

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 972 199**

51 Int. Cl.:

A61K 31/4045 (2006.01)

A61K 9/14 (2006.01)

A61K 47/02 (2006.01)

A61K 47/40 (2006.01)

A61P 43/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.03.2018 PCT/EP2018/056423**

87 Fecha y número de publicación internacional: **20.09.2018 WO18167162**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.03.2018 E 18712537 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.02.2024 EP 3595655**

54 Título: **Dosis y régimen terapéutico para la melatonina**

30 Prioridad:

17.03.2017 EP 17161472

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

11.06.2024

73 Titular/es:

CHIESI FARMACEUTICI S.P.A. (100.0%)

Via Palermo, 26/A

43122 Parma, IT

72 Inventor/es:

FACCHINETTI, FABRIZIO;

AQUINO, GIANCARLO y

ROBERTSON, NICOLA JAYNE

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 972 199 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

Dosis y régimen terapéutico para la melatonina

5 Campo técnico

La presente invención se refiere a una dosis terapéutica y un régimen para la administración parenteral de formulaciones basadas en melatonina a neonatos afectados por una enfermedad cerebral debido a asfixia al nacer.

10 Antecedentes de la invención

Los neonatos, especialmente si nacen prematuramente, son muy susceptibles al daño oxidativo causado por los radicales libres. De hecho, los recién nacidos al nacer son: a) naturalmente expuestos a un desafío hiperóxico debido a la transición del entorno intrauterino hipóxico a la vida extrauterina, y esta brecha es aún más significativa para los neonatos que requieren oxígeno suplementario durante la reanimación en la sala de partos; b) son más susceptibles a infecciones, especialmente si nacen prematuramente; c) tienen defensas antioxidantes reducidas; d) poseen altos niveles de hierro libre que potencia la reacción de Fenton causando la producción de radicales altamente tóxicos. El estrés oxidativo probablemente también contribuye a la gravedad de varias enfermedades neonatales, ya que puede afectar a una variedad de órganos, a menudo de manera simultánea, dando lugar a diferentes signos de acuerdo con el órgano más dañado. Dichas enfermedades incluyen displasia broncopulmonar/enfermedad pulmonar crónica (BDP/CLD), retinopatía del prematuro (ROP) y enterocolitis necrotizante (NEC). Posteriormente, se hizo evidente que los radicales libres están involucrados en la lesión cerebral perinatal, así como en la influencia del conducto arterioso y la circulación pulmonar.

25 Para contrarrestar el daño de los radicales libres, se han propuesto muchas estrategias para aumentar las capacidades antioxidantes en recién nacidos a término y prematuros, y se han experimentado varios medicamentos con resultados contrastantes.

30 N-[2-(5-Metoxi-1H-indol-3-il)etil] acetamida, conocida como melatonina, es una sustancia endógena principalmente sintetizada en la glándula pineal a partir del neurotransmisor serotonina. La melatonina desempeña un papel clave en una variedad de funciones fisiológicas importantes, incluyendo la regulación de los ritmos circadianos, así como acciones visuales, reproductivas, cerebrovasculares, neuroendocrinas y neuroinmunológicas. La melatonina es un eliminador altamente efectivo de radicales libres que también mejora el potencial antioxidante de la célula al estimular la síntesis de enzimas antioxidantes y aumentar los niveles de glutatión. La melatonina también se conoce por contrarrestar el agotamiento energético celular al preservar la homeostasis mitocondrial y proteger la síntesis de ATP mitocondrial al estimular las actividades de los complejos I y IV. Además, se ha demostrado que la melatonina atenúa la activación microglial y las respuestas neuroinflamatorias que suelen estar asociadas con lesiones hipóxico-isquémicas. Además de su eficacia neuroprotectora bien documentada (ver por ejemplo documento de Balduini W y otros J Matern Fetal Neonatal Med. 2012, 25(S1), 119-124), la melatonina es un fármaco interesante debido a su perfil de seguridad y su capacidad para atravesar todas las barreras fisiológicas y llegar a los compartimentos subcelulares.

45 A la luz de estas propiedades, durante la última década, la melatonina ha comenzado a ser considerada un atractivo agente neuroprotector en la asfixia perinatal.

50 Por otro lado, la biodisponibilidad oral de la melatonina es baja y muy variable. Además, la melatonina es poco soluble en agua y se degrada rápidamente. En el estado de la técnica, se informaron evidencias que indican que la melatonina en solución acuosa pierde gradualmente su potencia en todos los valores de pH y no es estable cuando se expone a la luz u oxígeno. En este sentido, también es bien sabido que algunos estabilizadores y/o conservantes pueden tener el potencial de causar problemas toxicológicos, especialmente en la población infantil.

Además, el perfil farmacocinético de la melatonina en los lactantes difiere del de los adultos; por lo tanto, la dosificación de melatonina para lactantes a término o prematuros no puede extrapolarse de estudios en adultos.

55 Los documentos WO 2012/156565, WO 2013/068565 y WO 2015/135997 describen diferentes formulaciones inyectables que comprenden melatonina para su uso en el tratamiento de lesiones cerebrales neonatales. Sin embargo, en lo que respecta a la dosis terapéutica y el régimen adecuados, solo se proporcionan indicaciones genéricas. El documento WO 2015/13997 describe dosis de 1-40 mg/Kg de melatonina, preferiblemente administradas durante una ventana de seis horas.

60 El documento WO 2016/139635 describe un producto farmacéutico adecuado para la administración parenteral en donde la melatonina tiene una concentración de 0,2-0,4 mg/ml, pero no se informa la dosis a usar para el tratamiento de lesiones cerebrales neonatales.

65 Robertson N y otros (Brain 136(1), 2013, 90-105) han demostrado que la melatonina administrada por vía intravenosa a lechones recién nacidos aumenta la neuroprotección hipotérmica a una dosis diaria de 5 mg/kg/h

durante seis horas (30 mg/kg). Sin embargo, la formulación utilizada en este estudio no es adecuada para la administración en neonatos humanos.

5 Además, dicha formulación se administró a los 10 minutos después de la reanimación, un tiempo de intervención que no tiene una aplicación concreta en la práctica clínica debido al tiempo requerido para el manejo de los neonatos en las salas de parto y/o en las Unidades de Cuidados Intensivos Neonatales (UCIN).

10 Otros ensayos iniciados por investigadores están en curso. Por ejemplo, Jerez-Calero A y otros en el documento J Ped Neonatal Individ Med 6(1), 2017 describen la administración intravenosa de melatonina a una dosis de 5 mg/kg cada 24 horas (3 dosis) antes de las primeras 6 horas de vida, pero no menciona la importancia de la velocidad de administración.

15 Por otro lado, el solicitante encontró que la formulación debe administrarse no solo en un plazo máximo de seis horas desde la reanimación, sino que también es muy importante la velocidad de administración.

A la luz de estas desventajas del estado de la técnica, sería altamente ventajoso proporcionar un régimen terapéutico eficaz para la administración parenteral de melatonina a neonatos afectados por un trastorno cerebral.

20 El problema de una administración parenteral segura y efectiva de dosis terapéuticas de melatonina a neonatos se resuelve mediante la presente invención.

Resumen de la invención

25 En un primer aspecto, la invención se refiere a una formulación farmacéutica segura de melatonina para su uso en el tratamiento de lesiones cerebrales causadas por asfixia al nacer en un recién nacido, en donde dicha formulación se administra mediante infusión parenteral a una dosis diaria de 10 a 20 mg/kg, caracterizada porque la administración se inicia no antes de 45 minutos pero no después de 4 horas, más preferiblemente entre 1 hora y 2 horas, desde la reanimación de dicho recién nacido y el período de tiempo para la infusión comprende entre 30 minutos y 4 horas.

30 En una modalidad preferida, la formulación farmacéutica segura es una formulación lista para usar que comprende melatonina disuelta en un vehículo acuoso adecuado o es un polvo de melatonina que se debe reconstituir con el mismo o un vehículo acuoso adecuado diferente.

35 También se describe un paquete que comprende una formulación farmacéutica segura de melatonina en forma de solución acuosa lista para usar o en polvo para reconstituir en un vehículo acuoso adecuado, en combinación con instrucciones para administrar parenteralmente mediante infusión dicha formulación farmacéutica a un neonato afectado por un trastorno cerebral debido a asfixia al nacer, a una dosis diaria de 10 a 20 mg/kg, caracterizado porque la administración se inicia no antes de 30 minutos pero no después de 6 horas, preferiblemente comprendido entre 45 minutos y 4 horas, más preferiblemente entre 1 hora y 2 horas, desde la reanimación de dicho neonato y el período de tiempo para la infusión no es superior a 6 horas.

40 También se describe una formulación farmacéutica segura de melatonina para su uso en el tratamiento de lesiones cerebrales causadas por asfixia al nacer en un recién nacido, en donde dicha formulación se administra por infusión parenteral a una dosis diaria de 10 a 20 mg/kg, durante 1 a 30 días, caracterizada porque la primera administración se inicia no antes de 30 minutos pero no después de 6 horas desde la reanimación del recién nacido y el período de tiempo para la infusión de cada administración no es superior a 6 horas.

