



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 360 235**

51 Int. Cl.:
A61K 31/7032 (2006.01)
A61P 37/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06816075 .3**
96 Fecha de presentación : **28.09.2006**
97 Número de publicación de la solicitud: **1940418**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **09.07.2008**

54 Título: **Sulfatidas para tratar trastornos autoinmunes.**

30 Prioridad: **29.09.2005 US 722184 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
02.06.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
02.06.2011

73 Titular/es: **TORREY PINES INSTITUTE FOR
MOLECULAR STUDIES
3550 General Atomics Court
San Diego, California 92121-1122, US**

72 Inventor/es: **Chaturvedi, Vipin, Kumar**

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 360 235 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

Sulfatidas para tratar trastornos autoinmunes

5 Campo de la invención

10 Las presentes formas de realización se refieren a métodos para el tratamiento de enfermedades o trastornos autoinmunes o relacionados con el sistema inmunológico. De manera más específica, las presentes formas de realización se refieren a sulfatidas que se utilizan en el tratamiento de enfermedades o trastornos autoinmunes o relacionados con el sistema inmunológico.

Descripción de la Técnica Relacionada

15 Las enfermedades autoinmunes afectan a millones de personas en todo el mundo y pueden tener efectos devastadores sobre la esperanza y la calidad de vida. A pesar de los avances de la medicina, muchas enfermedades autoinmunes continúan sin tener tratamiento, debido a que los mecanismos de la enfermedad son complejos y no se comprenden en su totalidad. Así mismo, a diferencia de la mayor parte de las enfermedades en las que el tratamiento implica actuar sobre el sistema inmunológico para combatir un agente invasor externo, en las enfermedades autoinmunes es el propio sistema inmunológico el que exacerba el problema. Esto determina que cualquier tratamiento sea mucho más difícil, porque debe estar orientado directamente contra la respuesta inmunológica para combatir el problema.

25 En la esclerosis múltiple (EM), por ejemplo, el sistema inmunológico reconoce algunos auto-antígenos de las membranas de mielina como ajenos e inicia una respuesta inmunológica contra ellos. La consecuencia es la desmielinización, o eliminación destructiva de la mielina, que es una proteína grasa con acción aislante y protectora que se deposita a modo de cubierta de las células nerviosas (neuronas). La desmielinización en la esclerosis múltiple está mediada por una respuesta inmunológica dirigida por células T que se inicia a partir de acontecimientos que cursan con presentación de antígenos en el SNC (sistema nervioso central), o es inducida tras la activación periférica, a través de una respuesta sistémica de mimetismo molecular.

30 La encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE) representa el prototipo de una enfermedad autoinmune mediada por células T, que se distingue por la inflamación y la desmielinización del sistema nervioso central, acompañada de parálisis tras la inmunización con antígenos de la mielina, por ejemplo, la proteína básica de mielina (MBP), la glicoproteína oligodendrocitaria de mielina (MOG), o la proteína proteolípida (PLP). La EAE comparte numerosas disfunciones patológicas e inmunológicas con la EM humana y es un modelo ampliamente aceptado para estudiar la EM humana.

35 Las células T pueden reconocer glicolípidos en el contexto de las proteínas de la superficie celular similares a MHC de clase I, conocidas como CD1. La mielina constituye una fuente abundante de glicolípidos y es la diana de un proceso autoinmune durante la EAE, en el que se puede estudiar fácilmente la influencia de los lípidos derivados de la mielina y su presentación a las células T en el SNC. Con el fin de derivar tratamientos eficaces para la esclerosis múltiple, se requiere una caracterización adicional de las células T reactivas frente a los glicolípidos. La sulfatida es uno de los principales glicolípidos en la mielina, y ha demostrado unirse a CD1d. (Jahng et al., *J. Exp. Med.* Vol. 199, número 7:947-957, 2004).

45 En el SIDA, el virus VIH destruye sistemáticamente las células T. Al igual que en muchas enfermedades autoinmunes, el propio sistema inmunológico tiende a contribuir al avance de la enfermedad porque el virus se propaga a través de las células inmunológicas. El virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) infecta las células CD4+ junto con un co-receptor celular, CXCR4 o CCR5/CCR3. La infección por VIH de las células humanas da como resultado la pérdida de linfocitos T CD4+ a medida que el virus experimenta una rápida replicación, generando mutaciones en la región de envuelta del genoma viral. Estas incluyen también mutantes resistentes a medicamentos, puesto que los individuos afectados se tratan con medicamentos antirretrovirales que incluyen zidovudina (AZT), inhibidores nucleosídicos de la transcriptasa inversa (NRTI) o un inhibidor no nucleosídico de la transcriptasa inversa (NNRTI), y un inhibidor de la proteasa. Además, se produce un agotamiento de los linfocitos T citotóxicos y el eventual fracaso del sistema inmunológico, respuestas mediadas tanto celularmente como humorales, del individuo afectado para combatir las infecciones que surgen de la generación *in vivo* de múltiples cepas de VIH. Así mismo, se produce una exacerbación del sistema inmunológico causado por infecciones oportunistas en los individuos infectados que están inmunocomprometidos.

60 El modelo combinado de ratón con inmunodeficiencia grave, trasplantado con tejidos fetales humanos de timo e hígado (SCID-hu Thy/Liv), es un modelo sobre animal pequeño que imita la infección de VIH en el ser humano en lo que se refiere a la pérdida de linfocitos T CD4+ y a la fuerte replicación viral. El sistema permite estudiar también en el laboratorio diversos medicamentos para combatir la infección *in vivo* en un sistema de modelo ventajoso, exento de los factores de confusión hallados en el ser humano. Por lo tanto, este sistema constituye un modelo útil para el ensayo pre-clínico de medicamentos anti-VIH *in vivo*, antes de emprender ensayos clínicos en personas infectadas.

65

La citopenia, especialmente la trombocitopenia, representa un importante factor de riesgo en la infección de VIH, enfermedades cardíacas y el cáncer. Las anomalías hematopoyéticas pueden provocar o dar lugar a múltiples citopenias en personas infectadas con VIH, en las que la trombocitopenia se revela como un importante factor de riesgo para la morbilidad y mortalidad, lo que se acentúa en personas afectadas también por enfermedades cardíacas.

La hepatitis inducida por Concanavalina A (Con A) en el ratón es un modelo de hepatopatías mediadas por células T que se encuentra bien caracterizado. Este modelo se ha empleado ampliamente como sistema que imita las enfermedades hepáticas humanas mediadas por células T tales como hepatitis autoinmune (Tiegs et al., *JCI*, 1992, Mizuhara H, *JEM*, 1994, Toyabe S, *Jl*, 1997). Una única inyección de Con A es suficiente para inducir una lesión hepática, mediada por células T, en el ratón (Tiegs et al., 1992, *JCI*, Mizuhara H., *JEM*, 1994, Toyabe S, *Jl*, 1997). Después de 8 a 24 horas se observan enzimas séricas y pruebas histológicas de hepatitis inducida por Con A, tal como lo demuestran los niveles elevados en suero de ALT y AST, y la aparición de pruebas histológicas de lesiones hepáticas que se caracterizan por una acumulación masiva de granulocitos, infiltración de células T CD4⁺ y la entrada de un número relativamente pequeño de células T CD8⁺, así como necrosis/apoptosis de los hepatocitos (Tiegs et al., 1992, *JCI*, Mizuhara H., *JEM*, 1994, Schumann J., 2000, *Am. J. Pathol.*, Chen et al., 2001). Recientemente, varios investigadores han responsabilizado a las células T "asesinas naturales" (NK, por sus siglas en inglés) hepáticas del desarrollo de la hepatitis inducida por Con A. Los ratones con deficiencias tanto de J α 18 como de CD1d, que carecen de células T NK, son resistentes a la lesión hepática inducida por Con A (Kaneko et al., 2000; Takeda et al., 2000), lo que indica que las células T NK clásicas con restricciones de CD1d, que expresan el receptor celular T iNK, intervienen de forma crítica en el proceso de la lesión hepática inducida por Con A.

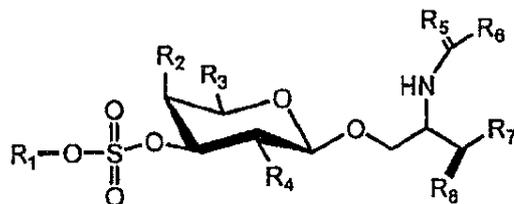
Buschard et al. (2005) presentan un estudio sobre la participación de la sulfatida en células beta y la diabetes tipo 1 y tipo 2. Las sulfatidas estudiadas consisten en un grupo de galactosa sulfatada unido a una ceramida, en donde el resto ceramida está compuesto por una base de esfingosina y un ácido graso completamente saturado, con una longitud de cadena de 16 a 24 átomos de carbono. El documento EP 0 717 995 describe un agente para utilizar en la supresión de la degeneración celular y la reducción de la toxicidad sobre los órganos, que comprende un glicolípido sulfatado o un glicolípido fucosilado de origen biológico. El resto ceramida de la sulfatida descrita consiste en una cadena completamente saturada de ácido graso y una base esfingosina C17. Hsu et al. (1998) informan de un análisis por espectrometría de masa en tándem con ionización por electronebulización de la sulfatida, que determina los patrones de fragmentación y caracterizan las especies moleculares que se expresan en el cerebro y en los islotes pancreáticos. Sin embargo, no se describe ninguna aplicación ni una adecuación general para el tratamiento de pacientes con síntomas de una enfermedad autoinmune por la administración de una sulfatida a dicho paciente.

RESUMEN DE LA INVENCIÓN

Una forma de realización se refiere a una sulfatida para utilizar en el tratamiento de un paciente con síntomas de una enfermedad autoinmune, que incluye administrar una cantidad de sulfatida efectiva para reducir dichos síntomas, en donde la enfermedad autoinmune no es esclerosis múltiple.

También se describe el uso de una sulfatida para la preparación de un medicamento dirigido al tratamiento de una enfermedad autoinmune, en el que la sulfatida está presente en una cantidad efectiva para reducir los síntomas de la enfermedad autoinmune, en donde la enfermedad autoinmune no es esclerosis múltiple.

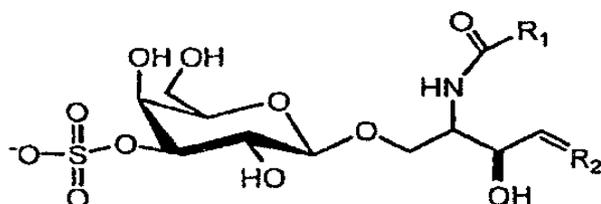
Igualmente, se describe una sulfatida que tiene la siguiente estructura química:



en la que R₁ se selecciona del grupo consistente en un enlace, un hidrógeno, un alquilo C₁ a C₃₀, un alquilo C₁ a C₃₀ sustituido, un alquenilo C₁ a C₃₀, un alquenilo C₁ a C₃₀ sustituido, y un azúcar C₅ a C₁₂; R₂ se selecciona del grupo consistente en un hidrógeno, un grupo hidroxí, un grupo metoxi, y un grupo alcoxi; R₃ se selecciona del grupo consistente en un hidrógeno, un grupo hidroxí, un grupo metoxi, un grupo etoxi, y un grupo alcoxi; R₄ se selecciona del

5 grupo consistente en un hidrógeno, un grupo hidroxilo, y un grupo alcoxi; R₅ se selecciona del grupo consistente en un hidrógeno, un hidroxilo, un carbonilo, un alcoxi, y un enlace; R₆ se selecciona del grupo consistente en un alquilo C₁ a C₄₀, un alquilo C₁ a C₄₀ sustituido, un alquenilo C₁ a C₄₀, un alquenilo C₁ a C₄₀ sustituido, y un alquinilo C₁ a C₄₀; R₇ se selecciona del grupo consistente en un alquilo C₁ a C₄₀, un alquilo C₁ a C₄₀ sustituido, un alquenilo C₁ a C₄₀, un alquenilo C₁ a C₄₀ sustituido, y un alquinilo C₁ a C₄₀; y R₈ se selecciona del grupo consistente en un hidrógeno, un grupo hidroxilo, un carbonilo, un grupo alcoxi, y un enlace.

