

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 393 631**

51 Int. Cl.:

A61K 31/133 (2006.01)

A61K 31/138 (2006.01)

A61K 31/4245 (2006.01)

A61K 31/661 (2006.01)

A61K 45/06 (2006.01)

A61P 25/00 (2006.01)

A61P 25/02 (2006.01)

A61P 37/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **07837041 .8**

96 Fecha de presentación: **17.08.2007**

97 Número de publicación de la solicitud: **2056807**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **13.05.2009**

54 Título: **Tratamiento de enfermedades inflamatorias**

30 Prioridad:

17.08.2006 US 838222 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:

26.12.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:

26.12.2012

73 Titular/es:

**UNIVERSITY OF CHICAGO (100.0%)
5801 SOUTH ELLIS AVENUE
CHICAGO, IL 60637, US**

72 Inventor/es:

SOLIVEN, BETTY, C.

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 393 631 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

Tratamiento de enfermedades inflamatorias

ANTECEDENTES DE LA INVENCION**A. Campo de la invención**

- 5 La presente invención se refiere en general al campo de enfermedades inflamatorias del sistema nervioso periférico. Más particularmente, se refiere a procedimientos para tratar enfermedades inflamatorias del sistema nervioso periférico mediante modulación de actividad de receptor de la esfingosina-1-fosfato.

B. Descripción de la técnica relacionada

- 10 El sistema nervioso periférico (SNP) es una diana común de ataque inmune. La polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica (PDIC) algunas veces se refiere como el homólogo en el SNP de la esclerosis múltiple (EM), que afecta al sistema nervioso central, debido a las similitudes entre las dos enfermedades en términos del curso de la enfermedad (reincidente frente a progresivo), presencia de desmielinización focal y grado variable de pérdida axonal, y patofisiología mediada inmune. Los infiltrados inflamatorios en nervios PDIC consisten principalmente en linfocitos T y macrófagos, sugiriendo que la reacción mediada por los linfocitos T hacia antígenos de mielina es una
15 causa probable de daño de tejidos en la PDIC. Las terapias eficaces para la PDIC, tal como gammaglobulina intravenosa, plasmaféresis y esteroides, son eficaces en dos tercios de pacientes, pero están asociadas a complicaciones o fallo para inducir una remisión de larga duración (Ropper, 2003). Por lo tanto, existe una necesidad acuciante de desarrollar nuevos procedimientos y agentes terapéuticos que se pueden usar solos o en combinación con modalidades de tratamiento existentes.

- 20 La solicitud PCT WO2005/025553 desvela el uso de derivados de FTY720, por ejemplo, los agonistas de la esfingosina-1-fosfato (S1P) FTY720, FTY720-P, AAL(R) y AFD(R) para el tratamiento de una serie de trastornos neurológicos, incluyendo polineuropatía reincidente crónica, que es un sinónimo de PDIC, mencionados en una larga lista de trastornos del sistema nervioso. Sin embargo, aunque el documento D1 contiene una larga lista de enfermedades que se podrían potencialmente tratar con FTY720, no proporciona ningún dato real de un efecto
25 terapéutico logrado por FTY720. Los datos experimentales proporcionados por D1 solamente muestran los efectos de FTY720 sobre la estimulación de neurogénesis, como se demuestra por la proliferación del crecimiento del SNC *in vitro*.

SUMARIO DE LA INVENCION

- 30 La presente invención se refiere a un modulador del receptor de la esfingosina-1-fosfato como se define en las reivindicaciones para usarse en el tratamiento de un trastorno del sistema nervioso periférico, seleccionado entre polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica (PDIC).

Un modulador del receptor de la esfingosina-1-fosfato se puede usar en el tratamiento de afecciones autoinmunes que afectan al músculo (por ejemplo, miositis) o unión neuromuscular (por ejemplo, miastenia).

- 35 Síntomas de trastornos del sistema nervioso periférico inflamatorios o autoinmunes incluyen, por ejemplo, hormigueo o entumecimiento (comenzando típicamente en las puntas de los pies y dedos), debilidad de los brazos, debilidad de las piernas, pérdida de reflejos profundos del tendón (arreflexia), fatiga, y sensaciones anormales. Síntomas de trastornos inflamatorios o autoinmunes del músculo incluyen, por ejemplo, debilidad muscular, atrofia muscular, dolor muscular, fatiga general, y disfagia (dificultad de deglución). Síntomas de trastornos inflamatorios o autoinmunes de la unión neuromuscular incluyen, por ejemplo, debilidad muscular, ptosis asimétrica (una caída de uno o ambos
40 párpados), diplopia (visión doble) debido a la debilidad de los músculos que controlan los movimientos de los ojos, paso inestable o vacilante, debilidad en los brazos, manos, dedos, piernas, y cuello, un cambio en la expresión facial, disfagia (dificultad de deglución), brevedad de respiración, y disartria (habla alterado). Uno o más de estos síntomas se pueden simplificar por la composición de la presente invención. Por la frase "alivio de un síntoma de un trastorno del sistema nervioso periférico inflamatorio" significa que el síntoma se hace menos grave o más
45 soportable.