Definiciones

50 Con referencia a la melatonina, los términos "medicamento", "principio activo" y "sustancia activa" se usan indistintamente.

Los términos "neonatos", "recién nacidos" y "infantes" se usan indistintamente.

55 Con el término "reanimación neonatal" se hace referencia al proceso realizado en las Unidades de Cuidados Intensivos Neonatales (UCIN) o en la sala de partos para contrarrestar los signos de asfixia al nacer.

60 El término "seguro" se refiere a una formulación farmacéutica adecuada para la inyección, capaz de cumplir con los criterios de inyectabilidad para productos medicinales, bien tolerada por neonatos y libre de excipientes que puedan ser perjudiciales, antigénicos o tóxicos para esta población de pacientes.

65 Para una formulación lista para usar, la expresión "físicamente estable" se refiere a una formulación que, bajo condiciones aceleradas (40 °C ± 2 °C, 75 % ± 5 % de humedad relativa), no muestra un crecimiento sustancial en el tamaño de partícula durante el almacenamiento durante al menos tres meses, preferiblemente seis meses, es fácilmente redispersible y, al redispersarse, no se observan aglomerados ni separación rápida del vehículo acuoso que impidan la reproducción de la dosificación del principio activo.

La expresión "químicamente estable" se refiere a una formulación que, durante el almacenamiento, cumple con los requisitos de la Guía EMEA CPMP/QWP/122/02 que se refiere a "Pruebas de estabilidad de sustancias activas existentes y productos terminados relacionados".

5 El término "cantidad terapéuticamente efectiva" se refiere a la cantidad del principio activo que, cuando se administra a neonatos, produce el efecto biológico deseado.

El término "profilaxis" se refiere al uso terapéutico para reducir la aparición de una enfermedad.

10 El término "tratamiento" se refiere al uso terapéutico para el alivio paliativo, la curación, la reducción de síntomas, la reducción de síntomas, y la terapia inductora de regresión de enfermedades.

Figuras

15 Figura 1 - Línea de tiempo del estudio. Después de la adquisición de datos iniciales, los lechones se sometieron a hipoxia-isquemia cerebral. Al final de la hipoxia-isquemia, los lechones se asignaron al azar a: (i) Vehículo (a las 2 h e infundido durante 6 h) más enfriamiento a 33,5 °C durante 24 h a partir de las 2 h; (ii) Melatonina 5 mg/kg a las 2 h y 26 h e infundido durante 6 h y enfriamiento; (iii) Melatonina 15 mg/kg a las 2 h y 26 h e infundido durante 6 h y enfriamiento. Los lechones fueron mantenidos bajo cuidado intensivo durante 48 h después de la hipoxia-isquemia antes de la eutanasia. Se adquirió MRS al inicio, durante la hipoxia-isquemia, durante los primeros 60 minutos después de la hipoxia-isquemia a las 24 y 48 h. Se adquirió un EEG al inicio y entre las adquisiciones de MRS.

20 Figura 2 - Los dos niveles cerebrales A y B y 3 campos por región para la cuantificación de TUNEL. Los cuadrados de línea delgada son aquellas regiones muestreadas con voxels de MRS, mientras que los cuadrados de línea gruesa son regiones cerebrales no muestreadas dentro de los voxels de MRS.

Figuras 3

30 La Figura 3A muestra la espectroscopia de resonancia magnética de 9,4 T del cerebro al inicio, a las 24 y 48 h después de la hipoxia-isquemia. Mínimos cuadrados significa gráficos con barras de error SEM para NTP/epp y PCr/Pi en todo el cerebro anterior y Lac/NAA en el tálamo y la materia blanca. No hubo diferencia aparte de un aumento de 24 h en NTP/epp en el grupo de Melatonina de 15 mg/kg ($p=0,038$).

35 La Figura 3B muestra la espectroscopia de resonancia magnética 3T del cerebro a las 24 y 48 h después de la hipoxia-isquemia. Barras de error SEM para NTP/epp y PCr/Pi en todo el cerebro anterior y Lac/NAA en el tálamo y la materia blanca; las barras no superpuestas muestran evidencia de una diferencia significativa. No hubo diferencia en ninguna proporción a las 24 y 48 h.

40 Figura 4 - Recuentos medios de TUNEL para vehículo, 5 mg/kg durante 6 h Melatonina y 15 mg/kg durante 6 h. (A) En todas las regiones cerebrales. Hay una tendencia hacia una reducción de células TUNEL positivas en el grupo de melatonina de alta dosis ($p=0,069$). (B) A través de regiones cerebrales individuales. Hubo una reducción significativa en las células positivas para TUNEL en el grupo de alta dosis de melatonina en comparación con el vehículo en la corteza sensoriomotora ($p=0,003$). (C-E) Secciones representativas TUNEL del córtex sensoriomotor tomadas a un aumento de x20.

45 Figura 5 - EEG integrado por amplitud (aEEG). No hubo diferencia en las puntuaciones medias de aEEG por hora en ningún grupo en ningún momento.

50 Figura 6 - Perfiles medios de plasma del estudio histórico del cerebro (líneas punteadas y triángulos - línea), melatonina de baja dosis (cuadrados - línea) y melatonina de alta dosis (rombos - línea). El PK modelado para 18 mg/kg durante 2 h se muestra mediante la línea gris claro.

55 Figura 7 - Estudios de eficacia de neuroprotección comparando la neuroprotección hipotérmica versus la neuroprotección con melatonina en HI pura y en HI sensibilizada por inflamación. Los puntos finales principales para los estudios de eficacia son (i) el aumento de Lac/NAA cerebral durante las 48 h después de la HI y (ii) las células positivas para TUNEL en 11 regiones cerebrales. La dosis de melatonina comprende entre 15 y 18 mg/kg y el tiempo de infusión entre 2 y 3 horas.

Descripción detallada de la invención

60 Gracias a su actividad antioxidante y a sus otras propiedades farmacológicas, la melatonina podría ser usada con éxito en la profilaxis y/o tratamiento de ciertas enfermedades neonatales.

65 Sin embargo, la formulación debe administrarse dentro de un tiempo adecuado desde la reanimación, de lo contrario la eficacia de la melatonina disminuiría.

Además, se administrará a una velocidad de entrega adecuada de tal manera que el período de tiempo de la infusión no sea superior a 4 horas.

5 De hecho, se ha encontrado que, para lograr lo más rápido posible la concentración plasmática efectiva del principio activo, que el solicitante ha determinado que comprende entre 10 y 100 mM, la formulación debe administrarse a una velocidad de administración de tal manera que el período de infusión comprenda entre 30 minutos y 4 horas, preferiblemente entre 1 hora y 2 horas.

10 Por lo tanto, el objetivo de la presente invención es proporcionar un régimen terapéutico eficaz para la administración parenteral por infusión de una formulación farmacéutica a base de melatonina a neonatos afectados por un trastorno cerebral.

15 En una modalidad preferida de la invención, la formulación farmacéutica segura se administra mediante una bomba de infusión adecuada.

Ventajosamente, dicha formulación farmacéutica segura de melatonina se administrará a una dosis diaria de 10 a 20 mg/kg, más ventajosamente entre 12 y 18 mg/kg, preferiblemente de 15 mg/kg, comenzando no antes de 30 minutos, pero no después de 4 horas desde la reanimación del neonato.

20 La formulación segura comprendía melatonina disuelta en un vehículo acuoso.

Podría estar en forma de un polvo seco para disolver de forma extemporánea antes de su uso o en forma de una formulación lista para usar.

25 En caso de que se dispensa como polvo seco a redisolverse, puede prepararse de acuerdo a métodos conocidos por el experto en la técnica, tales como la liofilización, y puede ser como un kit que comprende a) la formulación farmacéutica liofilizada; b) un vehículo acuoso farmacéuticamente aceptable; c) medios de contenedor para contener la formulación farmacéutica y el vehículo acuoso.

30 Como producto liofilizado, la formulación puede contener agentes crioprotectores como el manitol.

La melatonina podría ser usada como base libre o en forma de cualquier sal aceptable farmacéuticamente y/o su solvato.

35 Ventajosamente, la concentración de melatonina deberá estar comprendida entre 1 y 10 mg/ml, más ventajosamente entre 2 y 8 mg/ml, preferiblemente entre 2,5 mg/ml y 5 mg/ml.

40 En una modalidad particular de la invención, la concentración de melatonina será de 5 mg/ml, mientras que en otra modalidad particular será de 2,5 mg/ml.

Dichas formulaciones, para ser seguras, deben contener excipientes farmacéuticamente aceptables y/o agentes solubilizantes adecuados para uso parenteral y seleccionados entre aquellos bien tolerados por neonatos.

45 Por ejemplo, la formulación puede contener propilenglicol o polietilenglicol (PEG) como cosolvente, según se informa en el documento WO 2012/156565.