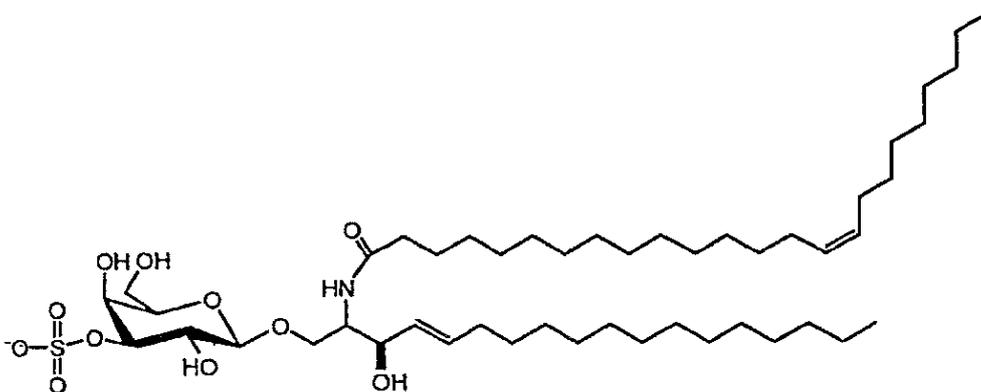
10 Adicionalmente, se describe una sulfatida que tiene la siguiente estructura química:



15 en la que R₁ se selecciona del grupo consistente en un alquilo C₁ a C₄₀, un alquilo C₁ a C₄₀ sustituido, un alquenilo C₁ a C₄₀, un alquenilo C₁ a C₄₀ sustituido, y un alquinilo C₁ a C₄₀; y R₂ se selecciona del grupo consistente en un hidrógeno, un grupo hidroxilo, un carbonilo, un grupo alcoxi, y un enlace.

20

En otro aspecto, la sulfatida puede tener la estructura química siguiente:

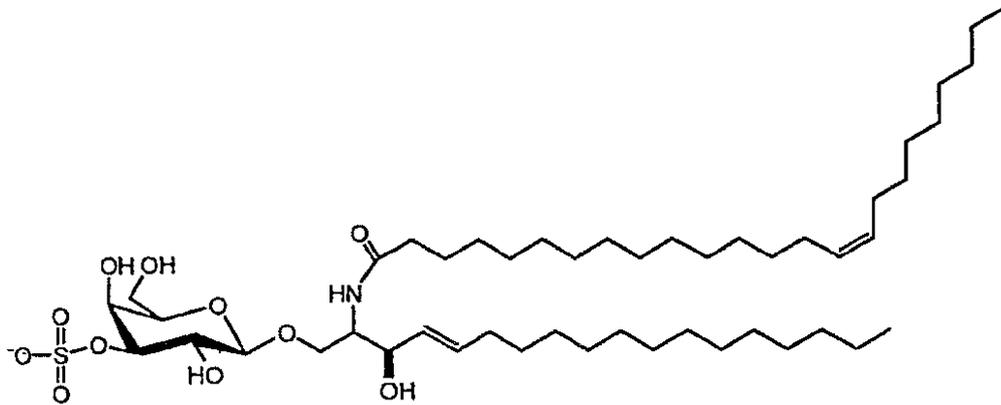


25 Todavía en otro aspecto, la sulfatida es: (2S, 3R, 4E)-N-nervónico-1-[D-(3-sulfato)-galactopiranosil]-2-amino-octadecen-3-ol.

30 En otro aspecto todavía, la enfermedad autoinmune puede ser, por ejemplo, lupus eritematoso sistémico, SIDA, enfermedad de Alzheimer, artritis reumatoide, diabetes mellitus dependiente de la insulina, hepatitis autoinmune, asma o enfermedad celiaca.

35 En otro aspecto, la sulfatida se puede administrar por una o más de las vías siguientes: intravenosa, intraperitoneal, inhalación, intramuscular, subcutánea y oral.

Otra forma de realización se refiere a una sulfatida para usar en el tratamiento de un paciente con síntomas de una enfermedad autoinmune, que comprende administrar una cantidad de una sulfatida eficaz para reducir dichos síntomas, en donde la sulfatida tiene la siguiente estructura química:

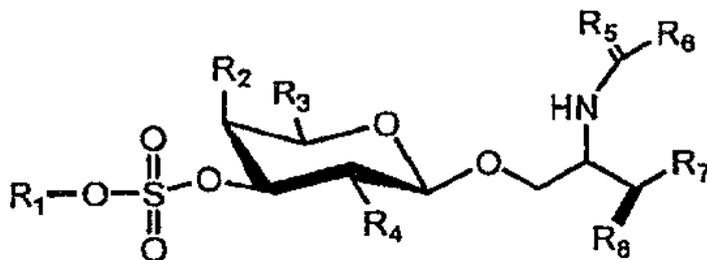


5 En un aspecto, la enfermedad autoinmune puede ser, por ejemplo, esclerosis múltiple, lupus eritematoso sistémico, SIDA, enfermedad de Alzheimer, artritis reumatoide, diabetes mellitus dependiente de la insulina, hepatitis autoinmune, asma o enfermedad celíaca.

10 En otro aspecto, la enfermedad autoinmune es esclerosis múltiple.

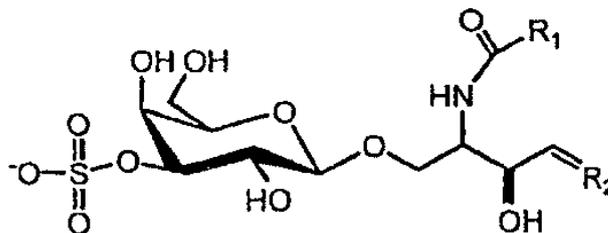
Otra forma de realización se refiere a un método para tratar las indicaciones de una enfermedad autoinmune en un paciente, que comprende administrar a dicho paciente una cantidad terapéuticamente efectiva de una sulfatida, en donde la enfermedad autoinmune no es esclerosis múltiple.

15 Adicionalmente, se describe una sulfatida que tiene la siguiente estructura química:



20 en la que R₁ se selecciona del grupo consistente en un enlace, un hidrógeno, un alquilo C₁ a C₃₀, un alquilo C₁ a C₃₀ sustituido, un alquenilo C₁ a C₃₀, un alquenilo C₁ a C₃₀ sustituido, y un azúcar C₅ a C₁₂; R₂ se selecciona del grupo consistente en un hidrógeno, un grupo hidroxilo, un grupo metoxi, y un grupo alcoxi; R₃ se selecciona del grupo consistente en un hidrógeno, un grupo hidroxilo, un grupo metoxi, un grupo etoxi, y un grupo alcoxi; R₄ se selecciona del grupo consistente en un hidrógeno, un grupo hidroxilo, y un grupo alcoxi; R₅ se selecciona del grupo consistente en un hidrógeno, un hidroxilo, un carbonilo, un alcoxi, y un enlace; R₆ se selecciona del grupo consistente en un alquilo C₁ a C₄₀, un alquilo C₁ a C₄₀ sustituido, un alquenilo C₁ a C₄₀, un alquenilo C₁ a C₄₀ sustituido, y un alquinilo C₁ a C₄₀; R₇ se selecciona del grupo consistente en un alquilo C₁ a C₄₀, un alquilo C₁ a C₄₀ sustituido, un alquenilo C₁ a C₄₀, un alquenilo C₁ a C₄₀ sustituido, y un alquinilo C₁ a C₄₀; y R₈ se selecciona del grupo consistente en un hidrógeno, un grupo hidroxilo, un carbonilo, un grupo alcoxi, y un enlace.

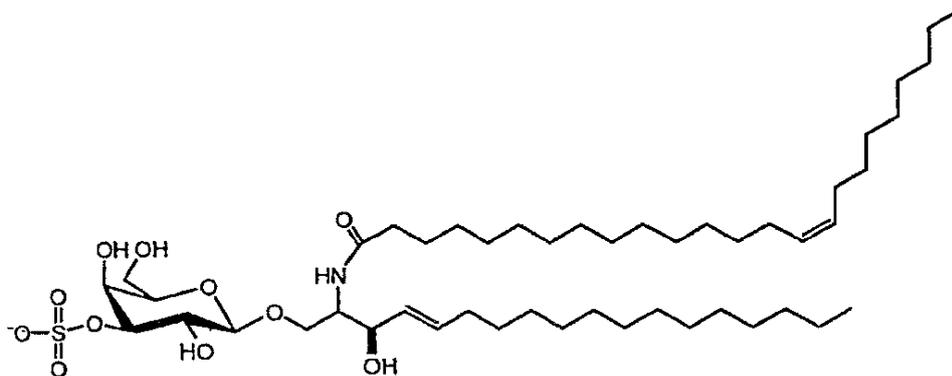
También se describe una sulfatida que tiene la estructura química siguiente:



5 en la que R_1 se selecciona del grupo consistente en un alquilo C_1 a C_{40} , un alquilo C_1 a C_{40} sustituido, un alquenilo C_1 a C_{40} , un alquenilo C_1 a C_{40} sustituido, y un alquinilo C_1 a C_{40} ; y R_2 se selecciona del grupo consistente en un hidrógeno, un grupo hidroxilo, un carbonilo, un grupo alcoxi, y un enlace.

10 En otro aspecto, la sulfatida es: (2S, 3R, 4E)-N-nervónico-1-[D-(3-sulfato)-galactopiranosil]-2-amino-octadecen-3-ol.

Todavía en otro aspecto, la sulfatida tiene la siguiente estructura química:



15 Todavía en otro aspecto, la enfermedad autoinmune puede ser, por ejemplo, lupus eritematoso sistémico, SIDA, enfermedad de Alzheimer, artritis reumatoide, diabetes mellitus dependiente de la insulina, hepatitis autoinmune, asma o enfermedad celiaca.

20 Todavía en otro aspecto, la enfermedad autoinmune puede ser esclerosis múltiple.

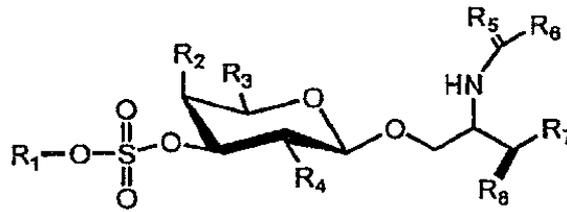
En otro aspecto, la enfermedad autoinmune es SIDA.

25 En otro aspecto, la sulfatida se puede administrar por una o más de las vías siguientes: intravenosa, intraperitoneal, inhalación, intramuscular, subcutánea y oral.

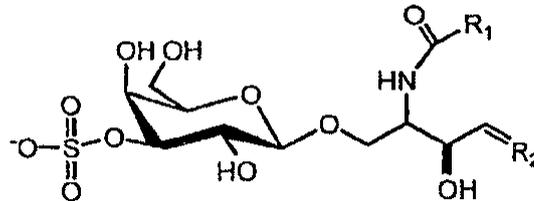
Otra forma de realización se refiere a una sulfatida para usar en el tratamiento o la prevención de los síntomas de una enfermedad autoinmune en un mamífero, que comprende la etapa de administrar a dicho mamífero una cantidad terapéuticamente efectiva de una sulfatida formulada en un vehículo farmacéuticamente aceptable, en donde la enfermedad autoinmune no es esclerosis múltiple.

30 En un aspecto, el mamífero es un ser humano.

Igualmente, se describe una sulfatida que tiene la siguiente estructura química:



5 en la que R₁ se selecciona del grupo consistente en un enlace, un hidrógeno, un alquilo C₁ a C₃₀, un alquilo C₁ a C₃₀ sustituido, un alquenilo C₁ a C₃₀, un alquenilo C₁ a C₃₀ sustituido, y un azúcar C₅ a C₁₂; R₂ se selecciona del grupo consistente en un hidrógeno, un grupo hidroxilo, un grupo metoxi, y un grupo alcoxi; R₃ se selecciona del grupo consistente en un hidrógeno, un grupo hidroxilo, un grupo metoxi, un grupo etoxi, y un grupo alcoxi; R₄ se selecciona del grupo consistente en un hidrógeno, un grupo hidroxilo, y un grupo alcoxi; R₅ se selecciona del grupo consistente en un hidrógeno, un hidroxilo, un carbonilo, un alcoxi, y un enlace; R₆ se selecciona del grupo consistente en un alquilo C₁ a C₄₀, un alquilo C₁ a C₄₀ sustituido, un alquenilo C₁ a C₄₀, un alquenilo C₁ a C₄₀ sustituido, y un alquinilo C₁ a C₄₀; R₇ se selecciona del grupo consistente en un alquilo C₁ a C₄₀, un alquilo C₁ a C₄₀ sustituido, un alquenilo C₁ a C₄₀, un alquenilo C₁ a C₄₀ sustituido, y un alquinilo C₁ a C₄₀; y R₈ se selecciona del grupo consistente en un hidrógeno, un grupo hidroxilo, un carbonilo, un grupo alcoxi, y un enlace.

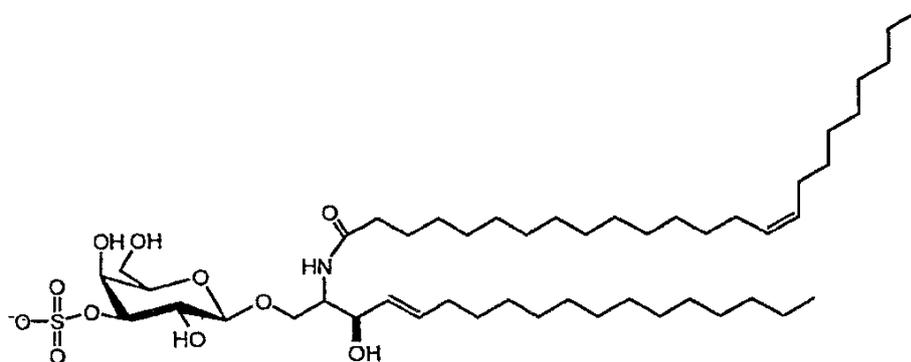


15 Adicionalmente, se describe una sulfatida que tiene la estructura química siguiente:

20 en la que R₁ se selecciona del grupo consistente en un alquilo C₁ a C₄₀, un alquilo C₁ a C₄₀ sustituido, un alquenilo C₁ a C₄₀, un alquenilo C₁ a C₄₀ sustituido, y un alquinilo C₁ a C₄₀; y R₂ se selecciona del grupo consistente en un hidrógeno, un grupo hidroxilo, un carbonilo, un grupo alcoxi, y un enlace.