- El modulador del receptor de la esfingosina-1-fosfato es FTY720, FTY720-P, AAL(R), o AFD(R). En algunos aspectos de la invención, el modulador del receptor de la esfingosina-1-fosfato es un regulador por disminución del receptor de esfingosina 1-fosfato. En otros aspectos de la invención, el modulador del receptor de la esfingosina-1-fosfato es un agonista del receptor de la esfingosina-1-fosfato. El receptor de la esfingosina-1-fosfato puede ser, por
50 ejemplo, un receptor S1P1, S1P2, S1P3, S1P4, y / o S1P5.

- El modulador del receptor de la esfingosina-1-fosfato se puede administrar al sujeto antes de la aparición de los síntomas del trastorno autoinmune del sistema nervioso periférico, o se puede administrar al sujeto después de la aparición de los síntomas del trastorno autoinmune del sistema nervioso periférico. En ciertos aspectos de la invención, el modulador del receptor de la esfingosina-1-fosfato se va a administrar al sujeto durante la remisión de
55 los síntomas del trastorno autoinmune del sistema nervioso periférico. En ciertas realizaciones de la invención, el

modulador del receptor de la esfingosina-1-fosfato se va a administrar al sujeto tanto antes como después de la aparición de los síntomas del trastorno autoinmune. El modulador del receptor de la esfingosina-1-fosfato se puede administrar mediante cualquier vía conocida por los expertos en la técnica. En ciertas realizaciones, el modulador del receptor de la esfingosina-1-fosfato se administra por vía oral o mediante inyección. Para la administración oral, el modulador del receptor de la esfingosina-1-fosfato se puede proporcionar en cualquier composición farmacéutica adecuada para la administración oral, tal como un líquido, cápsula, o comprimido. Para inyección, el modulador del receptor de la esfingosina-1-fosfato se puede proporcionar en cualquier composición farmacéutica adecuada para inyección, tal como un líquido inyectable con jeringa. La inyección puede ser, por ejemplo, intravenosa, intra-arterial, intramuscular, o subcutánea.

El modulador del receptor de la esfingosina-1-fosfato se puede administrar en una base diaria, dos veces al día, o tres veces al día. El modulador del receptor de la esfingosina-1-fosfato se puede administrar aproximadamente cada 4 horas, 6 horas, 8 horas, 12 horas, 24 horas, 48 horas, o 72 horas. En ciertos aspectos de la invención, la dosificación diaria del modulador del receptor de la esfingosina-1-fosfato administrada a un sujeto humano está entre aproximadamente 0,1 mg y 20 mg, 0,5 mg y 10 mg, 0,5 mg y 5 mg, 1 mg y 5 mg, 1,25 mg y 5 mg, 1,5 mg y 3 mg, 0,1 mg y 1 mg, o cualquier intervalo que se pueda derivar de los mismos. En algunos aspectos de la invención, el modulador del receptor de la esfingosina-1-fosfato se puede administrar cada día diferente, cada tercer día, cada cuarto día, cada quinto día, semanalmente o mensualmente. El profesional habilitado responsable de la administración de una composición de la presente invención será capaz de determinar la cantidad de dosificación apropiada, vía de administración, y frecuencia de administración mediante la determinación de los factores físicos y fisiológicos del sujeto tal como peso corporal, sexo, gravedad de la afección, e intervenciones terapéuticas previas o simultáneas.

También se contempla que el modulador del receptor de la esfingosina-1-fosfato se puede administrar en combinación con un segundo agente terapéutico. Por ejemplo, el modulador del receptor de la esfingosina-1-fosfato se puede administrar en combinación con un inmunosupresor (por ejemplo, ciclosporina A, ciclosporina G, FK-506, ABT-281, ASM981, rapamicina, 40-O-(2-hidroxi)etil-rapamicina, corticosteroides, ciclofosfamida, azatioprina, metotrexato, leflunomida, mizoribina, micofenolato mofetil, o 15-deoxiespergualina), un esteroide (por ejemplo, prednisona o hidrocortisona), una inmunoglobulina, o interferón de tipo 1. El modulador del receptor de la esfingosina-1-fosfato y el segundo agente se puede administrar de manera simultánea o consecutiva. Cuando el modulador del receptor de la esfingosina-1-fosfato y el segundo agente se administran de manera simultánea, se pueden formular en una única composición o en composiciones separadas.

El uso del término "o" en las reivindicaciones se usa para significar "y / o" salvo que se indique de manera explícita para referirse a alternativas solamente o las alternativas son mutuamente exclusivas, aunque la descripción apoya una definición que se refiere a solamente alternativas e "y / o."

A lo largo de esta solicitud, el término "aproximadamente" se usa para indicar que un valor incluye la desviación estándar de error para el dispositivo o procedimiento que se está empleando para determinar el valor.

Conforme a la ley de patentes desde hace mucho tiempo, las palabras "un" y "uno," cuando se usan de manera conjunta con la palabra "que comprende" en las reivindicaciones o memoria descriptiva, denota uno o más, salvo que se indique específicamente.