50 Alternativamente, como agente solubilizante, la formulación puede contener sulfobutileter- β -ciclodextrina actualmente vendida bajo la marca comercial Captisol™ (Ligand Pharmaceuticals Inc, San Diego, California) o hidroxipropil- β -ciclodextrina vendida bajo la marca comercial Trappsol® Cyclo™ (CTD Holdings Inc, Alachua, Florida), preferiblemente sulfobutileter- β -ciclodextrina.

55 En algunas modalidades de la invención, la formulación puede contener como agente solubilizante, sulfobutileter- β -ciclodextrina en mezcla con PEG 300 o PEG 400 en proporciones que van desde 85:15 hasta 95:5 p/p, preferiblemente 90:10 p/p.

60 Se podría usar cualquier vehículo acuoso farmacéuticamente aceptable adecuado para la administración parenteral a neonatos, por ejemplo, agua para inyección (WFI). De lo contrario, se podría usar una solución acuosa salina (cloruro de sodio al 0,9 % p/v) o una solución de glucosa a una concentración adecuada que deberá ajustarse por el experto en la técnica. En algunas modalidades, una solución acuosa semisalina (0,45 % p/v de cloruro de sodio) podría ser preferible.

En otras modalidades, se podría usar ventajosamente una solución acuosa de glucosa con una concentración de 5 % o 10 % p/v.

65 La formulación farmacéutica segura puede comprender otros excipientes, por ejemplo, agentes de tonicidad y tampones de pH como los amortiguadores de acetato, fosfato o citrato, tris(hidroximetil)aminometano-HCl (Tris-HCl),

preferiblemente fosfato o Tris-HCl, más preferiblemente tampón fosfato.

Ventajosamente, el pH de la formulación farmacéutica puede estar comprendido entre 6,5 y 7,5, preferiblemente 7,0 ± 0,1.

5 Dado que la formulación farmacéutica segura debe ser adecuada para la administración parenteral, su osmoticidad es de particular importancia. En consecuencia, la formulación de la invención deberá tener una osmolaridad inferior a 600 mOsm/kg, ventajosamente de 150 mOsm/kg a 500 mOsm/kg, más ventajosamente de 200 a 400 mOsm/kg, preferiblemente de 250 a 350 mOsm/kg.

10 El experto en la técnica podría convertir fácilmente los valores de osmolaridad en valores de osmolaridad mediante la determinación de la densidad de la formulación.

15 Opcionalmente, la formulación anterior es estéril.

La esterilización se puede lograr de acuerdo con métodos conocidos. Por ejemplo, el polvo puede ser esterilizado mediante irradiación gamma, mientras que la formulación farmacéutica lista para usar puede ser esterilizada mediante filtración o tratamientos de autoclave.

20 En una modalidad preferida de la invención, la formulación comprende melatonina a una concentración de 2,5 o 5,0 mg/ml.

En una modalidad particular de la invención, la formulación segura tiene la siguiente composición:

25 5,0 mg/ml de melatonina, 50 mg/ml de Captisol™, 0,2 mg/ml de tampón fosfato (10 mM), opcionalmente 4,5 mg/ml de cloruro de sodio, agua para inyección.

En otra modalidad particular, la formulación segura tiene la siguiente composición:

30 2,5 mg/ml de melatonina, 25 mg/ml de Captisol™, 0,2 mg/ml de tampón fosfato (10 mM), opcionalmente 4,5 mg/ml de cloruro de sodio, agua para inyección.

35 Las formulaciones mencionadas anteriormente podrían ser llenadas en recipientes adecuados, por ejemplo, viales de vidrio de color ámbar, y son particularmente adecuadas para la administración de melatonina de acuerdo con el régimen terapéutico de la invención.

La capacidad de dichos viales puede variar de 2 a 10 ml, preferiblemente no superior a 6 ml.

40 Sin embargo, el experto en la técnica, dependiendo de la composición de la formulación segura, deberá elegir la concentración y la capacidad para administrarla en un período comprendido entre 30 minutos y cuatro horas, más preferiblemente entre 1 hora y dos horas.

45 Por ejemplo, si la dosis diaria a administrar es de 15 mg/kg, se llenará un vial de 6 ml con una concentración de melatonina de 2,5 mg/ml para ser administrado en un tiempo de 3 horas a una velocidad de entrega de 5 mg/kg/h.

Como ejemplo adicional, si la dosis diaria a administrar es de 20 mg/kg, se llenará un vial de 4 ml con una concentración de melatonina de 5 mg/ml para ser administrado en un tiempo de 2 horas a una velocidad de administración de 10 mg/kg/h.

50 Las formulaciones farmacéuticas de la invención se usan para la profilaxis y/o tratamiento de cualquier enfermedad del cerebro neonatal debido a la asfisia al nacer (perinatal).

55 Estas enfermedades incluyen ictus arterial perinatal (PAS), y leucomalacia periventricular (PVL), y encefalopatía hipóxico-isquémica (HIE), preferiblemente encefalopatía hipóxico-isquémica (HIE).

60 La encefalopatía hipóxico-isquémica es, de hecho, una de las principales causas de muerte neonatal y discapacidad neurológica en niños. La incidencia estimada de esta enfermedad es de aproximadamente 1-2/1000 recién nacidos a término y aumenta hasta un 60 % entre los recién nacidos prematuros que pesan menos de 1500 gramos. Un porcentaje comprendido entre el 20 % y el 50 % de los lactantes asfixiados que desarrollan una encefalopatía hipóxico-isquémica, desafortunadamente están destinados a morir en el período neonatal, mientras que aproximadamente el 25 % de los sobrevivientes presentan discapacidades neurológicas graves como parálisis cerebral, retraso mental, epilepsia y trastornos del aprendizaje.

65 El régimen terapéutico de la invención podría aplicarse tanto a neonatos a término como a neonatos prematuros con una edad gestacional igual o inferior a 37 semanas.

Cuando el régimen terapéutico de la invención está dirigido a proteger a los neonatos de daños neurológicos, la formulación segura puede administrarse solo durante 1 día.

5 En otra modalidad, cuando se dirige a restaurar una función neurológica, la administración de la formulación puede ser administrada repetidamente, por ejemplo, desde 1 hasta 30 días. En algunas modalidades, la formulación podría administrarse de 1 a 7 días, mientras que, en otra modalidad, de 1 a 14 días.

10 Dentro del límite del régimen terapéutico reivindicado, el médico ajustará la dosis y/o la duración del tratamiento en función de la edad gestacional y el peso del recién nacido, así como de la gravedad de la enfermedad, siempre y cuando la primera administración se inicie no antes de 45 minutos, pero no después de 4 horas desde la reanimación de dicho neonato y el período de tiempo para la infusión de cada administración no sea superior a horas.

15 Actualmente, la hipotermia se reconoce como una modalidad de tratamiento eficaz para la asfixia perinatal y la encefalopatía hipóxico-isquémica (HIE). Por lo tanto, la formulación segura de acuerdo con el régimen terapéutico de la invención podría aplicarse en combinación con hipotermia, lo que conduce a un mayor efecto neuroprotector cerebral que la hipotermia sola, mejorando así el resultado clínico inmediato y a largo plazo.

20 Dentro del límite del intervalo de dosis reivindicado, el médico ajustará la dosis y la frecuencia de administración en función de la edad gestacional y el peso del recién nacido, así como de la gravedad de la enfermedad.

La invención se ilustra con referencia a los siguientes ejemplos.

25 Ejemplo 1 - Determinación de las formulaciones

El primer conjunto de experimentos tuvo como objetivo evaluar la posibilidad de solubilizar melatonina con diferentes cantidades de sulfobutileter-β-ciclodextrina (Captisol™).

30 La prueba se realizó mediante la adición de melatonina. En la solución que contiene Captisol a diferentes concentraciones hasta la presencia de material no disuelto en el fondo; la solución fue filtrada y analizada.

Estas pruebas se realizaron con tres vehículos diferentes: agua para inyección (WFI), solución de glucosa al 10 % y tampón fosfato.

35 En un segundo conjunto de experimentos, se agregó PEG con diferentes pesos moleculares (PEG 300 y PEG 400) para verificar la posibilidad de reducir la cantidad de Captisol usada para la disolución.

40 Los resultados del primer conjunto de experimentos se obtuvieron midiendo el ensayo en la formulación en los límites de solubilidad más altos, teniendo en el fondo algunas partículas sin disolver. Estos datos se usaron para comprender la cantidad de Captisol necesaria para alcanzar una concentración de 5 mg/ml y evitar el efecto de borde. Se identificó una concentración de Captisol del 5 % como adecuada, y se confirmó por los otros resultados.

45 A partir de esta prueba preliminar, fue evidente que la presencia de glucosa o tampón como vehículo no influye en la solubilidad de la melatonina; al contrario, la presencia de glucosa o tampón contribuye a producir osmolalidad y esto debe tenerse en cuenta para definir una formulación con un valor adecuado de osmolalidad de la solución.