Todavía en otro aspecto, la sulfatida es: (2S, 3R, 4E)-N-nervónico-1-[D-(3-sulfato)-galactopiranosil]-2-amino-octadecen-3-ol.

25 En otro aspecto, la sulfatida tiene la fórmula química siguiente:



30 En otro aspecto, la enfermedad autoinmune puede ser, por ejemplo, lupus eritematoso sistémico, SIDA, enfermedad de Alzheimer, artritis reumatoide, diabetes mellitus dependiente de la insulina, hepatitis autoinmune, asma y enfermedad celiaca.

Todavía en otro aspecto, la enfermedad autoinmune es esclerosis múltiple.

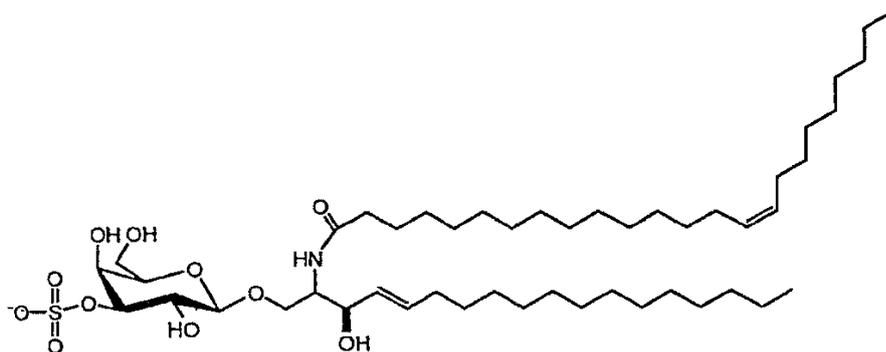
En aún otro aspecto, la enfermedad autoinmune es SIDA.

En otro aspecto, la enfermedad autoinmune es asma.

- 5 En otro aspecto, la sulfatida se administra por una o más de las vías siguientes: intravenosa, intraperitoneal, inhalación, intramuscular, subcutánea y oral.

Otra forma de realización se refiere a una sulfatida para usar en el tratamiento de un paciente con síntomas de una enfermedad autoinmune, en donde la sulfatida tiene la estructura siguiente:

10



15

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

20 **FIG. 1** demuestra que el tratamiento de ratones con sulfatida revierte la EAE crónica en curso en ratones C57.BL/6J. Los ratones recibieron por inyección intraperitoneal 20 μ g de sulfatida de cerebro bovino (ã) o PBS/vehículo solo (Δ) en el inicio de la enfermedad (\blacktriangle).

25 **FIG. 2** demuestra que el tratamiento de ratones con sulfatida revierte la EAE crónica-recidivante en curso en ratones SJL/J. Los ratones recibieron por inyección intraperitoneal 20 μ g de sulfatida de cerebro bovino (ã) o PBS/vehículo solo (Δ), al inicio de la enfermedad (\blacktriangle izquierda) y 14 días después (\blacktriangle derecha).

30 **FIG. 3** demuestra que el tratamiento de ratones con cis-tetracosenoil-sulfatida revierte la EAE crónica-recidivante en curso en ratones SJL/J. Los ratones recibieron por inyección intraperitoneal 20 μ g de cis-tetracosenoil-sulfatida (λ) o PBS/vehículo solo (Δ) en el inicio de la enfermedad (\blacktriangle).

35 **FIG. 4** demuestra que la administración de sulfatida a ratones diabéticos no obesos (NOD) previene la diabetes. Se trataron ratones NOD machos y hembras con sulfatida de cerebro bovino, (σ) y (λ), o con lípido de control (Mono GM-1), (Δ) y (Å).

40 **FIG. 5** demuestra que los niveles de las enzimas séricas alanina amino transferasa (ALT) (trazado superior) y aspartato amino transferasa (AST) (trazado inferior) disminuyeron significativamente en ratones que recibieron inyecciones de sulfatida de cerebro bovino Con A+ (Å), en comparación con los ratones con inyecciones de Con A (ÿ).

45 **FIG. 6** muestra cortes hepáticos teñidos con hematoxilina y eosina que demuestran la marcada mejoría de la histología del hígado en los ratones tratados con sulfatida (segundo panel), en comparación con los ratones del grupo de control (primer panel) en tiempos determinados. El segundo panel incluye un corte hepático de control tras una inyección de solamente sulfatida de cerebro bovino.

50 **FIG. 7** pone de manifiesto una completa protección contra lesiones morfológicas masivas del hígado, derivadas de la hepatitis, tras el tratamiento con sulfatida. Morfología hepática de ratones con inyección de Con A (segundo panel), ratones con inyecciones de Con A + sulfatida de cerebro bovino (tercer panel), y ratones con inyecciones de PBS o de sulfatida de 24 horas, como muestras de control (primer panel).

FIG. 8 demuestra que la administración de sulfatida de cerebro bovino en ratones SCID-hu reduce drásticamente la infección de VIH-1, así como la replicación de VIH-1.

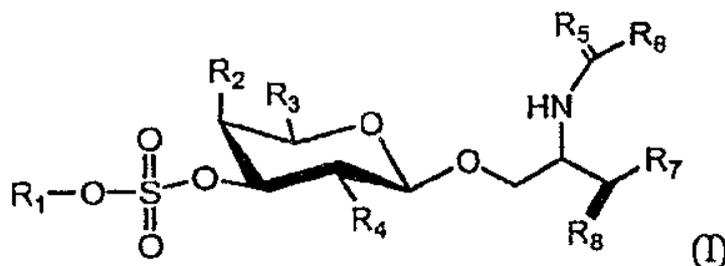
FIG. 9 demuestra que la administración de sulfatida de cerebro bovino en ratones SCID-hu conserva la actividad formadora de colonias multilínea de los timocitos humanos durante la infección de VIH-1.

5

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Las presentes formas de realización se refieren a sulfatidas para ser usadas en el tratamiento de una extensa variedad de enfermedades o trastornos autoinmunes o relacionados con el sistema inmunológico que incluyen, por ejemplo, esclerosis múltiple, lupus eritematoso sistémico, SIDA, enfermedad de Alzheimer, artritis reumatoide, diabetes mellitus dependiente de la insulina, hepatitis autoinmune, asma y enfermedad celiaca.

Algunas formas de realización se refieren a métodos para tratar estas enfermedades o trastornos autoinmunes o relacionados con el sistema inmunológico por medio de la administración de sulfatidas. Más específicamente, algunas formas de realización se refieren a métodos para tratar enfermedades o trastornos autoinmunes o relacionados con el sistema inmunológico mediante la administración de una cantidad de una sulfatida al organismo de un paciente, que sea efectiva para reducir o prevenir los síntomas de la enfermedad o trastorno autoinmune o relacionado con el sistema inmunológico. Adicionalmente, se describe una sulfatida que tiene la siguiente fórmula I química:

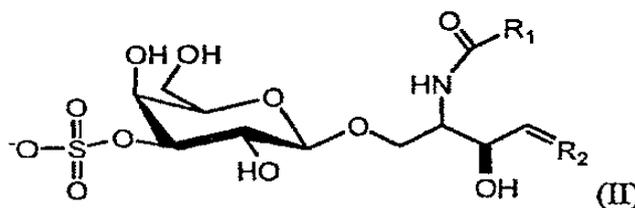


20

en la que R₁ puede ser un enlace, un hidrógeno, un alquilo C₁ a C₃₀, un alquilo C₁ a C₃₀ sustituido, un alqueno C₁ a C₃₀, un alqueno C₁ a C₃₀ sustituido, o un azúcar C₅ a C₁₂; R₂ puede ser un hidrógeno, un grupo hidroxilo, un grupo metoxi, o un grupo alcoxi; R₃ puede ser un hidrógeno, un grupo hidroxilo, un grupo metoxi, un grupo etoxi, o un grupo alcoxi; R₄ puede ser un hidrógeno, un grupo hidroxilo, o un grupo alcoxi; R₅ puede ser un hidrógeno, un grupo hidroxilo, un carbonilo, un grupo alcoxi, o un enlace; R₆ puede ser un alquilo C₁ a C₄₀, un alquilo C₁ a C₄₀ sustituido, un alqueno C₁ a C₄₀, un alqueno C₁ a C₄₀ sustituido, o un alquino C₁ a C₄₀; R₇ puede ser un alquilo C₁ a C₄₀, un alquilo C₁ a C₄₀ sustituido, un alqueno C₁ a C₄₀, un alqueno C₁ a C₄₀ sustituido, o un alquino C₁ a C₄₀; y R₈ puede ser un hidrógeno, un grupo hidroxilo, un carbonilo, un grupo alcoxi, o un enlace.

30

También se describe una sulfatida que tiene la fórmula química siguiente:



35 en la que R₁ se selecciona del grupo consistente en un alquilo C₁ a C₄₀, un alquilo C₁ a C₄₀ sustituido, un alqueno C₁ a C₄₀, un alqueno C₁ a C₄₀ sustituido, y un alquino C₁ a C₄₀; y R₂ se selecciona del grupo consistente en un hidrógeno, un grupo hidroxilo, un carbonilo, un grupo alcoxi, y un enlace.

40 Tal como se usa en este documento, el término "alquilo" significa cualquier hidrocarburo saturado, lineal o ramificado. La expresión "alquilo sustituido" significa cualquier hidrocarburo saturado, lineal o ramificado, que está sustituido. Los compuestos cíclicos, tanto hidrocarburos cíclicos como compuestos cíclicos que tienen heteroátomos, se engloban dentro del significado de "alquilo".

Tal como se usa en este documento, el término “sustituido” significa cualquier sustitución de un átomo de hidrógeno con un grupo funcional.

5 Como se usa en este documento, la expresión “grupo funcional” tiene una definición común y hace referencia a restos químicos seleccionados preferentemente del grupo consistente en un átomo de halógeno, alquilo C₁-C₂₀, alquilo C₁-C₂₀ sustituido, alquilo perhalogenado, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, arilo, arilo sustituido, bencilo, heteroarilo, heteroarilo sustituido, ciano, y nitro.

10 Tal como se usa en este documento, las expresiones “halógeno” y “átomo de halógeno” se refieren a cualquiera de los átomos radio-estables de la columna 17 del Sistema Periódico de los Elementos, preferentemente flúor, cloro, bromo o yodo, siendo flúor y cloro especialmente preferidos.

15 Como se usa en este documento, el término “alqueno” significa cualquier hidrocarburo insaturado, lineal o ramificado, sustituido o no sustituido. La expresión “alqueno sustituido” significa cualquier hidrocarburo insaturado, lineal o ramificado y sustituido, que está sustituido con uno o múltiples grupos funcionales, encontrándose las alqueno-C₂-C₆-aminas secundarias no ramificadas, las alqueno-C₂-C₆-aminas secundarias sustituidas y las alqueno-C₂-C₆-aminas terciarias no ramificadas dentro de la definición de “alquilo sustituido”. Los compuestos cíclicos, tanto hidrocarburos cíclicos insaturados como compuestos cíclicos que tienen heteroátomos, se encuentran dentro del significado de “alqueno”.

20 Tal como se usa en este documento, el término “alcoxi” se refiere a cualquier éter saturado o insaturado, lineal o ramificado, sustituido o no sustituido.

25 Como se usa en este documento, el término “sulfatida” conserva su significado habitual, y hace referencia a un éster sulfúrico de un cerebrósido que contiene uno o múltiples grupos sulfato en la porción de azúcar de la molécula.

Tal como se usa en este documento, el término “cerebrósido” se refiere a cualquier compuesto lipídico que contiene un azúcar y, por lo general, del tipo hallado normalmente en el cerebro y tejido nervioso.

30 Los compuestos de las fórmulas (I), (II) y (III) pueden estar en forma de sus sales atóxicas farmacéuticamente aceptables. Las sales de las fórmulas (I), (II) y (III) incluyen sales de adición de ácido tales como sales con ácidos inorgánicos (por ejemplo, ácido clorhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico y ácido fosfórico) o con ácidos orgánicos (por ejemplo, ácido acético, ácido propiónico, ácido maleico, ácido oleico, ácido palmítico, ácido cítrico, ácido succínico, ácido tartárico, ácido fumárico, ácido glutámico, ácido pantoténico, ácido lauril-sulfónico, ácido metano-sulfónico y ácido ftálico).