Otros objetos, características y ventajas de la presente invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Los siguientes dibujos forman parte de la presente memoria descriptiva y se incluyen para demostrar adicionalmente ciertos aspectos de la presente invención. La invención se puede entender mejor por referencia a uno o más de estos dibujos en combinación con la descripción detallada de las realizaciones presentadas en el presente documento.

FIG. 1. estructuras químicas de FTY720 y compuestos relacionados. La FIG. 1 proporciona las estructuras químicas de esfingosina, esfingosina-1-fosfato, FTY720, FTY720-P, AAL(R), y AFD(R).

FIG. 2. Potenciales de acción muscular del compuesto (PAMC). La FIG. 2 proporciona ejemplos de PAMC de estimulación del nervio ciático en ratones naturales y B7-2-/-NOD.

FIG. 3. Preparaciones de fibras disecadas a partir de nervios ciáticos. Las preparaciones de fibras disecadas muestran desmielinización segmental e internodos acortados con espesor irregular de vainas de mielina en ratones B7-2-/- NOD comparado con los ratones NOD naturales. Los nodos de Ranvier se indican con flechas.

FIG. 4. Acumulación de ceramida inducida por citocinas en células de Schwann (CS). TNF- α e IFN- γ actuaron de manera sinérgica disminuyendo la viabilidad celular mediante la inducción de NOS y acumulación de ceramida en CS inmortalizadas. La FIG. 4 muestra los niveles de ceramida como un porcentaje de controles en

las CS inducidas con TNF- α (100 g/ml) + IFN- γ (200 U/ml), L-NAME (inhibidor NOS), o TNF- α (100 g/ml) + IFN- γ (200 U/ml) + L-NAME. La inducción por citocinas fue durante 24 horas. El asterisco (*) indica $p < 0,0001$.

FIG. 5A y 5B. Efecto de FTY720 sobre puntuaciones clínicas y fuerza de agarre de ratones NOD deficientes en B7-2. Los animales se dividieron en 3 grupos: (1) agua (n = 11); (2) FTY720 a 0,3 mg/kg (n = 5); y (3) FTY720 a 1,0 mg/kg (n = 10). Se inició el tratamiento diario a los 7 meses de edad y se continuó durante 4 semanas. La FIG. 5A muestra las puntuaciones clínicas para ratones NOD deficientes en B7-2 a los 7 meses (pretratamiento) y 8 meses (después de tratamiento) para ratones administrados con vehículo (agua), FTY720 a 0,3 mg/kg, o FTY720 a 1,0 mg/kg. El asterisco (*) indica $p < 0,0007$. Por el contrario, puntuaciones clínicas de ratones tratados con FTY720 (1 mg/kg) no llegaron a ser peores. Al final de la semana 4 de tratamiento, la fuerza de agarre de la pata posterior y de la pata anterior se midió con un medidor de fuerza de agarre (Columbus Instruments). La FIG. 5B muestra los resultados de las mediciones de la fuerza de agarre de la pata posterior y de la pata anterior para ratones administradas con vehículo (agua), FTY720 a 0,3 mg/kg, o FTY720 a 1,0 mg/kg. El asterisco (*) indica $p < 0,01$. Las barras de error representan SEM.

FIG. 6A y 6B. Efecto de FTY720 sobre la latencia distal, velocidad de conducción, y amplitud de potenciales de acción muscular del compuesto ciáticos en ratones NOD deficientes en B7-2. Se realizaron estudios electrofisiológicos para determinar la función del nervio ciático en ratones tratados con FTY720 a 1,0 mg/kg o con vehículo (agua). Se determinaron la latencia distal (LD), velocidad de conducción (VC), y potenciales de acción muscular del compuesto ciáticos (PAMC). Esta figura ilustra que los ratones tratados con FTY720 a 1,0 mg/kg demostraron LD y VC mejoradas cuando se compara con los ratones tratados con vehículo, pero no demostraron amplitud mejorada de los PAMC ciáticos. La FIG. 6A muestra ejemplos de los PAMC ciáticos. FIG. 6B muestra un resumen de los datos recogidos de 12 nervios de ratones tratados con vehículo y 14 nervios de ratones tratados con FTY720 a 1,0 mg/kg. El asterisco (*) indica $p < 0,02$; doble asterisco (**) indica $p < 0,01$.

FIG. 7. Efecto de FTY720 sobre la infiltración de células inflamatorias en secciones de nervio ciático de ratones NOD deficientes en B7-2. La evaluación histológica se realizó sobre ratones NOD deficientes en B7-2 tratados con vehículo (agua, n = 6) o con FTY720 a 1,0 mg/kg (n = 7). La infiltración de células inflamatorias se midió mediante un procedimiento cuantitativo y mediante un procedimiento semicuantitativo. Esta figura demuestra que la infiltración de células inflamatorias disminuyó en las secciones de nervio ciático de ratones tratados con FTY720 cuando se compara con los ratones tratados con vehículo. El asterisco (*) indica $p < 0,02$. El doble asterisco (**) indica $p < 0,003$.