Con respecto a la adición de otros excipientes (segundo conjunto de experimentos), los resultados demuestran que es posible reducir la cantidad de Captisol, pero se requiere un 10 % de PEG.

50 Teniendo en cuenta el uso pediátrico de estas formulaciones, se decidió formular el producto con la menor cantidad posible de excipientes; por lo tanto, se omitió el PEG y se seleccionó la formulación solo con Captisol.

También se realizaron algunos ensayos para evaluar la posibilidad y oportunidad de agregar un tampón a la formulación.

55 En particular, se consideró importante entender cómo mantener el pH estable en el rango objetivo.

Se prepararon muestras con un tampón fosfato de 10 mM y diferentes cantidades de Captisol, como se informa en la Tabla 1.

60 Tabla 1 - Comparación de los resultados obtenidos durante el ensayo preliminar de solubilidad entre la solución con y sin tampón.

Vehículo	Captisol	pH	Osmolalidad	Densidad
Tampón fosfato 10 mM pH7	5 %	6,79	151 mOsmol/Kg	1,022 g/ml
Tampón fosfato 10 mM pH7	7,5 %	6,76	223 mOsmol/Kg	1,033 g/ml
Tampón fosfato 10 mM pH7	10 %	6,75	302 mOsmol/Kg	1,043 g/ml

65

Tampón fosfato 10 mM pH7	12,5 %	6,65	361 mOsmol/Kg	1,053 g/ml
Agua para inyección	5 %	6,67	129 mOsmol/Kg	1,021 g/ml
Agua para inyección	10 %	5,50	275 mOsmol/Kg	1,042 g/ml

5 Los resultados en la Tabla 4 indican que un tampón de 10 mM es adecuado para mantener el pH en el rango deseado.

Además, los valores de osmolalidad registrados indican la contribución al valor de osmolalidad de la formulación por el tampón fosfato (aproximadamente 20-30 mOsmol/Kg) y por la cantidad de Captisol usada. A la luz de estos resultados, se decidió usar una solución de tampón fosfato de 10 mM como vehículo.

Ejemplo 2 - Preparación de una formulación segura de acuerdo con la invención

15 La composición unitaria de la formulación 1 se describe en la Tabla 2.

Tabla 2 - Formulación segura adecuada para uso clínico

Ingrediente	%	Conc
Melatonina	0,5	5,0 mg/ml
Captisol	5,0	50 mg/ml
Na ₂ HPO ₄ heptahidratado	0,058	0,58 mg/ml
NaH ₂ PO ₄ monohidratado	0,155	1,55 mg/ml
Agua para inyección q.s. a 100 ml		

25 El pH resultó ser 7,0 ± 0,3.

La osmolalidad resultó ser de aproximadamente 150 mOsm/Kg.

Ejemplo 3 - Estabilidad de la formulación del Ejemplo 1

30 Una formulación preparada según el ejemplo 1 se almacenó durante seis meses bajo condiciones aceleradas, es decir, a 40 ° ± 2 C y 75 ± 2 % de humedad relativa, con el fin de evaluar su estabilidad física y química.

35 El ensayo de melatonina y sus sustancias relacionadas e impurezas se realizó mediante HPLC. También se probaron los siguientes parámetros: pH y apariencia.

Los resultados se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3 - Estabilidad de la formulación de acuerdo con el Ejemplo 2

Formulación del Ejemplo 2	pH	Ensayo (mg/ml)	Sustancias Relacionadas (%)	Impurezas Totales (%)	% vs INICIAL	Apariencia
Inicial (t = 0)	6,75	5,41	0,02	0,07	100	Transparente e incolora
t = 1 mes	6,76	5,22	0,03	0,07	96	Transparente e incolora
t = 2 meses	6,9	5,14	0,02	0,07	95	Transparente e incolora
t = 3 meses	6,9	5,30	0,02	0,06	98	Transparente e incolora
t = 6 meses	6,8	5,31	0,02	0,08	98	Transparente e incolora

50 Los resultados reportados en la Tabla 3 muestran que no se puede observar ninguna degradación apreciable después de al menos 6 meses cuando la formulación se almacenó en condiciones aceleradas. La variación del ensayo estaba dentro de ± 5 %.

La formulación también resultó ser físicamente estable.

55 Ejemplo 4: Administración intravenosa de la formulación de melatonina del Ejemplo 2 a una dosis de 15 mg/kg después de 2 horas desde la hipoxia-isquemia transitoria.

60 **Objetivo:** Para evaluar la neuroprotección de la melatonina intravenosa (15 mg/kg) infundida lentamente durante 6 h (2,5 mg/kg/h), iniciada 2 h después de la hipoxia-isquemia en un modelo de lechón de asfixia neonatal (Figura 1). Las medidas de resultado primarias fueron la inmunotinción TUNEL de la muerte celular en 9 regiones cerebrales (Figura 2). Los resultados secundarios fueron la recuperación del electroencefalograma integrado por amplitud (aEEG) y los biomarcadores de espectroscopía de resonancia magnética (MRS) (NTP/epp y lactato/N-acetil aspartato).

65 **Diseño/Métodos:** como se muestra en la Figura 1, se asignaron al azar 26 lechones después de la hipoxia isquemia al grupo de vehículo (n=13) y al grupo de melatonina (infusión de 6 h a las 2 h y 26 h después de la lesión, n=13).

Ambos grupos se enfriaron (33,5 °C 2-26 h). Se indujo hipoxia-isquemia dentro del escáner de resonancia magnética al inflar de forma remota los ocluidores vasculares alrededor de ambas arterias carótidas comunes, y al mismo tiempo reducir FiO₂ a 6 % (vol/vol) (documento de Robertson y otros, Brain 2103). Durante la hipoxia-isquemia, la altura del pico β -NTP se monitorizó continuamente usando el software Matlab (Mathworks) desarrollado internamente. En el momento en que β -NTP había caído al 50 % de su valor inicial, se aumentó la FiO₂ al 9 %.

5 Cuando el β -NTP cayó al 40 % de la altura inicial, se tituló la fracción de oxígeno inspirado para mantener la altura máxima del β -NTP entre el 30 % y el 40 % de su altura original durante un período de 12,5 minutos. Al final de la hipoxia-isquemia, se desocuyeron las arterias carótidas y la FiO₂ volvió al 21 %. Se calculó la gravedad de las lesiones. Se mantuvo la anestesia, el soporte de cuidados intensivos, el monitoreo aEEG y fisiológico durante 48 h,

10 cuando se evaluó la muerte celular (tinción TUNEL para células apoptóticas) en 9 regiones cerebrales. Resonancia magnética: Se adquirieron espectros de ¹H MRS y ³¹P MRS a las 24 y 48 h. La cabeza fue inmovilizada en un marco estereotáctico para la adquisición de MRS. Los lechones fueron posicionados dentro del orificio del escáner de resonancia magnética Agilent de 9,4 Tesla. Se adquirieron datos de MRS de ¹H y ³¹P al inicio (para todos los lechones n=30) y a las 24 h (vehículo n=11, 5 mg/kg Mel-N n=4, 15 mg/kg Mel-N n=13) y 48 h (vehículo n=8, 5

15 mg/kg Mel-N n=4, 15 mg/kg Mel-N n=12) después de la hipoxia-isquemia cerebral. Después de la preparación quirúrgica, se adquirió monitorización de EEG de seis canales (Nicolet, Care Fusion, Wisconsin, EE. UU.) al inicio y durante los períodos entre las adquisiciones de datos de MRS. Las grabaciones de EEG integrado por amplitud filtradas se clasificaron de acuerdo con la clasificación de patrones. Una puntuación de 0 fue un trazado plano; 1, voltaje bajo continuo; 2, supresión de ráfagas; 3, voltaje normal discontinuo; y 4, voltaje normal continuo, al inicio y

20 luego cada hora después de la hipoxia-isquemia. Se tomaron muestras de sangre al inicio, antes de la infusión, a las 1, 3, 6, 12, 18, 24, 25, 27, 30, 36, 42 y 48 h después de la hipoxia-isquemia. Se tomó una muestra de CSF a las 48 h. Se recolectaron muestras de sangre en tubos de litio/heparina y se centrifugaron inmediatamente después de la recolección. El plasma se separó y luego se almacenó a -20 °C antes del análisis. La melatonina se medía rutinariamente mediante radioinmunoensayo directo. Los lechones se sacrificaron a las 48 h.

25 Resultados: A las 24 h después de la lesión, la melatonina mejoró la disminución de NTP/ePP inducida por la lesión hipóxico-isquémica en comparación con el vehículo (p=0,038). La tasa de recuperación de aEEG fue similar entre los grupos (Figura 3).