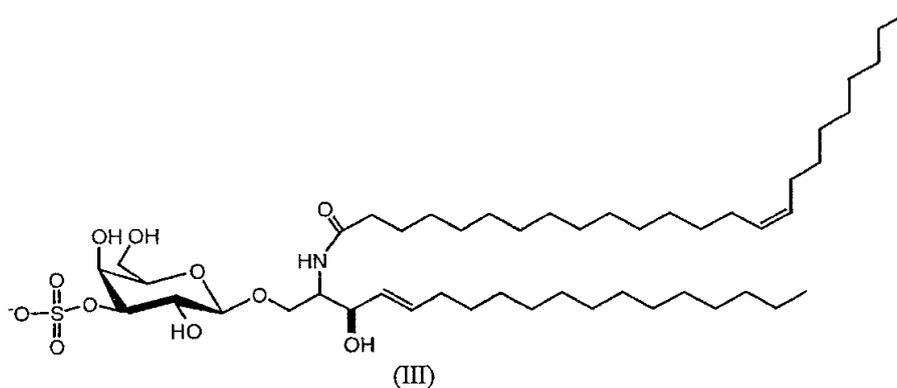
Los compuestos de las fórmulas (I), (II) y (III) pueden estar en forma de sus solvatos (por ejemplo, hidratos).

40 Los compuestos de las fórmulas (I), (II) y (III) se pueden producir por cualquier método útil para sintetizar sulfatidas.

Los compuestos de las fórmulas (I), (II) y (III) también se pueden aislar de productos naturales (por ejemplo, organismos biológicos), purificándolos por cromatografía de columna o métodos similares.

45 En una forma de realización, la sulfatida tiene la fórmula química: (2S, 3R, 4E)-N-nervónico-1-[D-(3-sulfato)-galactopiranosil]-2-amino-octadecen-3-ol. Esta fórmula química recibe también el nombre de cis-tetracosenoil-sulfatida.

En otra forma de realización, la sulfatida tiene la siguiente estructura química:



50

- 5 En algunas formas de realización, la sulfatida puede ser, por ejemplo, sulfatida derivada de cerebro bovino, que es una mezcla de aproximadamente 20 especies diferentes obtenidas por Sigma Inc. (Chicago, IL, EE.UU.). En otras formas de realización, la sulfatida es semi-sintética y es una especie única de sulfatida, por ejemplo, cistetracosenoil-sulfatida o lisosulfatida, obtenida de Maitreya, Inc. (Pleasant Gap, PA, EE.UU.). Todavía en otras formas de realización, la sulfatida puede ser una sulfatida totalmente sintética.
- 10 Otra forma de realización se refiere a un método para tratar las diversas indicaciones de enfermedades o trastornos autoinmunes o relacionados con el sistema inmunológico. En particular, un aspecto de la presente forma de realización se refiere a un método para tratar un paciente afectado por síntomas de una enfermedad o trastorno autoinmune o relacionado con el sistema inmunológico tal como, por ejemplo, esclerosis múltiple, lupus eritematoso sistémico, SIDA, enfermedad de Alzheimer, artritis reumatoide, diabetes mellitus dependiente de la insulina, hepatitis autoinmune, asma y enfermedad celiaca.
- 15 Algunas formas de realización se refieren a un método para tratar el asma en un paciente. El asma bronquial se asocia con un proceso inflamatorio en los pulmones que se distingue por la presencia en las vías respiratorias de grandes cantidades de células T CD4+ secretoras de citoquinas. No solamente las células T CD4+ restringidas por el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de clase II, sino también las células T NK restringidas por CD1 expresan el antígeno CD4. Estas células se pueden clasificar en dos subconjuntos en base a las que usan receptores invariantes, tales como células T NK invariantes (“células T iNK”) y las que utilizan receptores variantes tales como las células T NK no invariantes (“células T no-iNK”). Los modelos murinos de asma alérgica han demostrado que las células T NK son necesarias para el desarrollo de la hiperreactividad de las vías respiratorias inducida por alérgenos.
- 20 Así mismo, los estudios han demostrado que un porcentaje importante de las células CD4+CD3+ pulmonares en pacientes con asma moderada a grave estuvo compuesto por células T iNK. Sin embargo, no ocurrió así en los pulmones de pacientes con sarcoidosis. Puesto que estas células T iNK representan solo una población menor (alrededor de 0,1%) de las células T CD4+ en la sangre periférica, su elevado número en los pulmones de pacientes asmáticos indican un enriquecimiento selectivo. Se ha demostrado que las células T iNK pueden reconocer el glicolípido sintético α -galactosil-ceramida, el auto-glicolípido isoglobotrihexosil-ceramida (iGb3), los glicoesfingolípidos bacterianos y los glicolípidos de pólenes vegetales. Un subconjunto de células T iNK reconoce también la sulfatida de auto-glicolípidos, así como otras sulfatidas y glicolípidos de las presentes formas de realización. Un ejemplo de los mecanismos por los que la sulfatida controla la autoinmunidad implica la inactivación o ausencia de respuesta a las células T iNK; por lo tanto, en algunas formas de realización, las sulfatidas solo se pueden usar para tratar el asma en un paciente.
- 25 Como se usa en este documento, el término “paciente” se refiere al receptor de un tratamiento terapéutico e incluye todos los organismos del reino animal. En formas de realización preferidas, el animal pertenece a la familia de los mamíferos, tales como humano, bovino, ovino, porcino, felino, búfalo, canino, caprino, equino, burro, reno y primates. El animal más preferido es el ser humano.
- 30 Como se usa en este documento, los términos “tratar” y “tratamiento” incluyen “prevenir” y “prevención”, respectivamente.
- 35 En algunas otras formas de realización, la sulfatida se puede administrar sola o en combinación con otro compuesto terapéutico. Se puede utilizar cualquier compuesto terapéutico conocido en la actualidad, usado en el tratamiento de la enfermedad autoinmune diana. En una forma de realización preferida, no se usa ningún adyuvante.
- 40 Se contemplan muchos diferentes modos y métodos de administración de la sulfatida. En algunas formas de realización, las vías de administración incluyen, por ejemplo, la administración intravenosa, intraperitoneal, por inhalación, intramuscular, subcutánea y oral, o cualquier otra vía de administración conocida en la técnica. Dependiendo de la vía de administración particular, la forma de dosificación puede ser, por ejemplo, una preparación sólida, semisólida, líquida, en forma de vapor o de aerosol. La forma de dosificación puede incluir, por ejemplo, los aditivos, lubricantes, estabilizadores, soluciones tamponantes, recubrimientos y excipientes que son convencionales en la técnica de las formulaciones farmacéuticas.
- 45 Se toman en consideración numerosas formulaciones farmacéuticas. En algunas formas de realización, las formulaciones farmacéuticas se pueden preparar por métodos convencionales, usando los siguientes vehículos farmacéuticamente aceptables o similares: excipientes tales como disolventes (por ejemplo, agua, solución salina fisiológica), agentes volumétricos y agentes de carga (por ejemplo, lactosa, almidón, celulosa cristalina, manitol, maltosa, hidrógeno-fosfato de calcio, ácido silícico anhidro suave, y carbonato de calcio); auxiliares tales como agentes solubilizadores (por ejemplo, etanol y polisolvatos), agentes aglutinantes (por ejemplo, almidón, polivinil-pirrolidina, hidroxipropilcelulosa, etilcelulosa, carboximetilcelulosa y goma arábiga), agentes desintegrantes (por ejemplo, almidón y carboximetilcelulosa cálcica), agentes lubricantes (por ejemplo, estearato de magnesio, talco y aceite hidrogenado), agentes estabilizadores (por ejemplo, lactosa, manitol, maltosa, polisolvatos, macrogol, y aceite de ricino polioxiétileno hidrogenado), agentes isotónicos, agentes humectantes, agentes lubricantes, agentes dispersantes, agentes
- 50
- 55
- 60
- 65

tamponantes y agentes solubilizadores; y aditivos tales como antioxidantes, conservantes, agentes saborizantes y aromáticos, agentes analgésicos, agentes estabilizadores, agentes colorantes y agentes edulcorantes.

5 Si es necesario, también se pueden agregar glicerol, dimetil-acetamida, lactato sódico al 70%, tensioactivos y sustancias alcalinas (por ejemplo, etilendiamina, etanolamina, carbonato sódico, arginina, meglumina y trisaminometano) a diversas formulaciones farmacéuticas.

10 En el contexto de algunas formas de realización, la forma de dosificación puede estar dirigida a la administración oral. Las composiciones de dosificación oral para administración al intestino delgado incluyen, por ejemplo, cápsulas sólidas así como composiciones líquidas que contienen agentes tamponantes acuosos que impiden que la sulfatida u otros ingredientes resulten significativamente inactivados por los jugos gástricos del estómago, permitiendo de este modo que la sulfatida alcance el intestino delgado. Ejemplos de estos agentes tamponantes acuosos, que se pueden utilizar en las presentes formas de realización incluyen, por ejemplo, tampón bicarbonato a un pH de aproximadamente 5,5 hasta aproximadamente 8,7. Los comprimidos también se pueden formular de manera gastro-resistente por la adición de, por ejemplo, acetato-ftalato de celulosa o acetato-tereftalato de celulosa.

20 En algunas formas de realización, la cantidad específica de sulfatida administrada al paciente variará en función de la enfermedad o trastorno tratado, así como de la edad, peso y sexo del paciente bajo tratamiento. Por lo general, para alcanzar una concentración final en, por ejemplo, el intestino o sangre, la cantidad de la molécula de sulfatida en una composición de dosificación simple, según las presentes formas de realización, será de aproximadamente 0,1 miligramos a aproximadamente 100 miligramos, preferentemente de aproximadamente 2,0 miligramos hasta aproximadamente 60 miligramos, más preferentemente de aproximadamente 20 miligramos hasta aproximadamente 50 miligramos. Del mismo modo, la cantidad de un segundo compuesto terapéutico en una composición de dosificación oral simple de las presentes formas de realización estará, por lo general, dentro de un intervalo de aproximadamente 0,01 miligramos hasta aproximadamente 1000 miligramos, más preferentemente de aproximadamente 0,1 miligramos hasta aproximadamente 100 miligramos. Evidentemente, la dosificación exacta variará de acuerdo con la enfermedad o trastorno tratado, pudiéndose determinar fácilmente los intervalos preferidos.

30 En otra forma de realización, la sulfatida se puede combinar con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Vehículos farmacéuticamente aceptables adecuados incluyen, por ejemplo, solución salina tamponada con fosfato y PBS-tween. En una forma de realización, se administran al paciente 0,1 a 10 mg/kg de peso corporal de sulfatida. Más preferentemente, se administran 1 a 10 mg/kg de peso corporal de sulfatida. Preferentemente, esta dosificación se repite a diario, según sea necesario. Más adelante se analizan dosificaciones y esquemas de dosis alternativos.

35 En las presentes formas de realización, las sulfatidas se pueden administrar a un paciente afectado por enfermedades autoinmunes para mejorar el estado del paciente. En consonancia, y de acuerdo con las presentes formas de realización, se pueden tratar pacientes afectados por una o múltiples indicaciones de una enfermedad o trastorno autoinmune o relacionado con el sistema inmunológico tales como esclerosis múltiple, lupus eritematoso sistémico, SIDA, enfermedad de Alzheimer, artritis reumatoide, diabetes mellitus dependiente de la insulina, hepatitis autoinmune, asma y enfermedad celiaca.

45 Según las formas de realización, las sulfatidas se pueden administrar para aliviar los síntomas del paciente, o se pueden administrar para contrarrestar un mecanismo de la propia enfermedad. Los expertos en la técnica reconocerán que estos objetivos terapéuticos suelen estar relacionados, y que es posible adaptar individualmente los tratamientos para pacientes particulares en base a diversos factores. Estos factores pueden incluir edad, sexo o estado de salud del paciente, y la progresión de la enfermedad o trastorno autoinmune o relacionado con el sistema inmunológico. La metodología de tratamiento para un paciente se puede adaptar, por lo tanto, para dosificación, programación temporal de la administración, vía de administración y de acuerdo con la administración simultánea o secuencial de otras terapias.

50 En un ejemplo de forma de realización, un paciente adulto de 70 kg de peso en riesgo de sufrir lesiones químicas del hígado causadas por medicamentos de prescripción o drogas de abuso, recibe una inyección intramuscular diaria de 70 mg de sulfatida en 1,0 ml de solución salina tamponada con fosfato para tratar la lesión hepática. Esta dosificación se puede ajustar en base a los resultados del tratamiento y el juicio clínico del médico responsable del tratamiento. Preferentemente, el tratamiento se continúa durante aproximadamente 1 o 2 semanas, preferentemente al menos durante aproximadamente 1 o 2 meses, y se puede continuar de forma crónica.

60 En otro ejemplo de forma de realización, un adulto humano de 70 kg de peso recibe una inyección intramuscular diaria de 70 mg de sulfatida en 1,0 ml de solución salina tamponada con fosfato para tratar el SIDA. Esta dosificación se puede ajustar según los resultados del tratamiento y la opinión del médico responsable del tratamiento. Preferentemente, el tratamiento se continúa durante al menos 1 o 2 semanas, preferentemente durante al menos 1 o 2 meses, y se puede proseguir de forma crónica.

