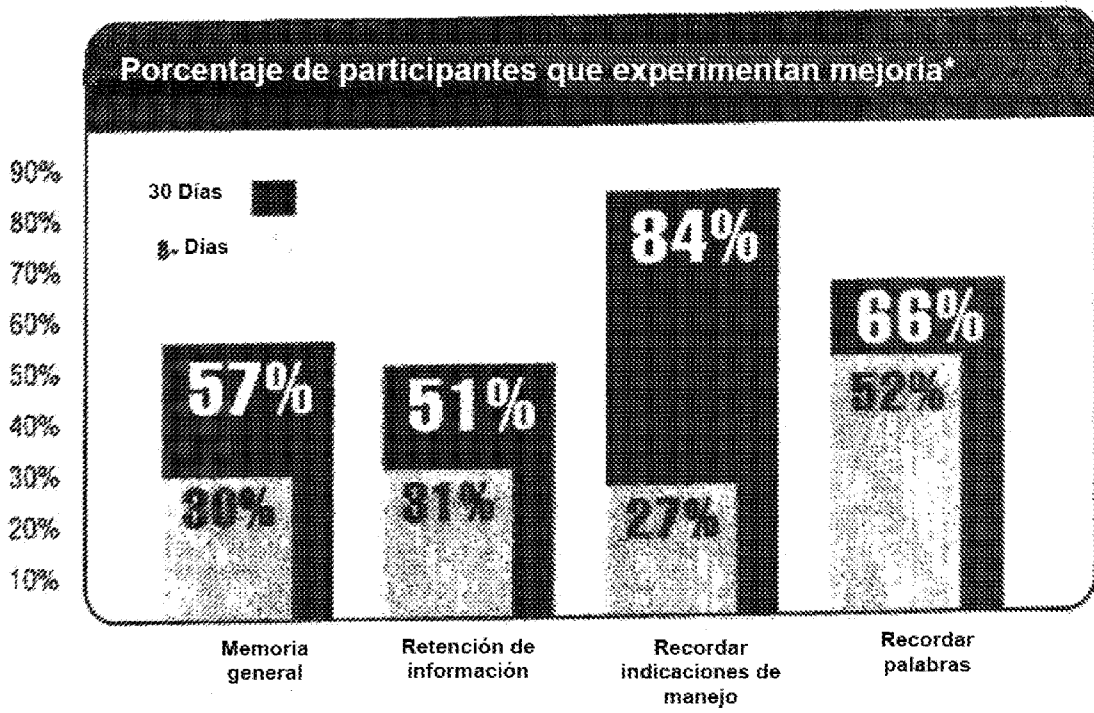


Fig. 2

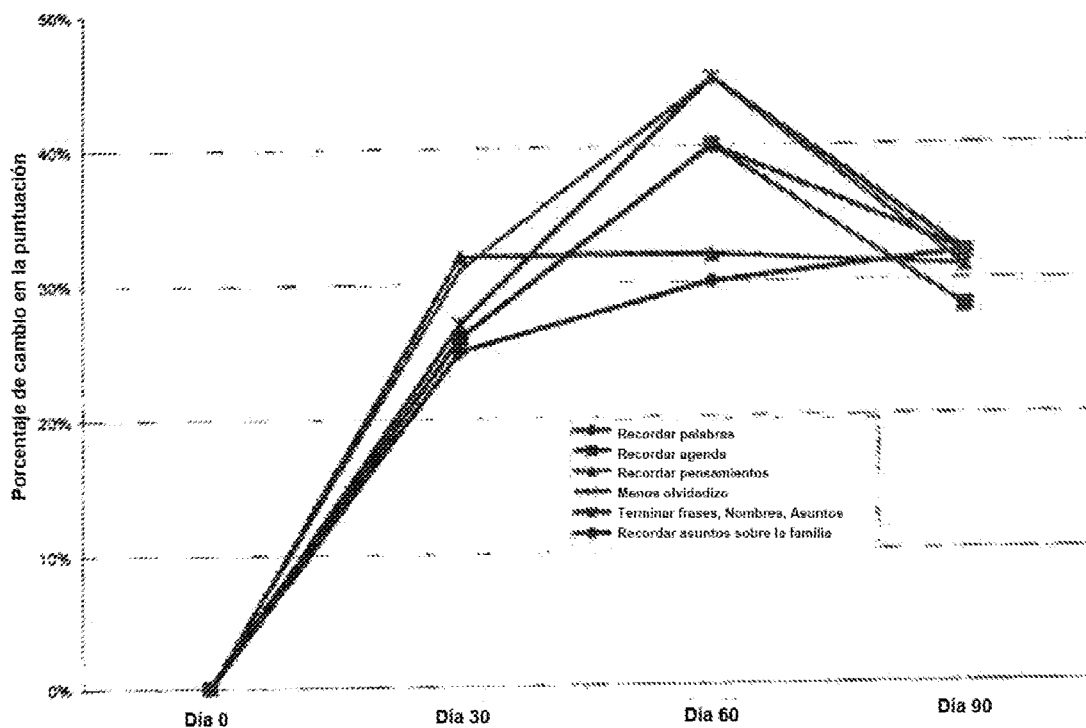
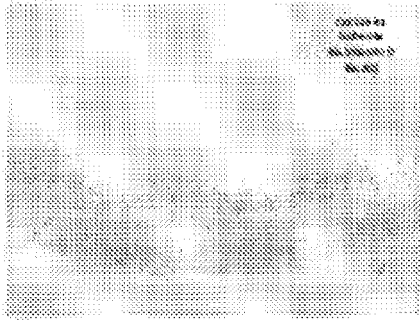