30 El tratamiento con melatonina comenzó 2 h después de la hipoxia-isquemia, redujo la muerte celular en la corteza sensoriomotora (p<0,003) en comparación con el vehículo (Figura 4). Hubo una tendencia de reducción de la muerte celular en todo el cerebro (p=0,068) en el grupo tratado con melatonina (Figura 4). No hubo diferencia en las puntuaciones medias de aEEG por hora entre los grupos en ningún momento (Figura 5). Los lechones tratados con melatonina mostraron niveles plasmáticos dentro del rango terapéutico esperado (documento de Robertson N y

35 otros, Brain 136(1), 2013, 90-105). La dosis de melatonina y el tipo de formulación utilizados en este estudio no afectaron los parámetros fisiológicos monitoreados, incluyendo la presión arterial media y el uso de inotrópicos.

40 Conclusión(es): La protección cerebral de la melatonina después de la hipoxia-isquemia en el lechón recién nacido depende de la dosis y el momento de administración; no se observó protección con 5 mg/kg/24 h de melatonina, se observó una tendencia a una reducción general de células TUNEL positivas con 15 mg/kg/24 h y se observó una protección significativa en la corteza sensoriomotora. En lechones recién nacidos sometidos a hipoxia-isquemia, la infusión intravenosa de una dosis alta (15 mg/kg) de la formulación de melatonina de acuerdo con el Ejemplo 1 es bien tolerada y aumenta la neuroprotección hipotérmica en la corteza sensoriomotora cuando se inicia 2 h después de la lesión.

45 Discusión: La protección cerebral de la melatonina después de la hipoxia-isquemia en el lechón recién nacido dependió de la dosis y el momento de administración; con la melatonina administrada a las 2 h después de la hipoxia-isquemia durante un período de 6 h, no se observó protección con 5 mg/kg/24 h de melatonina y se observó una tendencia a la reducción general de células positivas al TUNEL en el cerebro con 15 mg/kg/24 h. Se observó una protección cerebral significativa solo en la corteza sensoriomotora con 15 mg/kg/24 h de Mel-N administrados a las 2 h. Es importante destacar que la C_{máx} con 15 mg/kg de Mel-N comenzó a las 2 h y se alcanzó a las 8 h después de la hipoxia-isquemia. Es probable que se necesite una administración más temprana y rápida de melatonina para alcanzar más rápidamente la concentración neuroprotectora supuesta de melatonina en plasma y lograr una mejor protección cerebral después de la hipoxia-isquemia. Como ejemplo en la Figura 6 (línea naranja), la modelación farmacocinética ha demostrado que una dosis de 18 mg/kg durante 2 h, iniciada a la 1 h, repetida cada

50 24 h, daría lugar a una C_{máx} a las 3 h, es decir. 5 h antes de lo observado en el estudio descrito en este Ejemplo.

55 Ejemplo 5: Un estudio de neuroprotección en lechones hipóxico-isquémicos puros y sensibilizados con LPS usando la formulación del Ejemplo 2.

60 La inflamación/infección materna sola o en combinación con asfixia al nacer aumenta el riesgo de lesiones cerebrales perinatales y la hipotermia no es neuroprotectora después de una lesión cerebral hipóxico-isquémica neonatal sensibilizada por infección (documento de Osredkar D y otros, Resuscitation. abril de 2014; 85(4):567-72). Planteamos la hipótesis de que la melatonina tiene una mejor neuroprotección que la hipotermia en HI sensibilizados con LPS debido a sus beneficiosos efectos inmunomoduladores. Proponemos usar el lipopolisacárido de E. Coli para inducir una respuesta inflamatoria sistémica; esta endotoxina se ha usado previamente en modelos

experimentales (documento de Wang X y otros, Ann Neurol. 2007; 61(3):263-71).

5 La hipoxia-isquemia será inducida mediante la inflación remota de los oclusores vasculares alrededor de ambas arterias carótidas comunes, y simultáneamente reduciendo la FiO₂ a 6 % v/v (documento de Robertson N y otros, Brain. enero de 2013; 136(Pt 1):90-105).

10 Durante la hipoxia-isquemia, la altura del pico β-NTP se monitorizará continuamente mediante resonancia magnética para garantizar la consistencia en la entrega de la lesión. El grupo de tratamientos se muestra en la Figura 1. La modelación farmacocinética ha demostrado que una dosis de 15-18 mg/kg durante 2-3 h, iniciada a 1 h después de la reanimación, repetida cada 24 h, daría lugar a un C_{máx} a las 3 h, 4-5 h antes que el estudio reportado en el ejemplo 3. Esto permitiría una ventana de tiempo de 1 hora para comenzar la intervención, lo cual es compatible con la práctica clínica.

15 La eficacia neuroprotectora de la melatonina se evalúa mediante: Se adquirirán imágenes de resonancia magnética (MRI) y espectroscopia de resonancia magnética (MRS) a las 2, 24 y 48 h después de la lesión cerebral (HI) (lactato/NAA por 1H MRS, nuestro principal biomarcador). El EEG continuo y el EEG integrado por amplitud (aEEG), que es altamente predictivo del resultado en bebés con NE, se adquiere entre los estudios de imágenes de resonancia magnética a las 24 y 48 h.

20 A las 48 h se termina el experimento. El cerebro se fija por perfusión para inmunohistoquímica (TUNEL y/o caspasa 3 fragmentada y/o IBA-1) y se cuantifican áreas discretas del cerebro para evaluar la neuroprotección, así como los efectos moduladores contra la neuroinflamación.

25 Se miden los niveles de PK de melatonina en plasma a las 1, 2, 4, 6, 12, 18, 24, 36 y 48 h después de la HI.

30 Evaluación de los efectos inmunomoduladores de la melatonina: mediante la medición de las concentraciones plasmáticas de mediadores proinflamatorios (por ejemplo, IL-1α, IL-1β, IL-5, IL-6; TNF-α, IFNγ). Efecto de la infusión de LPS E Coli en parámetros fisiológicos, MRS, MRI, EEG, NIRS, marcadores genéticos y bioquímicos sanguíneos se establecen.

El esquema del estudio de protocolo se muestra en la Figura 7.

Ejemplo 6: Determinación in vitro de las concentraciones neuroprotectoras de melatonina

35 Los estudios de concentración-respuesta tenían como objetivo detectar el rango de concentración de melatonina que resulta en neuroprotección contra la privación de oxígeno-glucosa (OGD), un modelo experimental que simula la hipoxia-isquemia y la reperfusión. La isquemia se simuló in vitro mediante anoxia combinada con un medio sin glucosa (OGD) en cultivos de rodajas de hipocampo organotípicas de rata. La muerte celular, estimada por la incorporación de yoduro de propidio, inducida por OGD fue del 90,8 ± 7,6 % y se redujo a 64,3 ± 85,1 %, 57,6 ± 6,9 %
40 %, 60,9 ± 7,4 %, 47,3 ± 3,8 % y 38,9 ± 4,2 %, después del tratamiento con 1, 3, 10, 25 y 50 μM de melatonina, respectivamente. El análisis estadístico mostró un efecto significativo de la melatonina en todas las dosis probadas (p<0,01 prueba de Dunnet después del ANOVA), con la excepción de 1 μM.

45 Estos resultados demuestran que la melatonina reduce la muerte celular inducida por OGD en cultivos de rodajas de hipocampo de ratas neonatales de manera dependiente de la concentración. Estudios de farmacocinética realizados en lechones neonatales (ver Ejemplo 4) mostraron que la infusión de 15 mg/Kg de la formulación de melatonina del Ejemplo 2 resultó en un rango de concentración plasmática de melatonina comprendido entre 16 y 4 mg/l (69-17 μM), lo cual sería neuroprotector en OGD. Así, la infusión intravenosa de melatonina a 15 mg/kg permite alcanzar una concentración plasmática sostenida y estable de melatonina que podría contrarrestar la lesión cerebral inducida
50 por la hipoxia-isquemia neonatal.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una formulación farmacéutica segura que comprende melatonina disuelta en un vehículo acuoso para su uso en el tratamiento de lesiones cerebrales causadas por asfixia al nacer en un neonato, en donde dicha formulación se administra mediante infusión parenteral a una dosis diaria de 10 a 20 mg/kg, caracterizada porque la administración se inicia no antes de 45 minutos pero no después de 4 horas desde la reanimación del neonato y el período de tiempo para la infusión comprende entre 30 minutos y 4 horas.
- 10 2. La formulación farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el trastorno se selecciona del grupo que consiste en ictus arterial perinatal (PAS), y leucomalacia periventricular (PVL) y encefalopatía hipóxico-isquémica (HIE).
- 15 3. La formulación farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 2, en donde el trastorno es encefalopatía hipóxico-isquémica (HIE).
- 20 4. La formulación farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 3, en donde la administración se inicia no antes de 1 hora, pero no después de 2 horas.
- 25 5. La formulación farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el período de tiempo para la infusión comprende entre 1 hora y 2 horas.
- 30 6. La formulación farmacéutica para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que está en forma de un polvo seco para disolver de forma extemporánea antes de su uso o en forma de formulación lista para usar.
- 35 7. La formulación farmacéutica para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la concentración de melatonina comprende entre 1 y 10 mg/ml.
- 40 8. La formulación farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 7, en donde la concentración de melatonina comprende entre 2,5 y 5,0 mg/ml.
- 45 9. La formulación farmacéutica para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el pH comprende entre 6,5 y 7,5.
10. La formulación farmacéutica para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la osmolalidad comprende entre 250 y 350 mOsm/kg.
11. La formulación farmacéutica para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores que comprende sulfobutileter-β-ciclodextrina como agente solubilizante.
12. La formulación farmacéutica para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende 2,5 o 5,0 mg/ml de melatonina, 25 o 50 mg/ml de sulfobutileter-β-ciclodextrina, 0,2 mg/ml de tampón fosfato, opcionalmente 4,5 mg/ml de cloruro de sodio y agua para inyección.