65 Todavía en otro ejemplo de forma de realización, un adulto humano de 70 kg de peso recibe una inyección intramuscular diaria de 70 mg de sulfatida en 1,0 ml de solución salina tamponada con fosfato para tratar la esclerosis

múltiple. Esta dosificación se puede ajustar en base a los resultados del tratamiento y el juicio clínico del médico responsable del tratamiento. Preferentemente, el tratamiento se continúa durante aproximadamente 1 o 2 semanas, preferentemente al menos durante aproximadamente 1 o 2 meses, y se puede continuar de forma crónica.

5 Todavía en otro ejemplo de forma de realización, un adulto humano de 70 kg de peso recibe una inyección intramuscular diaria de 70 mg de sulfatida en 1,0 ml de solución salina tamponada con fosfato para tratar el lupus eritematoso sistémico. Esta dosificación se puede ajustar en base a los resultados del tratamiento y el juicio clínico del médico responsable del tratamiento. Preferentemente, el tratamiento se continúa durante aproximadamente 1 o 2 semanas, preferentemente al menos durante aproximadamente 1 o 2 meses, y se puede continuar de forma crónica.

10 En otro ejemplo más de forma de realización, un adulto humano de 70 kg de peso recibe una inyección intramuscular diaria de 70 mg de sulfatida en 1,0 ml de solución salina tamponada con fosfato para tratar la enfermedad de Alzheimer. Esta dosificación se puede ajustar en base a los resultados del tratamiento y el juicio clínico del médico responsable del tratamiento. Preferentemente, el tratamiento se continúa durante aproximadamente 1 o 2 semanas, preferentemente al menos durante aproximadamente 1 o 2 meses, y se puede continuar de forma crónica.

15 En otro ejemplo de forma de realización, un adulto humano de 70 kg de peso recibe una inyección intramuscular diaria de 70 mg de sulfatida en 1,0 ml de solución salina tamponada con fosfato para tratar la artritis reumatoide. Esta dosificación se puede ajustar en base a los resultados del tratamiento y el juicio clínico del médico responsable del tratamiento. Preferentemente, el tratamiento se continúa durante aproximadamente 1 o 2 semanas, preferentemente al menos durante aproximadamente 1 o 2 meses, y se puede continuar de forma crónica.

20 En otro ejemplo de forma de realización, un adulto humano de 70 kg de peso recibe una inyección intramuscular diaria de 70 mg de sulfatida en 1,0 ml de solución salina tamponada con fosfato para tratar la hepatitis autoinmune. Esta dosificación se puede ajustar en base a los resultados del tratamiento y el juicio clínico del médico responsable del tratamiento. Preferentemente, el tratamiento se continúa durante aproximadamente 1 o 2 semanas, preferentemente al menos durante aproximadamente 1 o 2 meses, y se puede continuar de forma crónica.

25 En otro ejemplo adicional de forma de realización, un adulto humano de 70 kg de peso recibe una inyección intramuscular diaria de 70 mg de sulfatida en 1,0 ml de solución salina tamponada con fosfato para tratar la enfermedad celíaca. Esta dosificación se puede ajustar en base a los resultados del tratamiento y el juicio clínico del médico responsable del tratamiento. Preferentemente, el tratamiento se continúa durante aproximadamente 1 o 2 semanas, preferentemente al menos durante aproximadamente 1 o 2 meses, y se puede continuar de forma crónica.

30 En otro ejemplo de forma de realización, un adulto humano de 70 kg de peso recibe una inyección intramuscular diaria de 70 mg de sulfatida en 1,0 ml de solución salina tamponada con fosfato para tratar la diabetes mellitus dependiente de la insulina. Esta dosificación se puede ajustar en base a los resultados del tratamiento y el juicio clínico del médico responsable del tratamiento. Preferentemente, el tratamiento se continúa durante aproximadamente 1 o 2 semanas, preferentemente al menos durante aproximadamente 1 o 2 meses, y se puede continuar de forma crónica.

35 En otro ejemplo de forma de realización, un adulto humano de 70 kg de peso recibe una inyección intramuscular diaria de 70 mg de sulfatida en 1,0 ml de solución salina tamponada con fosfato para tratar el asma. De manera alternativa, el adulto humano de 70 kg de peso recibe un tratamiento diario por inhalación de 70 mg de sulfatida para el tratamiento del asma. Estas dosificaciones se pueden ajustar en base a los resultados del tratamiento y el juicio clínico del médico responsable del tratamiento. Preferentemente, el tratamiento se continúa durante aproximadamente 1 o 2 semanas, preferentemente al menos durante aproximadamente 1 o 2 meses, y se puede continuar de forma crónica.

40 Los siguientes ejemplos se ofrecen solamente con fines de ilustración y en ningún caso pretenden limitar el alcance de las presentes formas de realización.

EJEMPLO 1

55 Tratamiento con Sulfatida de la Encefalomiелitis Autoinmune Experimental Crónica (EAE) – Estudio en el Ratón C57.BL/6J

60 Hembras del ratón de origen natural C57.BL/6J, de 6 a 8 semanas de edad, fueron inmunizadas una vez por vía subcutánea con 200 µg del péptido glicoproteína oligodendrocitaria de la mielina MOG35-55, emulsionado en adyuvante incompleto de Freund (IFA, por sus siglas en inglés) (DIFCO), suplementado con *M. tuberculosis* (DIFCO) atenuado a 1,65 mg/ml. Se inyectaron 0,15 µg de toxina pertussis (PTx; List Biological Laboratories, Inc.) dos veces en 200 µl de solución salina por vía intraperitoneal 0 y 48 h más tarde. Los ratones se sometieron a observación diaria, en busca de signos de EAE durante 40 días. La puntuación media de enfermedad para cada grupo se calculó promediando la gravedad máxima de todos los animales afectados en el grupo. La gravedad de la patología se determinó en una escala de 5 puntos, tal como se ha descrito anteriormente: 1, rabo flácido; 2, debilidad de las patas traseras; 3, parálisis de las patas traseras; 4, parálisis de todo el cuerpo; 5, moribundo o muerte.

En el protocolo de tratamiento, se administraron 20 µg de sulfatida de cerebro bovino en 200 µl de PBS o vehículo, por vía intraperitoneal (en tres ocasiones, a intervalos semanales, o una sola vez, tal como se indica) al comienzo de la EAE. En el protocolo de prevención, se administraron por vía intraperitoneal 20 µg de sulfatida disueltos en 200 µl de PBS en el momento de la inducción de la EAE. Los resultados que se muestran en la Figura 1 demuestran que el tratamiento con sulfatida revierte la EAE crónica en curso en ratones C57.BL/6J.

EJEMPLO 2

Tratamiento con Sulfatida de la Encefalomiелitis Autoinmune Experimental Crónica y Recidivante – Estudio en el Ratón SJL/J

Hembras del ratón de origen natural SJL/J, de 6 a 8 semanas de edad, fueron inmunizadas una vez por vía subcutánea con 75 µg del péptido proteína proteolipídica PLP139-151, emulsionado en adyuvante incompleto de Freund (Difco, MI, EE.UU.), suplementado con *M. tuberculosis* (DIFCO) atenuado a 2 mg/ml. Los ratones se sometieron a observaciones diarias, en busca de signos de EAE, durante 50 días. La puntuación media de enfermedad para cada grupo se calculó promediando la gravedad máxima de todos los animales afectados en el grupo. La gravedad de la patología se determinó en una escala de 5 puntos, tal como se ha descrito anteriormente: 1, rabo flácido; 2, debilidad de las patas traseras; 3, parálisis de las patas traseras; 4, parálisis de todo el cuerpo; 5, moribundo o muerte.

En el protocolo de tratamiento, se inyectaron 20 µg de sulfatida de cerebro bovino en 200 µl de PBS o vehículo, por vía intraperitoneal, al comienzo de la EAE y 2 semanas más tarde. En el protocolo de prevención, se administraron por vía intraperitoneal 20 µg de sulfatida disueltos en 200 µl de PBS en el momento de la inducción de la EAE. Los resultados que se muestran en la Figura 2 demuestran que el tratamiento de ratones con sulfatida revierte la EAE crónica-recidivante en curso en ratones SJL/J.

EJEMPLO 3

Tratamiento con Cis-tetracosenoil-Sulfatida de la Encefalomiелitis Autoinmune Experimental (EAE) Crónica y Recidivante - Estudio en el Ratón SJL/J

Hembras del ratón de origen natural SJL/J, de 6 a 8 semanas de edad, fueron inmunizadas una vez por vía subcutánea con 75 µg del péptido PLP139-151, emulsionado en IFA (DIFCO), suplementado con *M. tuberculosis* (DIFCO) atenuado a 2 mg/ml. Los ratones se sometieron a observaciones diarias, en busca de signos de EAE, durante 50 días. La puntuación media de enfermedad para cada grupo se calculó promediando la gravedad máxima de todos los animales afectados en el grupo. La gravedad de la patología se determinó en una escala de 5 puntos, tal como se ha descrito anteriormente: 1, rabo flácido; 2, debilidad de las patas traseras; 3, parálisis de las patas traseras; 4, parálisis de todo el cuerpo; 5, moribundo o muerte.

En el protocolo de tratamiento, se inyectaron 20 µg de cis-tetracosenoil-sulfatida (Fórmula III), semi-sintética en 200 µl de PBS o vehículo, por vía intraperitoneal, al comienzo de la EAE. Los resultados que se muestran en la Figura 3 demuestran que el tratamiento de ratones con cis-tetracosenoil-sulfatida revierte la EAE crónica-recidivante en curso en ratones SJL/J.

EJEMPLO 4

Tratamiento de la Diabetes con Sulfatida – Estudio en ratones Diabéticos No-obesos (NOD)

Grupos de edades comparables de ratones NOD de 3 semanas de edad (10 a 11 en cada grupo) recibieron 3 inyecciones intraperitoneales semanales de 20 µg de sulfatida de cerebro bovino o de lípido de control (Mono GM-1) en vehículo/PBS. Semanalmente, se vigilaron los niveles de glucosa en orina y sangre de los ratones. Se diagnosticó diabetes cuando los niveles de glucosa en sangre fueron >250 mg/dl en dos registros consecutivos. Estos datos son representativos de dos experimentos independientes. Los resultados que se muestran en la Figura 4 demuestran que la administración de sulfatida previene la diabetes en ratones NOD.

EJEMPLO 5

Estudio de Lesiones Hepáticas Después del Tratamiento con Sulfatida de la Hepatitis Autoinmune

Modelo CON A: Hembras de ratones C.57BL/6 recibieron por vía intravenosa (i.v.) una dosis de 8,5 mg/kg de Concanavalina A (Con A) (disuelta en solución salina tamponada con fosfato (PBS), libre de pirógenos). Por vía intraperitoneal (i.p.), se administraron 20 µg (1 mg/kg/m) de sulfatida de cerebro bovino inmediatamente después de la inyección de Con A. Los ratones de control recibieron, de forma paralela, inyecciones de PBS.

Después de la administración de Con A o Con A + sulfatida, se tomaron muestras de suero, que se mantuvieron a -20°C hasta su uso. Se midieron las enzimas séricas a las 0, 6, 12, 24, 48 y 72 horas después de la inyección de Con A o Con A + sulfatida. Se determinaron los niveles en suero de ALT y AST con ayuda de la compañía Laboratory Corporation of America, San Diego, CA.

En los ratones que recibieron las inyecciones de Con A o Con A + sulfatida, se observaron al cabo de 6 horas niveles comparables de las enzimas séricas alanina amino transferasa y aspartato amino transferasa. En los ratones con inyecciones de Con A (ȳ), los niveles en suero de ALT y AST alcanzaron valores máximos aproximadamente 12 h (ALT $\approx 15,8 \times 10^3$ UI/l, y AST $\approx 22,7 \times 10^3$ UI/l), que volvieron a los niveles iniciales en 48 horas. Por el contrario, tras la inyección combinada de Con A + sulfatida (Å) (Figura 5), se registró un descenso significativo de los niveles en suero de ALT y AST (ALT $\approx 2,5 \times 10^3$ UI/l y AST $\approx 5,4 \times 10^3$ UI/l) a las 12 horas, que volvieron al nivel basal a las 24 horas. $p < 0,0001$ a las 12 h.

EJEMPLO 6

Marcada Mejoría de las Lesiones del Tejido Hepático Inducidas por la Hepatitis en Ratones Tratados con Sulfatida

En los tiempos indicados, se fijó tejido hepático en solución al 10% de formaldehído, manteniéndolo a temperatura ambiente hasta su uso. En Pacific Pathology Inc., San Diego, CA se llevó a cabo el estudio histológico, usando tinciones de hematoxilina y eosina (H + E).