FIG. 8. Efecto de FTY720 sobre la desmielinización y pérdida de fibras mielinizadas en ratones NOD deficientes en B7-2. Se analizaron secciones Epon de ratones NOD deficientes en B7-2 tratados con vehículo (agua, n = 6) o con FTY720 a 1,0 mg/kg (n = 7). La pérdida de fibras mielinizadas se midió mediante un procedimiento cuantitativo, y la desmielinización se midió mediante un procedimiento semicuantitativo. Esta figura demuestra que la desmielinización y pérdida de fibras mielinizadas se atenuaron en ratones tratados con FTY720 cuando se compara con ratones tratados con vehículo. El asterisco (*) indica $p < 0,015$.

DESCRIPCIÓN DE REALIZACIONES ILUSTRATIVAS

A. PATOGENESIS DE POLINEUROPATÍA DESMIELINIZANTE INFLAMATORIA CRÓNICA

La polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica (PDIC) es una enfermedad inflamatoria del sistema nervioso periférico (SNP). El curso de la enfermedad puede ser recurrente o progresivo, y se caracteriza por la presencia de desmielinización focal, grado variable de pérdida axonal, y patofisiología mediada inmune. Los infiltrados inflamatorios en nervios de PDIC consisten principalmente en linfocitos T y macrófagos, sugiriendo que la reacción mediada por los linfocitos T hacia antígenos de mielina es una causa probable de daño de tejidos en PDIC. Sin embargo, las dianas antigénicas de respuestas de Linfocitos T aberrantes permanecen sin definir. Los tratamientos actuales para PDIC incluyen corticosteroides tal como prednisona, que se pueden usar solos o en combinación con fármacos inmunosupresores; plasmáferesis; e inmunoglobulina intravenosa. La fisioterapia puede mejorar la fuerza, función y movilidad muscular, y minimizar la contracción de músculos y tendones y distorsiones de las articulaciones.

La activación completa de los linfocitos T requiere la señalización mediante moléculas coestimuladoras, B7-1 y B7-2, además de la señalización específica de antígeno mediante receptores de Linfocitos T. La presentación de antígenos en la presencia de B7-1 provoca la diferenciación de los linfocitos T a un fenotipo de Th1 con expresión de interleucina-2, IFN- γ , y TNF- α , mientras que la presentación en asociación con B7-2 induce un fenotipo de Th2 con expresión predominante de IL-4 (Karandikar et al., 1998; Kuchroo et al., 1995). Consistente con el concepto anterior, existe una regulación por incremento preferencial de B7-1 en nervios de PDIC (Kiefer et al., 2000). Los estudios en ratones inactivados de CD28 revelan que CD28 se requiere para el desarrollo de neuritis alérgica experimental (NAE), un modelo animal para el síndrome Guillain-Barré (SGB) (Zhu et al., 2001b). En ratones NOD, se puede evitar diabetes mediante tratamiento con anticuerpo anti-B7-2 o mediante eliminación de la expresión B7-2, pero estas manipulaciones disparan una polineuropatía autoinmune espontánea (PAE), que imita PDIC clínicamente, histológicamente, y electrofisiológicamente (Salomon et al., 2001). El curso progresivo en este modelo es distinto del de en NAE, que es usualmente monofásica con recuperación espontánea con solamente unas pocas excepciones.

En NEA, se inmunizan animales con mielina periférica o proteínas de mielina purificadas tales como P0, P2, μ MP22, o MAG (Constantinescu et al., 1996; Kim et al., 1994; Stoll et al., 1993; Zhu et al., 2001 b).

Los linfocitos activados migran a través de la barrera sangre nervio (BSN), que depende de la interacción entre moléculas sobre linfocitos y moléculas de adhesión sobre células endoteliales. Una vez que existe una amplia infiltración mononuclear, se puede producir lesión y desmielinización de nervios periféricos mediante múltiples mecanismos. Aparte de la elaboración de compuestos citotóxicos y citocinas tales como TNF- α , macrófagos pueden penetrar aparentemente en las vainas de mielina intactas y despojar de mielina la superficie axonal (Prineas y McLeod, 1976). Las citocinas Th1 tales como TNF- α e IFN- γ actúan de manera sinérgica disminuyendo la viabilidad de las células de Schwann (CS) mediante la inducción de iNOS y acumulación de ceramida (Nagano et al., 2001). Otros han encontrado que estas citocinas inhiben la proliferación de CS y regulan por disminución la expresión de mielina glicoproteína asociada a (Chandross et al., 1996; Schneider-Schaulies et al., 1991).

Las células de Schwann juegan un papel multifuncional en neuropatías inflamatorias, que actúan como células que presentan antígeno, dianas de ataque inmune, así como una fuente de factores neurotróficos. Estas células expresan los receptores de S1P2 y S1P3; el último está regulado por disminución por un activador de la adenilato ciclasa forskolina (Bermingham et al., 2001; Weiner et al., 2001). Agentes que elevan AMPc son protectores contra NEA y disminuyen la susceptibilidad de CS a muerte celular inducida por citocinas (Kim et al., 1994; Nagano et al., 2001). El efecto protector de AMPc se puede mediar en parte mediante la regulación de la expresión de receptores de S1P sobre las CS, y la señalización de esfingolípidos puede jugar un papel importante en la supervivencia y diferenciación de las CS. Los factores que conducen a la terminación frente a persistencia de la respuesta inmune no se entienden completamente. Las células de Schwann que expresan FasL pueden contribuir a la eliminación de linfocitos T autorreactivos (Wohlleben et al., 2000). La remisión en general se asocia a la producción incrementada de IL-4, IL-10 y TGF- β .