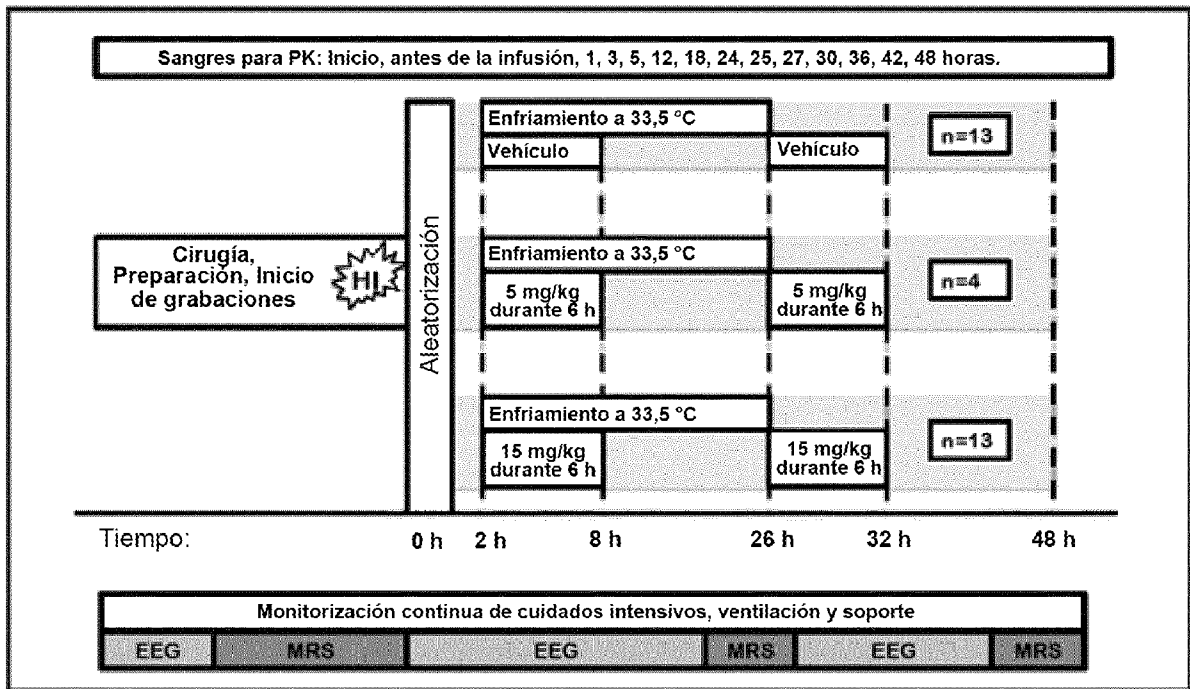


Figura 1

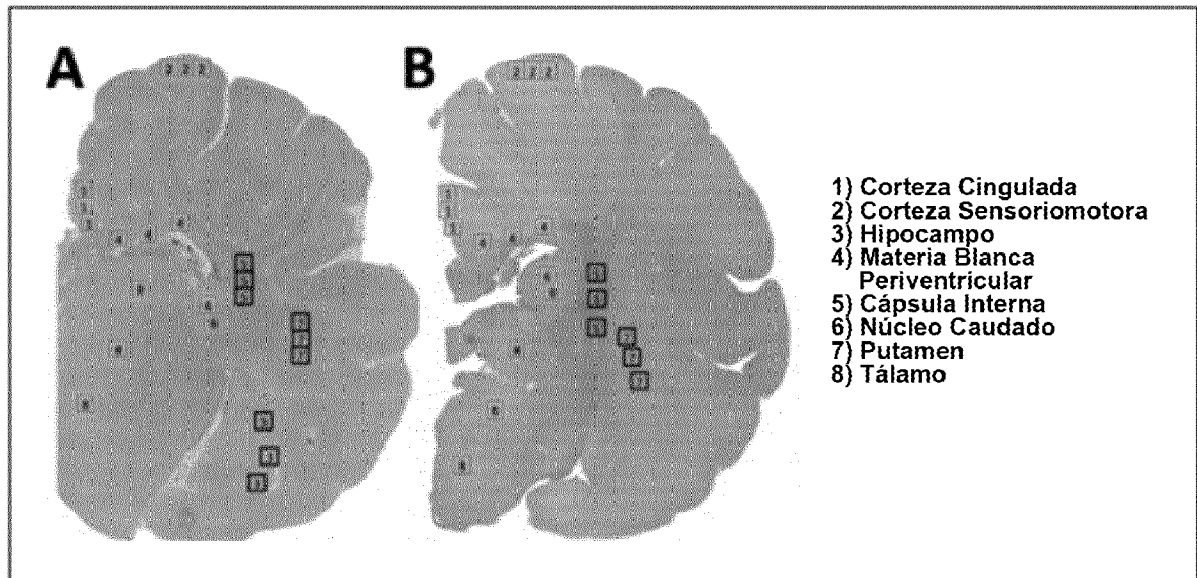


Figura 2

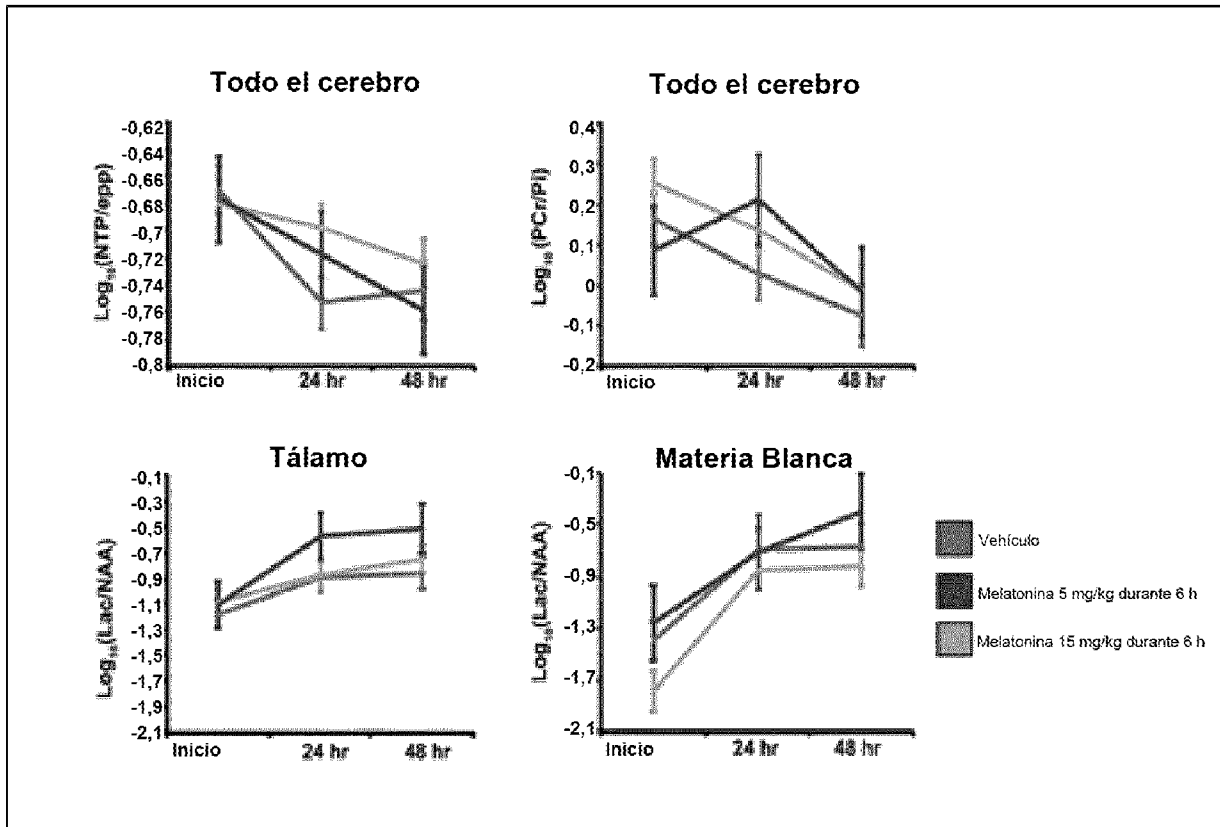