Cortes representativos de tejido hepático teñidos con H + E, que evidenciaron una histología marcadamente mejorada del hígado en los ratones tratados con Con A + sulfatida de cerebro bovino, en relación con el tratamiento de Con A en los tiempos indicados. El examen histológico mostró, tras la inyección de Con A, una infiltración difusa y masiva, así como una necrosis importante en los tiempos indicados, como se ve en el panel superior. Por el contrario, la inyección de sulfatida + Con A se asoció con lesiones menores en términos de menor infiltración y menor necrosis de los cortes hepáticos en el plazo de 12 h a 48 h, con un retorno de la histología a la normalidad al cabo de 72 h, panel inferior. El corte hepático representado en la esquina izquierda del panel inferior, realizado 24 h después de una inyección de sulfatida solamente, sirve como control.

EJEMPLO 7

Protección Contra las Lesiones Hepáticas Causadas por Hepatitis en Ratones con Inyecciones de Sulfatida

En ratones, se examinó la morfología macroscópica del hígado a los 3, 4 y 7 días después del tratamiento con inyecciones de Con A o Con A + Sulfatida. Fotografías representativas del hígado que revelaron necrosis intensa (manchas blancas) en ratones tratados con solamente Con A (panel central), pero no en los ratones tratados con Con A + sulfatida de cerebro bovino (panel inferior) en los tiempos indicados. El panel superior muestra las inyecciones de PBS o sulfatida sola después de 24 h.

Como se muestra en la Figura 7, se observó una necrosis intensa (manchas blancas) en el examen macroscópico de fotografías del hígado completo los días 3, 4 y 7 después de la inducción de hepatitis en el ratón con Con A. Después de la inyección combinada de Con A + sulfatida (panel inferior) no se registró necrosis del hígado (manchas blancas) en los días 3, 4 y 7, en comparación con la inyección de PBS o sulfatida (24 h) (panel superior). Estos resultados demuestran que la co-administración con sulfatida protege contra la hepatitis inducida por Con A.

EJEMPLO 8

El Tratamiento con Sulfatida Previene la Infección y Replicación de VIH-1 en Ratones SCID-hu

Se infectaron con el virus VIH-1 los implantes de timo/hígado de ratones SCID-hu. Los ratones recibieron por vía intraperitoneal 20 μ g de sulfatida de cerebro bovino (Fórmula I) en 200 μ l de PBS, dos veces por semana, en distintos momentos de la infección vírica de los animales.

Se extrajeron los implantes de timo/hígado de estos ratones y se determinó la carga viral de VIH-1, incluyendo la infección y replicación virales. Los resultados que se muestran en la Figura 8 demuestran que la administración de sulfatida a ratones SCID-hu reduce drásticamente tanto la infección de VIH-1 como la replicación del virus.

EJEMPLO 9

El Tratamiento con Sulfatida Restablece el Potencial Timopoyético de los Implantes Humanos en el Ratón SCID-hu

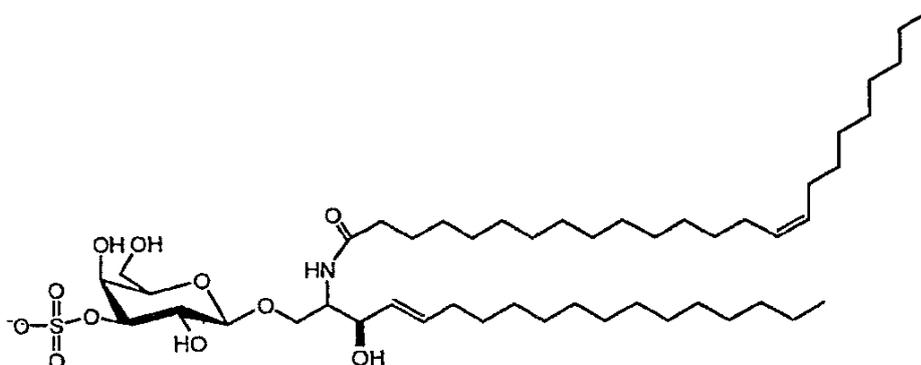
Se infectaron con el virus VIH-1 los implantes de timo/hígado de ratones SCID-hu. Los ratones recibieron por vía intraperitoneal 20 μ g de sulfatida de cerebro bovino en 200 μ l de PBS, dos veces por semana, en distintos momentos de la infección viral de los animales. Se evaluó, *in vitro*, la hematopoyesis multi-linaje por medio de la actividad

de formación de colonias de 5×10^6 células totales, derivadas de los implantes de Thy/Liv (Timo/Hígado), en membranas de metilcelulosa (células mieloides y eritroides) y Megacult-C (células megacarioides). Los resultados que se muestran en la Figura 9 demuestran que la administración de sulfatida a ratones SCID-hu conserva la actividad formadora de colonias multilínea de los timocitos humanos durante la infección de VIH-1.

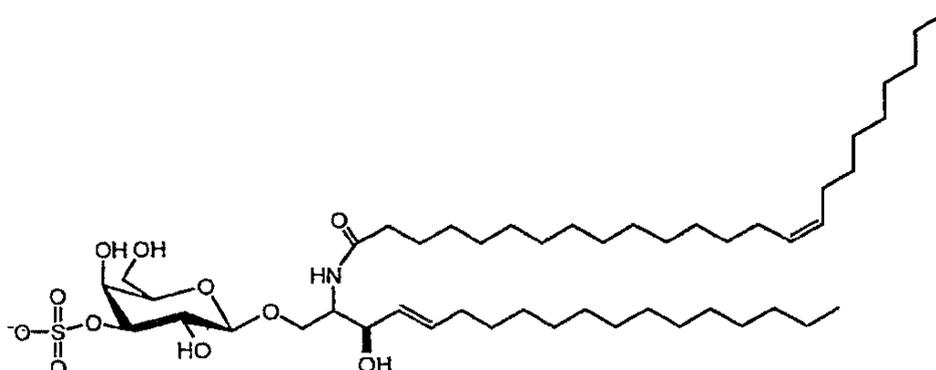
5

REIVINDICACIONES

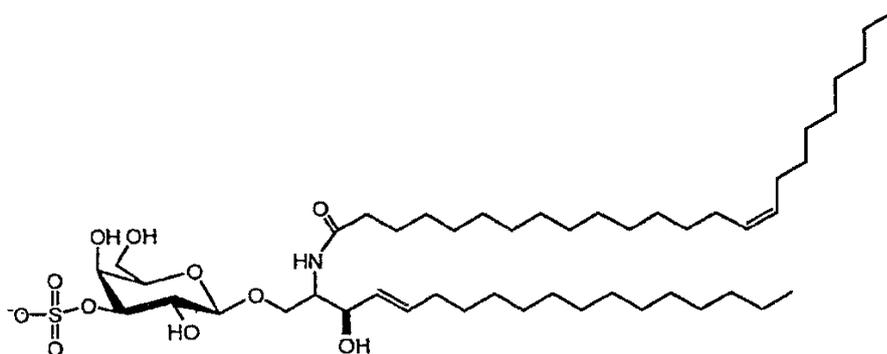
- 5 1. Una sulfatida que se utiliza en el tratamiento de una enfermedad autoinmune, en donde la cantidad de sulfatida es efectiva para reducir los síntomas de la enfermedad autoinmune, en donde la enfermedad autoinmune no es esclerosis múltiple, y en donde la sulfatida tiene la estructura química siguiente:



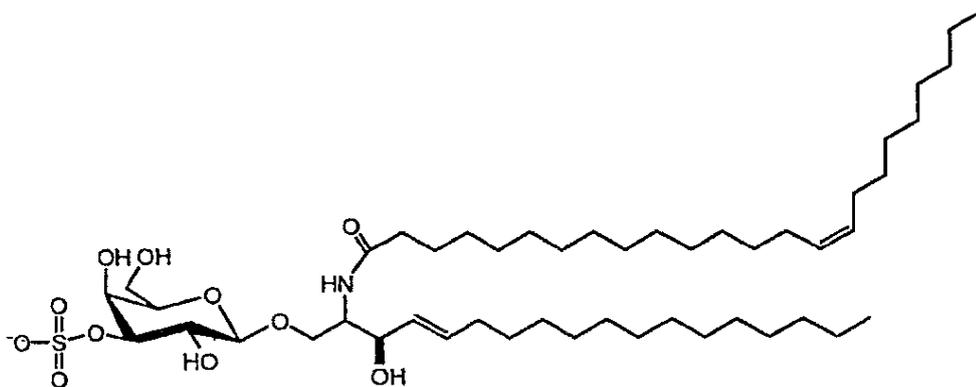
- 10 2. Una sulfatida que se utiliza en el tratamiento de una enfermedad autoinmune, en donde la sulfatida tiene la estructura química siguiente:



- 15 3. La sulfatida que se utiliza según la reivindicación 2, en donde la enfermedad autoinmune es esclerosis múltiple.
4. La sulfatida que se utiliza según la reivindicación 1 o 2, en donde la sulfatida es: (2S, 3R, 4E)-N-nervónico-1-[D-(3-sulfato)-galactopiranosil]-2-amino-octadecen-3-ol.
- 20 5. La sulfatida que se utiliza según la reivindicación 1 o 2, en donde la enfermedad autoinmune se selecciona del grupo consistente en lupus eritematoso sistémico, SIDA, enfermedad de Alzheimer, artritis reumatoide, diabetes mellitus dependiente de la insulina, hepatitis autoinmune, asma y enfermedad celiaca.
- 25 6. La sulfatida que se utiliza según la reivindicación 1 o 2, en donde la sulfatida se administra por una o más de las vías seleccionadas del grupo consistente en intravenosa, intraperitoneal, inhalación, intramuscular, subcutánea y oral.
7. La sulfatida que se utiliza según la reivindicación 1 o 2, en donde la enfermedad autoinmune es asma.
- 30 8. La sulfatida que se utiliza según la reivindicación 1 o 2, en donde la enfermedad autoinmune es SIDA.
9. Una sulfatida que se utiliza en el tratamiento de un paciente con síntomas de una enfermedad autoinmune, en donde la sulfatida tiene la estructura química siguiente:



- 5 10. Una sulfatida que se utiliza en el tratamiento o la prevención de los síntomas de una enfermedad autoinmune en un mamífero, en donde la sulfatida se administra a dicho mamífero en una cantidad terapéuticamente efectiva, en donde la sulfatida se formula en un vehículo farmacéuticamente aceptable, en donde la enfermedad autoinmune no es esclerosis múltiple, y en donde la sulfatida tiene la estructura química siguiente:



- 10 11. La sulfatida que se utiliza según la reivindicación 10, en donde la sulfatida es (2S, 3R, 4E)-N-nervónico-1-[D-(3-sulfato)-galactopiranosil]-2-amino-octadecen-3-ol.
12. La sulfatida que se utiliza según la reivindicación 10 u 11, en donde el mamífero es un ser humano.
- 15 13. La sulfatida que se utiliza según la reivindicación 10 u 11, en donde la enfermedad autoinmune se selecciona del grupo consistente en lupus eritematoso sistémico, SIDA, enfermedad de Alzheimer, artritis reumatoide, diabetes mellitus dependiente de la insulina, hepatitis autoinmune, asma y enfermedad celiaca.
- 20 14. La sulfatida que se utiliza según la reivindicación 9, en donde la enfermedad autoinmune es esclerosis múltiple.
15. La sulfatida que se utiliza según la reivindicación 13, en donde la enfermedad autoinmune es SIDA.
- 25 16. La sulfatida que se utiliza según la reivindicación 10 u 11, en donde la sulfatida se administra por una o más de las vías seleccionadas del grupo consistente en intravenosa, intraperitoneal, inhalación, intramuscular, subcutánea y oral.
17. La sulfatida que se utiliza según la reivindicación 10 u 11, en donde la enfermedad autoinmune es asma.