B. SEÑALIZACIÓN DE ESFINGOLÍPIDOS EN LINFOCITOS Y CÉLULAS GLIALES

En muchos tipos de células, factores de crecimiento y citocinas se ha mostrado que modulan la actividad de las enzimas implicadas en el control del llamado reostato de ceramida/S1P, un determinante crítico del resultado celular (Cuvillier et al., 1996; Spiegel y Milstien, 2003). Las citocinas proinflamatorias tales como TNF- α e interleucina-1 activan la esfingomielinasa, pero no la ceramidasa, dando como resultado la acumulación de ceramida, mientras que PDGF y FGF regulan por incremento la ceramidasa además de la esfingomielinasa, conduciendo a una disminución en ceramida e incremento de esfingosina, que después se puede convertir en la esfingosina-1-fosfato (S1P) (Coroneos et al., 1995).

Se sabe que las plaquetas activadas, monocitos, y mastocitos secretan S1P, que da como resultado hasta concentraciones de μ M en plasma (Murata et al., 2000; Spiegel y Milstien, 1995). Por lo tanto, la S1P puede funcionar funcionalmente o bien como un mensajero intracelular o como un ligando extracelular para receptores acoplados a la proteína G S1P1-S1P5 (anteriormente llamados Edg1, Edg5, Edg3, Edg6, y Edg8, respectivamente). Los receptores de S1P están acoplados a una diversidad de proteínas G. Por ejemplo, S1P1 se acopla a Gi/o y otros miembros de la familia Gi pero no Gs, Gq, G12 o G13. La activación de S1P1 estimula la fosforilación de la proteína quinasa activada por mitógeno (PQAM), inhibe la adenilato ciclasa, y activa la fosfolipasa C que conduce a una respuesta proliferativa o migratoria (Windh et al., 1999; Zondag et al., 1998). En células endoteliales, donde los genes S1P1 y S1P3 se identificaron primero, S1P estimula la síntesis de ADN y la migración celular y promueve la integridad de la barrera endotelial (Liu et al., 2001; Schaphorst et al., 2003). Los receptores de S1P se expresan mediante muchos tipos de células, pero los subtipos de los receptor receptores predominantes difieren de un tipo de célula a otra aunque con alguna superposición.

De los receptores de S1P expresados por linfocitos T, predominan los receptores de S1P y S1P4, pero su expresión está suprimida por la activación dependiente de TCR. La S1P a bajas concentraciones (< 0,1 μ M) induce la quimiotaxis de los linfocitos T, mientras que altas concentraciones son inhibitoras (Graeler et al., 2002). Estudios iniciales en transfectantes revelaron que el receptor S1P1 es el transductor de quimiotaxis inducida por S1P, pero estudios posteriores han revelado que la sobreexpresión de S1P4 en Linfocitos T Jurkat es suficiente para inducir la motilidad celular en la ausencia de S1P exógeno (Graeler et al., 2003). Estudios *in vitro* revelan que S1P inhiben la proliferación de linfocitos T policlonales, pero no había consenso con relación a su efecto sobre la secreción de citocina. S1P potencia la secreción de IL-2 e IFN- γ por los linfocitos T humanos mientras que disminuye la secreción de IFN- γ e IL-4 por linfocitos T CD4+ murinas sin afectar a IL-2 (Dorsam et al., 2003; Jin et al., 2003). Aparte de los linfocitos, macrófagos y células dendríticas de ratones también expresan receptores de S1P (S1P1, S1P2, S1P3 y S1P5). El tratamiento de células dendríticas maduras con S1P está asociado a la emergencia de una respuesta inmune de Th2 (Idzko et al., 2002; Lee et al., 2002). Por lo tanto el resultado neto de la acción de S1P sobre la polarización de una respuesta inmune (Th1 frente Th2) *in vivo* queda por ser esclarecido.

Los receptores de S1P se expresan en células gliales. Se ha mostrado que la S1P exógena activa la cascada de ERK y modula las señales de Ca^{2+} en oligodendrocitos (OLG) (Hida et al., 1998). La S1P induce la expresión de factores de crecimiento tal como factor neurotrófico derivado de la línea celular glial en astrocitos (Sato et al., 1999; Yamagata et al., 2003). Células de linaje OLG expresan predominantemente S1P1, S1P5, y posiblemente S1P2, mientras que células de Schwann expresan los receptores de S1P2 y S1P3 (Bermingham et al., 2001; Im et al.,

2000; McGiffert y Chun; 2002; Terai et al., 2003; Weiner et al., 2001). El ácido lisofosfatídico, que actúa sobre otros receptores Edg, se ha mostrado que promueve la supervivencia y diferenciación de CS así como regulan la morfología y adhesión (Li et al., 2003; Weiner et al., 2001).