Figura 3A

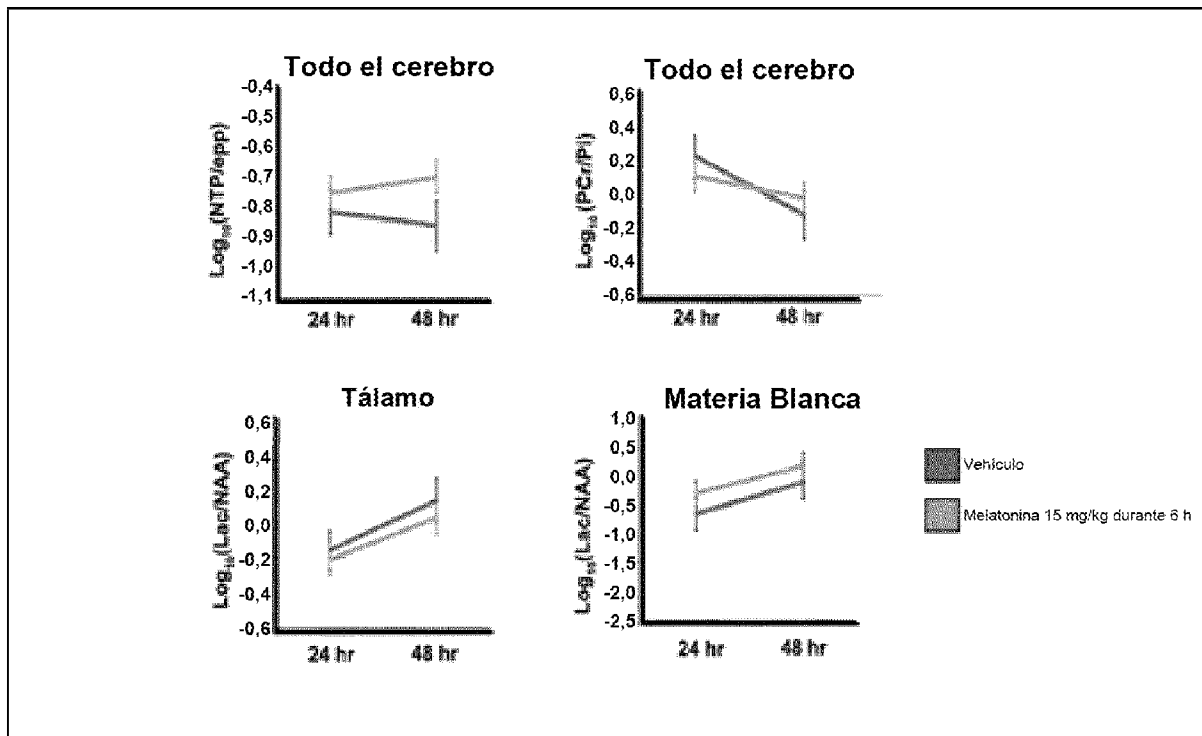


Figura 3B

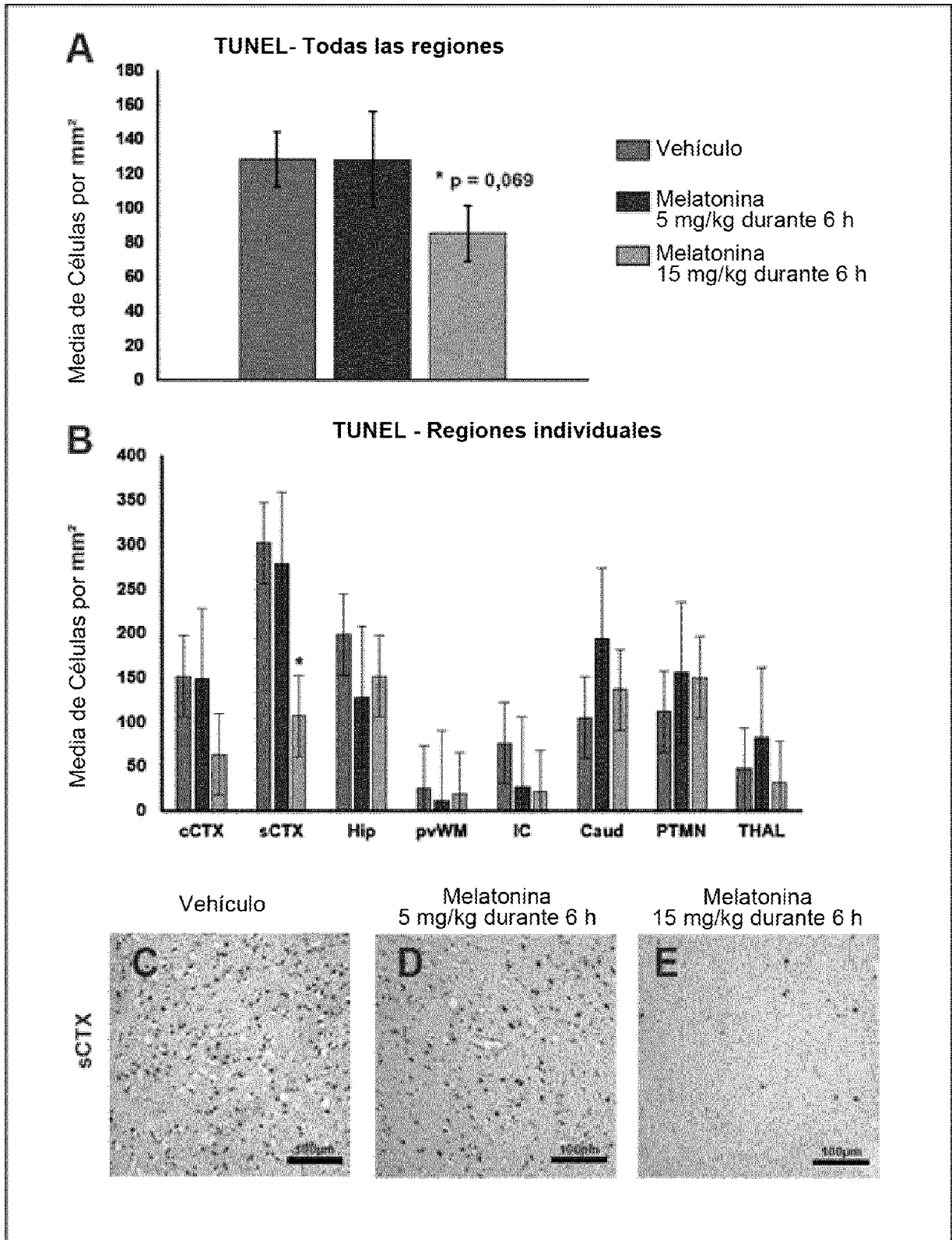


Figura 4