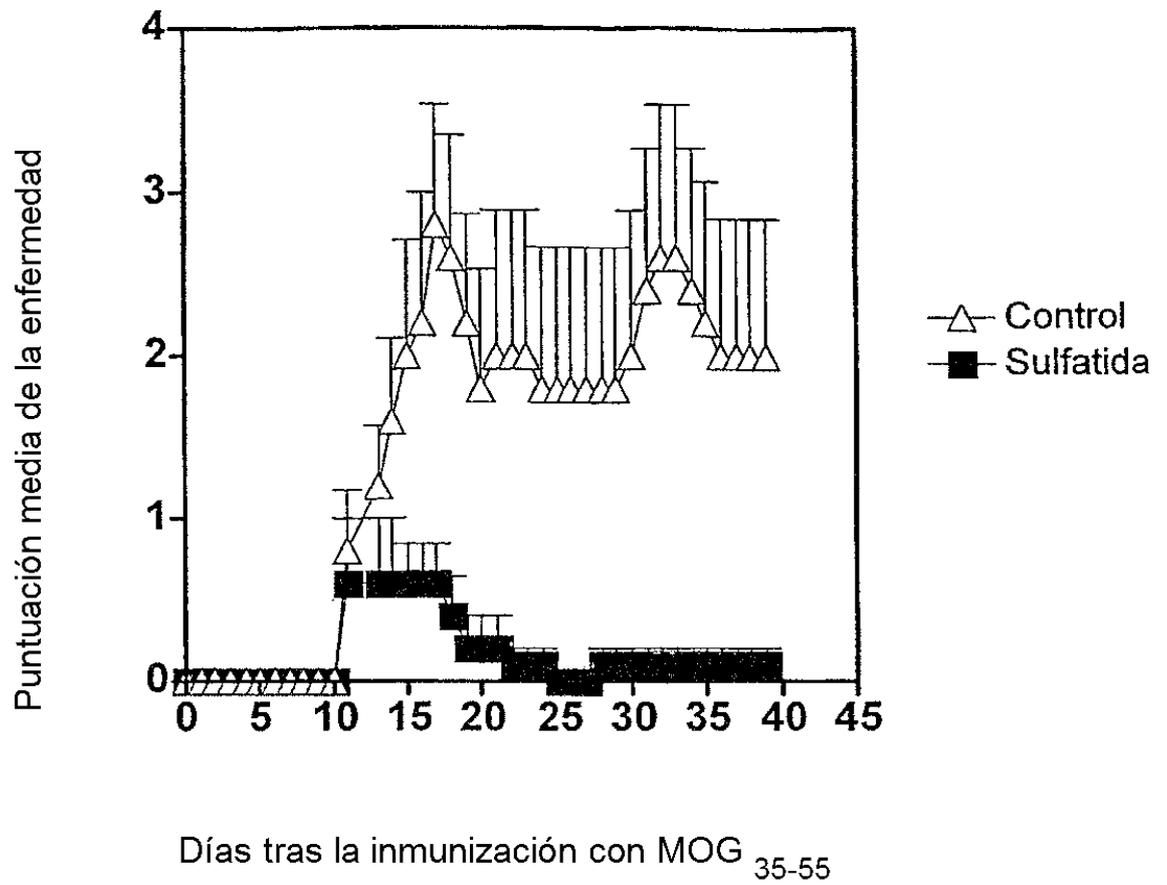


Figura 1

Días tras la inmunización con MOG₃₅₋₅₅: Días después de la inducción de la enfermedad en ratones C57.BL/6J

Control: Ratones tratados solamente con vehículo/PBS.

Sulfatida: Ratones tratados con sulfatida (20 µg/ratón).

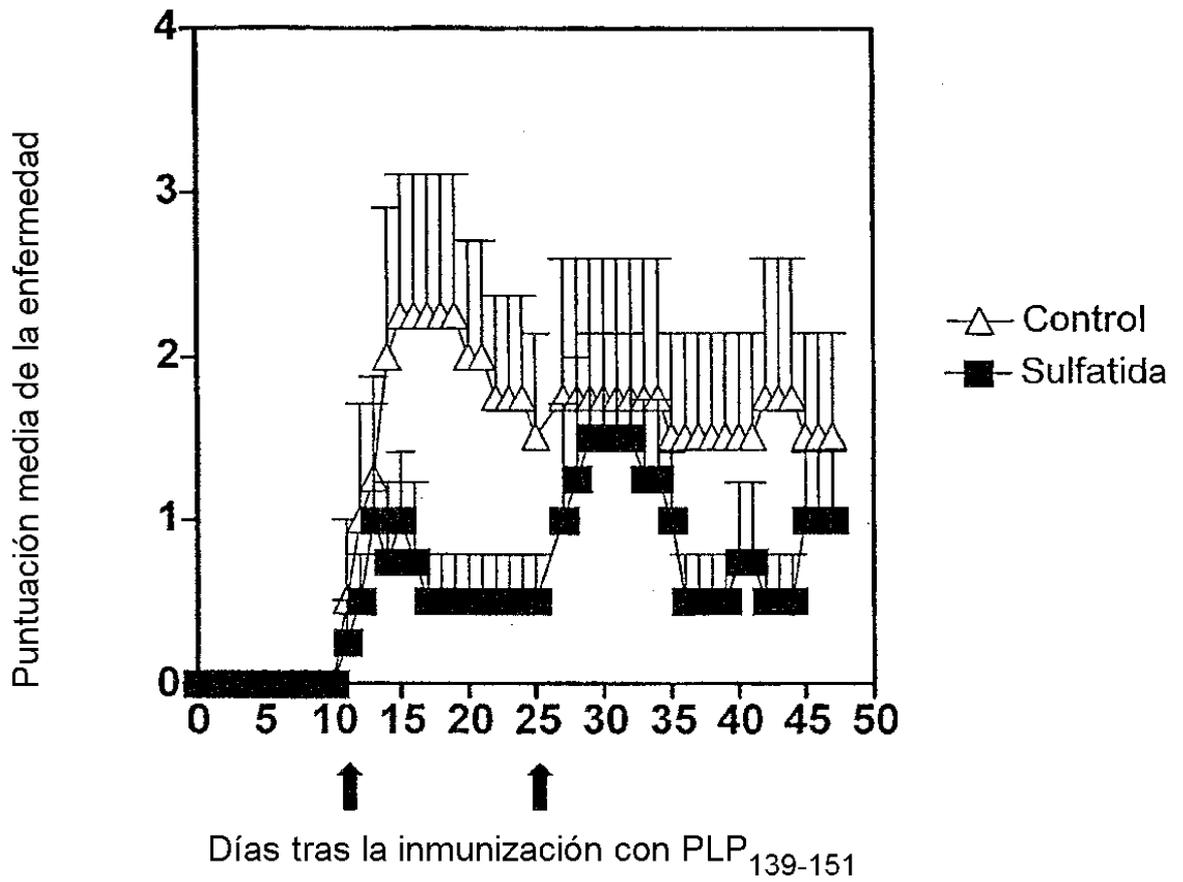


Figura 2

Días tras la inmunización con PLP₁₃₉₋₁₅₁: Días después de la inducción de la enfermedad en ratones SJL/J.

Control: Ratones tratados solamente con vehículo/PBS

Sulfatida: Ratones tratados con sulfatida (20 µg/ratón)

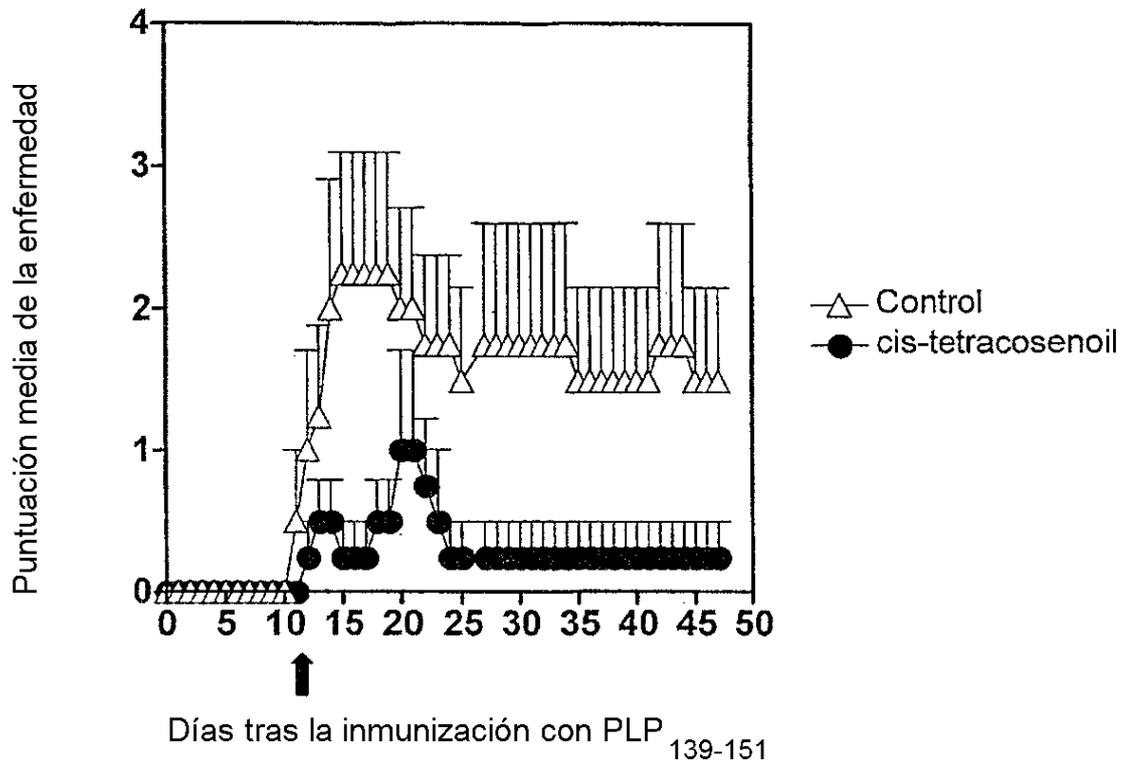


Figura 3

Días tras la inmunización con PLP₁₃₉₋₁₅₁: Días después de la inducción de la enfermedad en ratones SJL/J.

Control: Ratones tratados solamente con vehículo/PBS

Sulfatida: Ratones tratados con cis-tetracosenoil-sulfatida (20 µg/ratón)

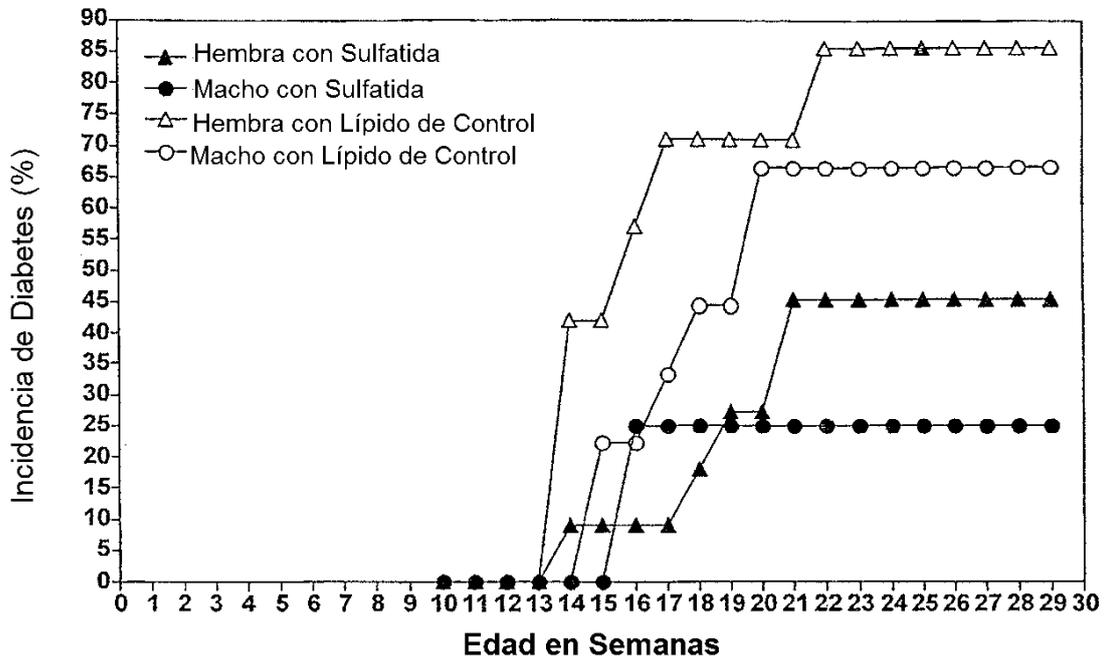


Figura 4

Edad en semanas: Edad de ratones NOD

Hembras con sulfatida: Ratones NOD hembras tratados con sulfatida

Machos con sulfatida: Ratones NOD machos tratados con sulfatida

Hembras con lípido de control: Ratones NOD hembras trataos con Mono GM1

Machos con lípido de control: Ratones NOD machos tratados con Mono GM1.