C. MODULADORES DE RECEPTORES DE ESFINGOSINA 1-FOSFATO

5 Los receptores de la esfingosina-1-fosfato (S1P) están implicados en la regulación de tráfico de linfocitos. Los receptores de la S1P se expresan en varios tipos de células implicados en la patogénesis de enfermedades inflamatorias del sistema nervioso periférico tales como células gliales, macrófagos, células endoteliales, y células de Schwann. La presente invención proporciona procedimientos para tratar enfermedades inflamatorias, tales como enfermedades inflamatorias del sistema nervioso periférico, mediante la modulación de la actividad de los receptores de S1P en pacientes.

10 El FTY720 (2-amino-2-[2-(4-octilfenil)etil]-1,3-propanodiol) es un agente inmunomodulador que se ha mostrado que es eficaz en modelos de trasplantes. Actúa secuestrando los linfocitos en órganos linfoides con linfopenia de sangre periférica concomitante y una disminución en la migración de Linfocitos T a tejidos diana (Chiba et al., 1998; Pinschewer et al., 2000; Xie et al., 2003). El FTY720 comparte una similitud estructural con esfingosina, que sugiere que actúa mediante receptores de la S1P (Brinkmann et al., 2002; Suzuki et al., 1996). Mientras que el propio FTY720 carece de actividad quimiotáctica de Linfocitos T, su forma fosforilada (FTY720-P) es un potente agonista de receptores de la S1P con la excepción de S1P2, como se detecta por el ensayo de unión de $[\gamma^{35}\text{-S}]\text{GTP } \gamma\text{S}$ sobre linfocitos Transfectadas que expresan receptores individuales de la S1P (Brinkmann et al., 2002; Mandala et al., 2002). FTY720 se convierte en FTY720-P de manera extensiva *in vivo* (Brinkmann et al., 2002).

20 La regulación por disminución o inactivación de la expresión de S1P1 por FTY720 o su forma fosforilada proporciona una explicación para el secuestro de linfocitos, similar al observado en ratones sin S1P1 (Matloubian et al., 2004). Otro modelo propuesto es que FTY720 bloquea la salida de linfocitos mediante actividad agonista de S1P1 (Brinkmann et al., 2002; Mandala et al., 2002). a concentraciones $>3 \mu\text{M}$, FTY720 induce la apoptosis de linfocitos (Matsuda et al., 1998; Oyama et al., 1998). FTY720 se ha mostrado que es eficaz en encefalomiелitis alérgica experimental (EAE) cuando se inicia el tratamiento el día de la inmunización con médula espinal bovina o MBP (Brinkmann et al., 2002; Fujino et al., 2003). FTY720 se está evaluando actualmente para el tratamiento de esclerosis múltiple (EM), trastorno inflamatorio y neurodegenerativo del sistema nervioso central (SNC) ("FTY720, una medicación oral novedosa una vez al día, muestra resultados prometedores en el tratamiento de esclerosis múltiple, "Novartis Media Release, [online] recuperada de la web mundial en novartispharma.at/download/presse/international/FTY720%20-%20ENGLISH%20-%20FINAL.pdf. acceso el 28 de junio de 2006). Sin embargo, un resultado exitoso en el trastorno del SNC no siempre se traduce en un resultado exitoso en un trastorno del SNP. Por ejemplo, el interferón- β (IFN- β) es eficaz en la disminución de la frecuencia de ataque de EM, pero su lugar en el tratamiento de PDIC y otras neuropatías inflamatorias permanece en controversia. La mejora de pacientes de PDIC que reciben IFN- β se reseñó en 2 de 4 estudios (Choudhary et al., 1995; Vallat et al., 2003; Kuntzer et al., 1999; Hadden et al., 1999).

40 El AAL(R) es un análogo metílico quiral de FTY720 y AFD(R) es un éster fosfato de AAL(R) (Kiuchi et al., 2000). El AFD(R) actúa como un agonista sobre cuatro receptores de la S1P (S1P1, S1P3, S1P4, y S1P5) (Brinkmann et al., 2002). Recientemente, se ha demostrado que el AAL(R) induce un rápido cambio fenotípico en los timocitos medulares que dan como resultado la regulación por disminución de CD69 dentro de 2 horas (Rosen et al., 2003). Estos resultados indicant que FTY720 y los compuestos relacionados ejercen acciones pleiotrópicas sobre el sistema inmune. Las estructuras de esfingosina, esfingosina-1-fosfato, FTY720, FTY720-P, AAL(R), y AFD(R) se proporcionan en la FIG. 1.

A. COMPOSICIONES FARMACÉUTICAS

45 Las composiciones farmacéuticas de la presente invención comprenden una cantidad eficaz de uno o más moduladores de la actividad de los receptores de la S1P disueltos o dispersados en un vehículo farmacéuticamente aceptable. Las expresiones "farmacéutica o farmacológicamente aceptable" se refiere a entidades y composiciones moleculares que no producen una reacción adversa, alérgica u otra desfavorable cuando se administra a un animal, tal como, por ejemplo, un ser humano, según sea apropiado. La preparación de una composición farmacéutica que contiene al menos un modulador de la actividad del receptor de la S1P se conoce bien por los expertos en la técnica de la presente divulgación, y como se ejemplifica por "Remington: The Science and Practice of Pharmacy," 21^a edición, 2005, incorporada en el presente documento por referencia. Además, para la administración humana, se entenderá que las preparaciones deben cumplir patrones de esterilidad, pirogenicidad, seguridad general y pureza como se requiere por la Oficina de la FDA de patrones Biológicos.