Fig. 3

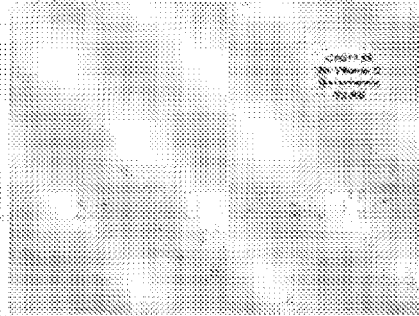
Isquemia/No AQ/No VitD

CWS19 R1



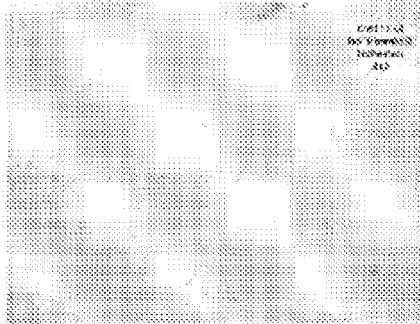
No isquemia/No AQ/No VitD

CWS19 R4



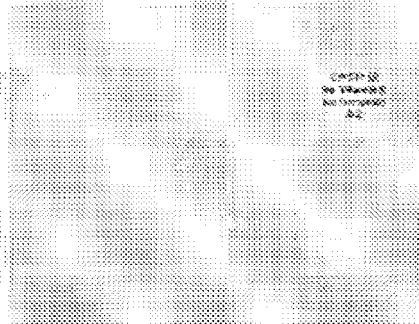
Isquemia/AQ/No VitD

CWS17 L4



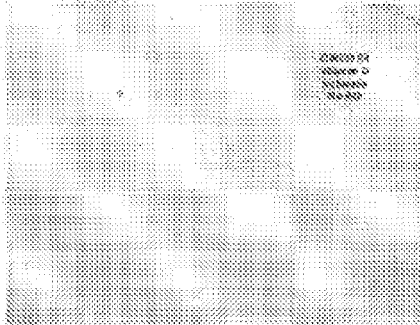
No isquemia/AQ/No VitD

CWS19 L2



Isquemia/No AQ/VitD

CWS10 R4



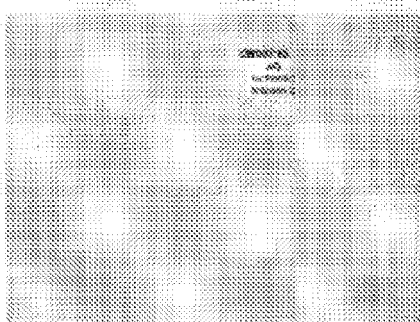
No isquemia/No AQ/VitD

CWS07 L4



Isquemia/AQ/VitD

CWS07 R5



No isquemia/AQ/VitD

CWS07 R4



Fig. 4