ALT Y AST EN SUERO

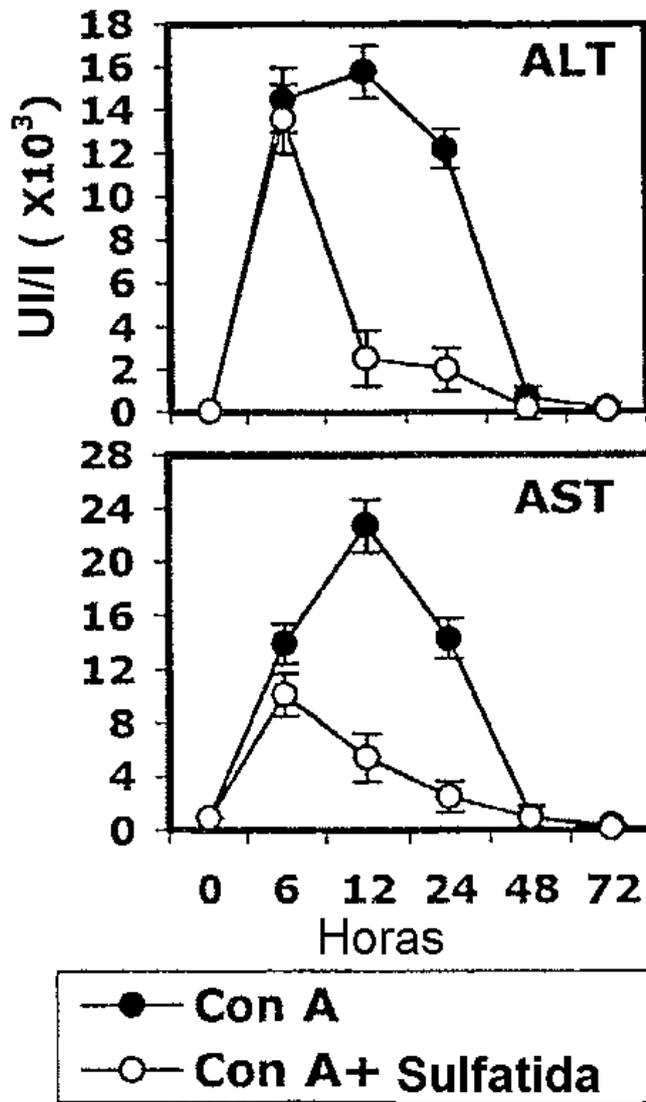


Figura 5

ALT: Alanina amino transferasa

AST: Aspartato amino transferasa

Ratones: C57.BL/6 hembras

Con A: Concanavalina A; 8,5 mg/kg/animal

Sulfatida: 1 mg/kg/animal.

Histología del Hígado

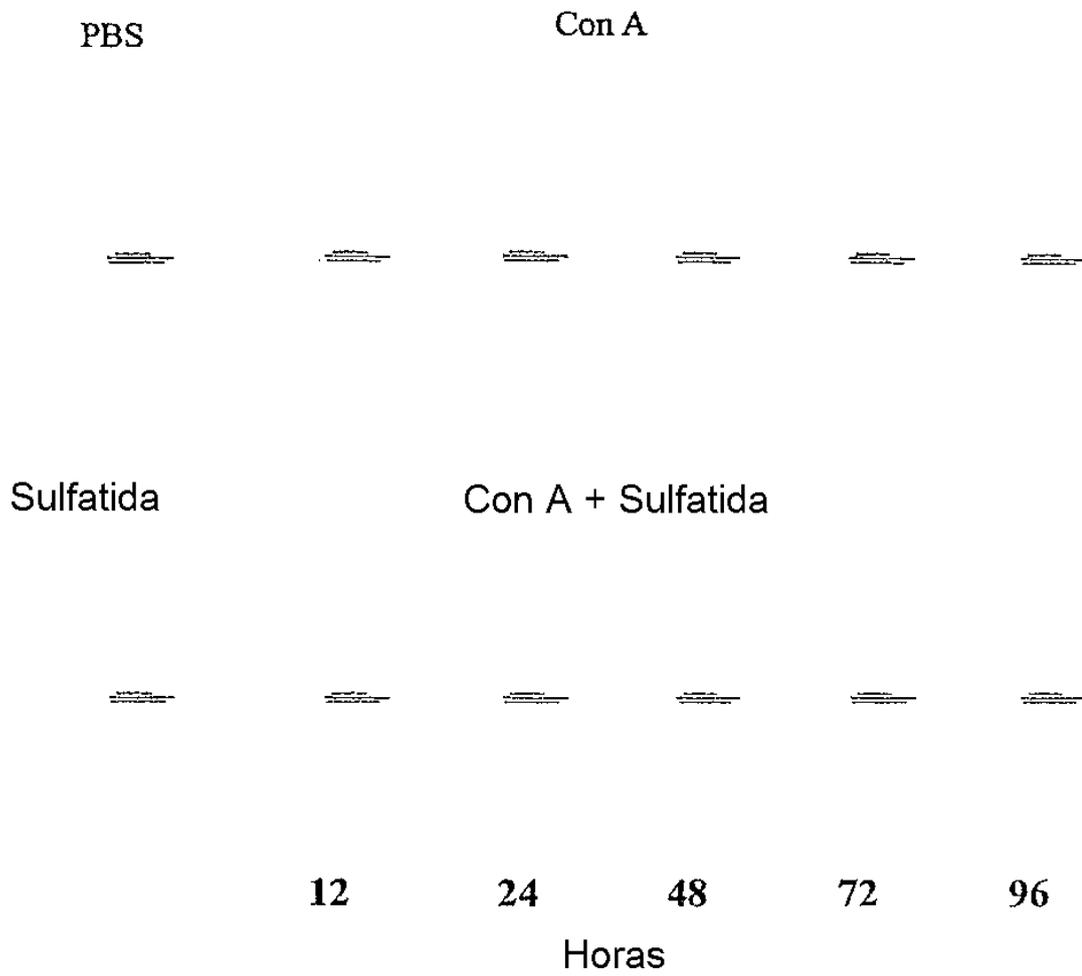


Figura 6

Ratones: C57.BL/6 hembras

Con A: Concanavalina A; 8,5 mg/kg/animal

Sulfatida: 1 mg/kg/animal

Morfología del Hígado

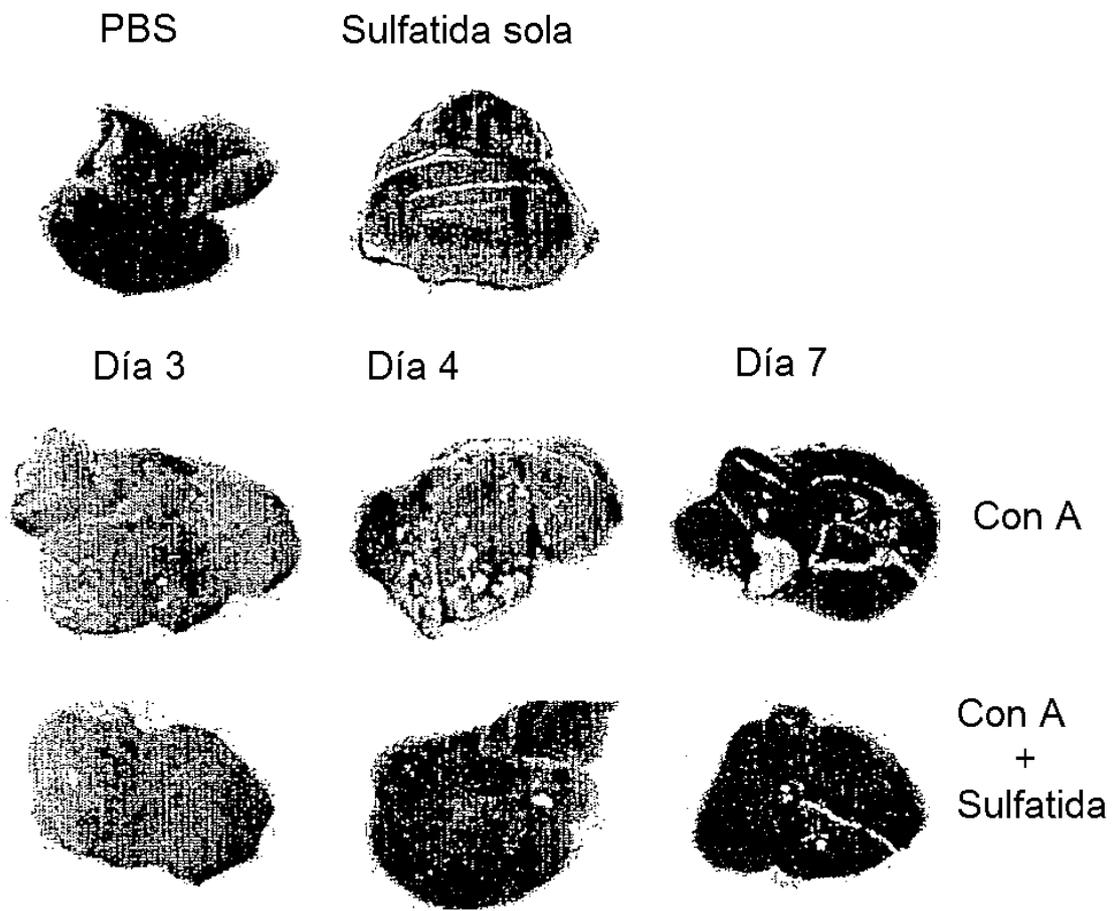


Figura 7

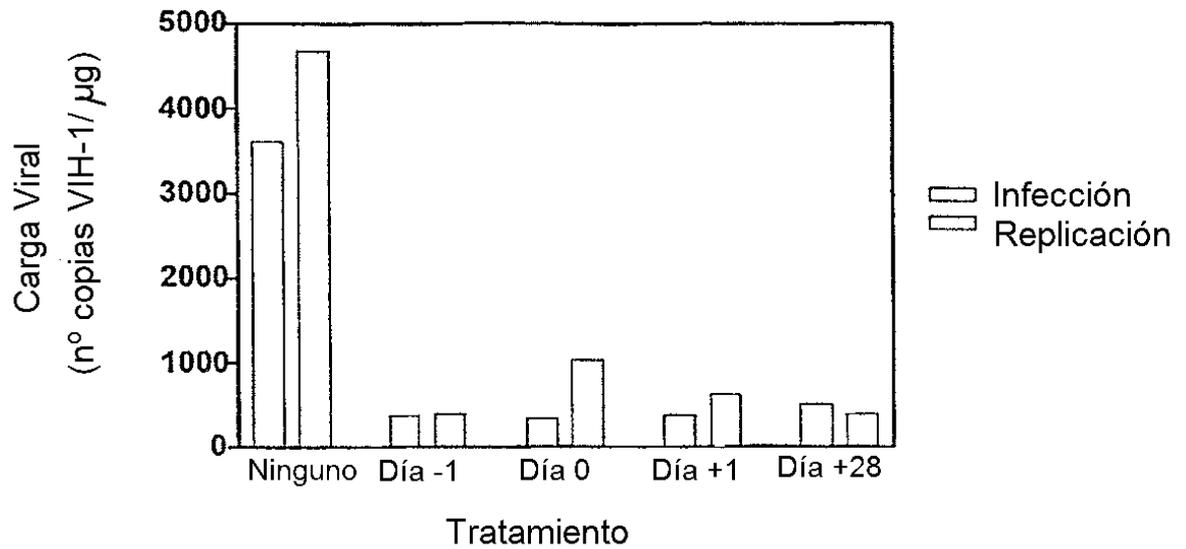


Figura 8

Ninguno: Sin tratamiento de sulfatida

Día -1: Tratado con sulfatida, 1 día antes de la infección

Día 0: Tratado con sulfatida, mismo día de la infección

Día +1: Tratado con sulfatida, un día después de la infección

Día +28: Tratado con sulfatida, cuatro semanas después de la infección

Infección: Infección con el virus VIH-1

Replicación: Replicación del virus VIH-1

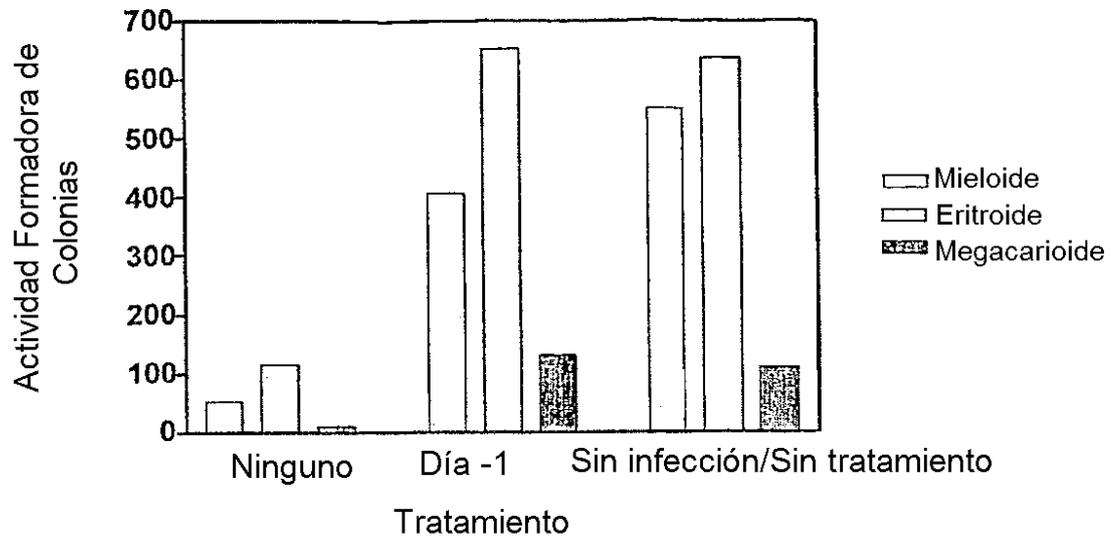


Figura 9

Ninguno: Sin tratamiento de sulfatida

Día -1: Tratado con sulfatida, 1 día antes de la infección

Sin infección/Sin tratamiento: Ausencia de infección de VIH-1 y de tratamiento con sulfatida

Mieloid: Linaje

Eritroid: Linaje

Megacarioide: Linaje