55 Como se usa en el presente documento, "vehículo farmacéuticamente aceptable" incluye cualesquiera y todos los disolventes, medios de dispersión, antioxidantes, sales, revestimientos, tensioactivos, conservantes (por ejemplo, p-hidroxibenzoato de metilo o propilo, ácido sórbico, agentes antibacterianos, agentes antifúngicos), agentes isotónicos, agentes de retardo de solución (por ejemplo, parafina), absorbentes (por ejemplo, arcilla de caolín, arcilla de bentonita), estabilizantes de fármacos (por ejemplo, lauril sulfato sódico), geles, ligandos (por ejemplo, jarabe, goma arábiga, gelatina, sorbitol, tragacanto, polivinilpirrolidona, carboxi metil celulosa, alginatos),

excipientes (por ejemplo, lactosa, azúcar de leche, polietileno glicol), agentes de disgregación (por ejemplo, agar-agar, almidón, lactosa, fosfato de calcio, carbonato de calcio, ácido algínico, sorbitol, glicina), agentes humectantes (por ejemplo, alcohol cetílico, monostearato de glicerol), lubricantes, aceleradores de absorción (por ejemplo, sales de amonio cuaternario), aceites comestibles (por ejemplo, aceite de almendra, aceite de coco, ésteres oleosos o propilen glicol), agentes edulcorantes, agentes aromatizantes, agentes colorantes, cargas, (por ejemplo, almidón, lactosa, sacarosa, glucosa, manitol, ácido silícico), lubricantes de compresión (por ejemplo, estearato de magnesio, almidón, glucosa, lactosa, harina de arroz, yeso), vehículos para inhalación (por ejemplo, propulsores hidrocarburos), agentes de tamponación, o materiales similares y sus combinaciones, como conocerán los expertos en la técnica (véase, por ejemplo, "Remington: The Science and Practice of Pharmacy," 21ª edición, 2005). Excepto en la medida en que cualquier vehículo convencional sea incompatible con el ingrediente activo, se contempla su uso en las composiciones terapéuticas o farmacéuticas.

En cualquier caso, la composición puede comprender diversos antioxidantes para retardar la oxidación de uno o más componentes. Los ejemplos de antioxidantes incluyen ácido ascórbico, clorhidrato de cisteína, sulfito sódico, bisulfito sódico, metabisulfito sódico, palmitato de ascorbilo, hidroxitolueno butilado, hidroxianisol butilado, lecitina, galato de propilo, y -tocoferol. Adicionalmente, la prevención de la acción de microorganismos se puede producir por conservantes tales como diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, que incluyen pero no se limitan a parabenos (por ejemplo, metilparabenos, propilparabenos), clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal o sus combinaciones.

Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen las sales de adición de ácido, por ejemplo, los formados con los grupos amino libre de una composición proteínica o que se forman con ácidos inorgánicos tales como, por ejemplo, ácido clorhídrico, bromhídrico, o fosfórico; o ácidos orgánicos tales como ácido acético, oxálico, tartárico, benzoico, láctico, fosfórico, cítrico, maleico, fumárico, succínico, napsílico, clavulánico, esteárico, o mandélico. Las sales formadas con los grupos carboxilo libres también se pueden derivar de bases inorgánicas tales como por ejemplo, hidróxidos de sodio, potasio, amonio, calcio, magnesio o férrico; o bases orgánicas tales como isopropilamina, trimetilamina, histidina o procaína.

En realizaciones en las que la composición está en una forma líquida, un vehículo puede ser un disolvente o medio de dispersión que comprende, pero no se limita a, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilen glicol, liquid polietileno glicol líquido, etc.), lípidos (por ejemplo, triglicéridos, aceites vegetales, liposomas) y sus combinaciones. El fluido apropiado se puede mantener, por ejemplo, mediante el uso de un revestimiento, tal como lecitina; mediante el mantenimiento del tamaño de partícula deseado mediante dispersión en vehículos tales como, por ejemplo, poliol líquido o lípidos; mediante el uso de tensoactivos tal como, por ejemplo, hidroxipropilcelulosa; o las combinaciones de tales procedimientos. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, tales como, por ejemplo, azúcares, cloruro sódico o sus combinaciones.

La presente invención se puede administrar mediante cualquier procedimiento adecuado conocido por los expertos en la técnica (véase, por ejemplo, "Remington: The Science and Practice of Pharmacy," 21ª edición, 2005). Las vías de administración de la composición farmacéutica incluyen, por ejemplo, oral, intradérmica, subcutánea, tópica, por inyección, infusión, infusión continua, perfusión localizada, bañando las células diana directamente, mediante un catéter, mediante un lavado, o mediante una combinación de los anteriores.