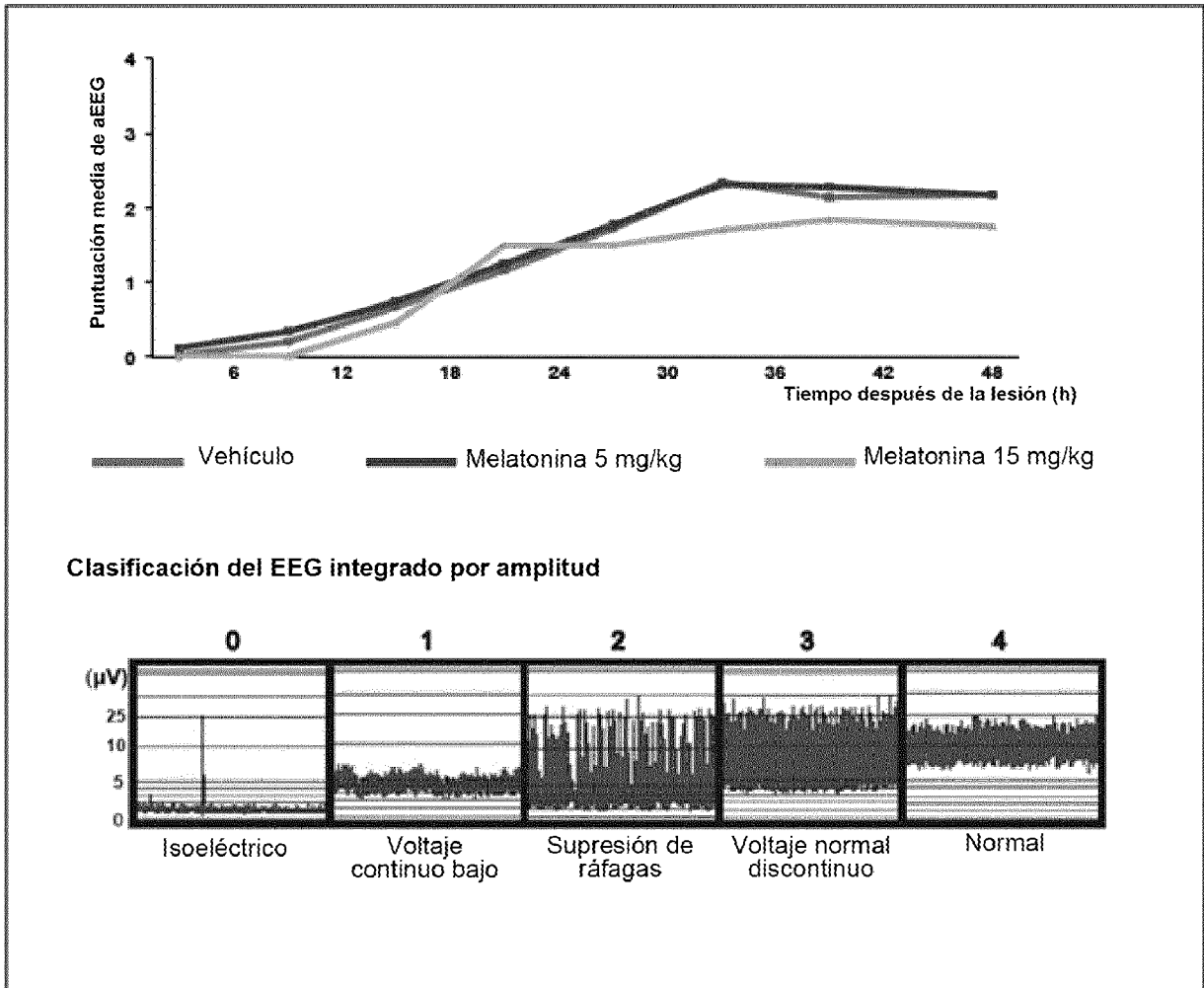


Figura 5

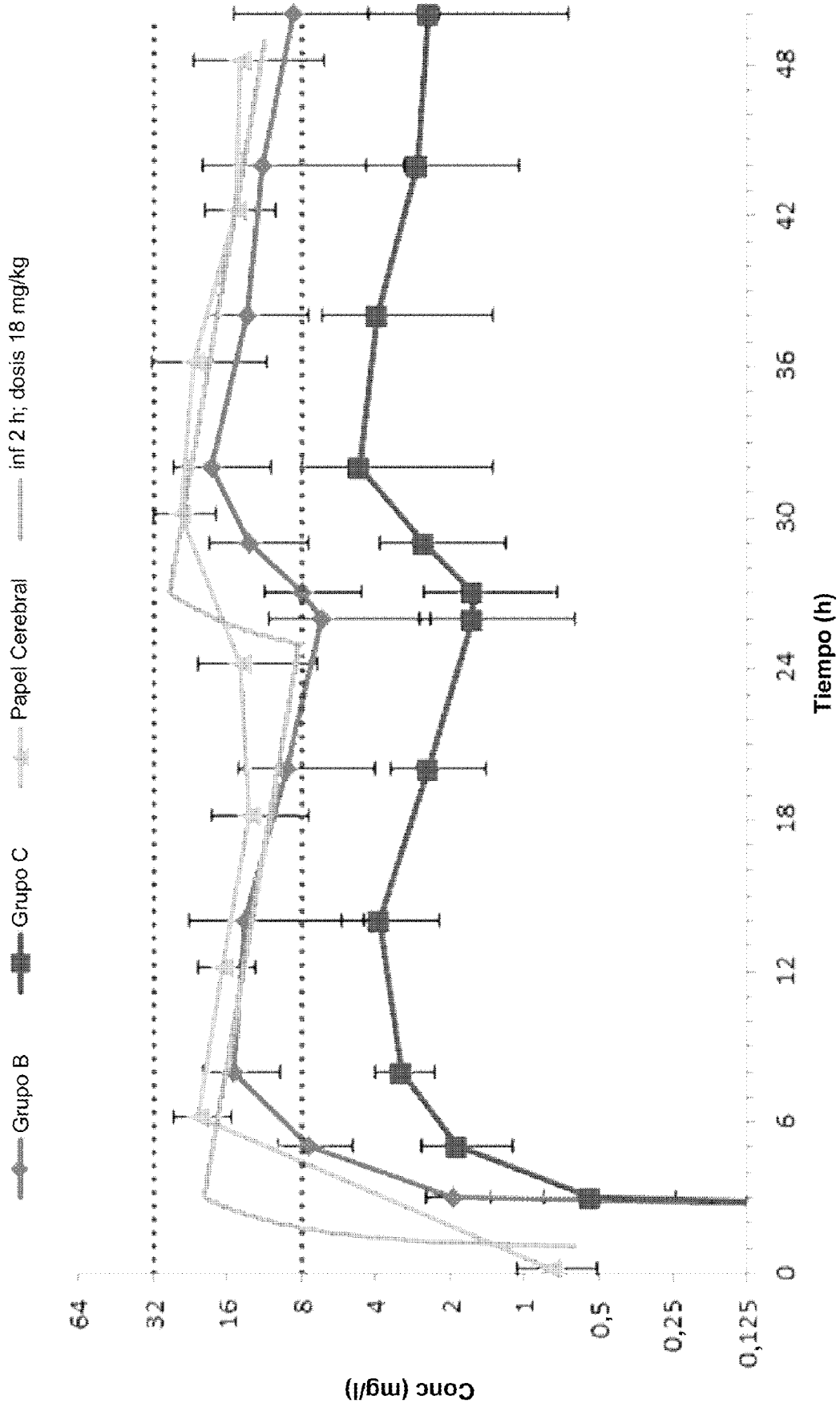


Figura 6

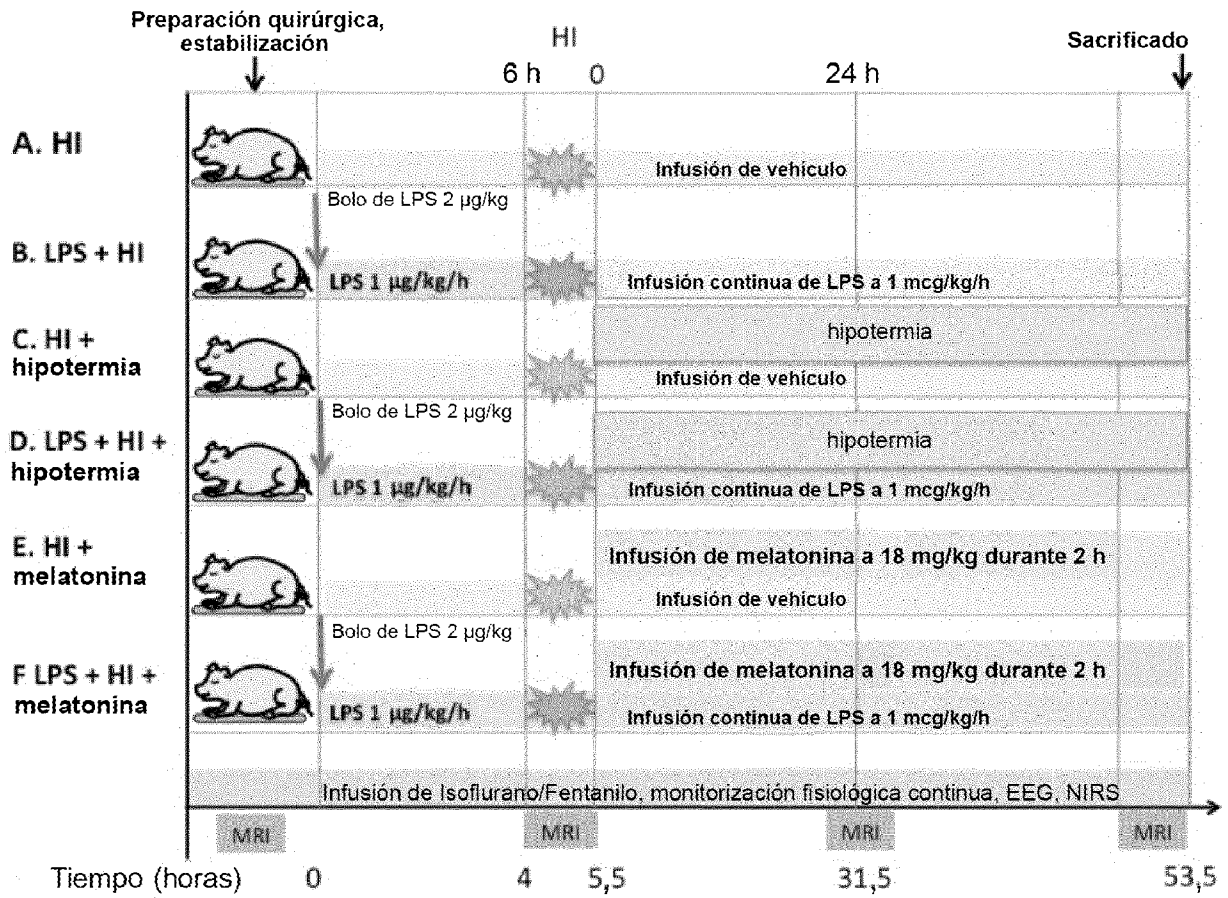


Figura 7