Los moduladores de la actividad del receptor de la S1P cuando se administran por vía oral pueden estar en la forma de comprimidos, cápsulas, bolsitas, viales, polvos, gránulos, pastillas, polvos reconstituibles, o preparaciones líquidas. Las soluciones inyectables estériles se preparan mediante la incorporación de los compuestos activos en la cantidad requerida en el disolvente apropiado con diversos de los ingredientes diferentes enumerados anteriormente, según se requiera, seguido de esterilización por filtración. En general, las dispersiones se preparan mediante la incorporación de diversos ingredientes activos esterilizados en un vehículo estéril que contiene el medio de dispersión básico y / o los otros ingredientes. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones, suspensiones o emulsiones inyectables estériles, los procedimientos preferidos de preparación son técnicas de secado al vacío o secado por congelación que producen un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente adicional deseado a partir de un medio líquido previamente filtrado estéril del mismo. El medio líquido debe estar adecuadamente tamponado si es necesario y el diluyente líquido hacerse isotónico antes de la inyección con suficiente solución salina o glucosa. También se contempla la preparación de composiciones altamente concentradas para inyección directa, en el que está previsto el uso de DMSO como disolvente que da como resultado una penetración extremadamente rápida, distribuyendo altas concentraciones de los agentes activos a un área pequeña.

La cantidad de dosificación real de una composición de la presente invención administrada a un paciente se puede determinar mediante factores físicos o fisiológicos tales como peso corporal, sexo, gravedad de la afección, el tipo de enfermedad que se está tratando, intervenciones terapéuticas previas o concurrentes, idiopatía del paciente, tiempo de la administración, velocidad de excreción del compuesto particular, y de la vía de administración. El profesional habilitado responsable de la administración determinará, en cualquier caso, la concentración del (de los) ingrediente (s) activo (s) en una composición y la (s) dosis apropiada (s) para el sujeto individual.

En realizaciones particulares, la absorción prolongada de una composición inyectable se puede producir mediante el

uso en las composiciones de agentes que retrasan la absorción, tal como, por ejemplo, monoestearato de aluminio, gelatina o sus combinaciones.

E. EJEMPLOS

5 Los siguientes ejemplos se incluyen para demostrar las realizaciones preferidas de la invención. Los expertos en la técnica apreciarán que las técnicas desveladas en los ejemplos que siguen representan técnicas descubiertas por el inventor para funcionar bien en la práctica de la invención, y de este modo se pueden considerar que constituyen los modos preferidos para su práctica.

EJEMPLO 1

Polineuropatía autoinmune espontánea (PAE) en ratón NOD deficiente en B7.2

10 En el curso de un esfuerzo para examinar el papel de las señales coestimuladoras en el ratón NOD, se descubrió que la eliminación de la expresión de B7-2 previene el desarrollo de hiperglucemia en estos ratones. Sin embargo, estos ratones desarrollaron paresia de la pata posterior simétrica que comienza a las 24 semanas de edad (Salomon et al., 2001). Estudios de conducción nerviosa realizados en los nervios ciáticos *in vivo* revelaron una prolongación de latencias distales, notable ralentización de las velocidades de conducción, y dispersión de potenciales de acción muscular del compuesto (PAMC), como se muestra en la FIG. 2. la latencia motora distal era $1,1 \pm 0,1$ EM (n = 8) en peso de NOD y $2,7 \pm 0,4$ EM en ratones B7.2-/- NOD (p < 0,005). Velocidad de conducción era $50,5 \pm 3,8$ m/s en peso de NOD, y $17,9 \pm 3,2$ m/s en ratones B7.2-/- NOD ratones (p < 0,00001). La amplitud de PAMC era $10,8 \pm 1,5$ mV en peso de NOD y $3,0 \pm 0,6$ mV en ratones B7.2-/- NOD (p < 0,005). El bloque de conducción parcial, definido como el 30% de disminución en amplitud con estimulación proximal frente a distal, se observó en algunos, pero no en todos, los animales, probablemente relacionado con el número limitado de nervios estudiados. Estos hallazgos electrofisiológicos son clásicos para un proceso de desmielinización con pérdida axonal superpuesta.

La evaluación histológica reveló que la presencia infiltrados inflamatorios en los ganglios de la raíz dorsal (GRD) y nervios ciáticos, pero no en el SNC de ratones B7-2-/- NOD. Esto era una pérdida significativa de axones de gran diámetro y evidencia de fibras mielinizadas finamente sobre secciones de nervio ciático. La preparación de fibras disecadas mostró desmielinización segmental e internodos acortados con espesor irregular de vainas de mielina consistente con reparación de mielina progresiva (FIG. 3). Algo de alguna remielinización produce puntos para la potencial reversibilidad de del proceso. La polineuropatía autoinmune espontánea (PAE) se induce en ratones NOD-SCID por linfocitos T CD4+ aislados de animales afectados, pero no en estudios de transferencia pasiva usando suero de animales afectados. Estos estudios demuestran que el ratón NOD deficiente en B7-2 constituye el primer modelo de polineuropatía autoinmune espontánea que se parece a la PDIC patológica humana; y que los individuos propensos a autoinmune tienen disfunción inmune que se puede manifestar como entidades patológicas distintas dependiendo del medio coestimulador.

EJEMPLO 2

Efecto sinérgico de citocinas proinflamatorias sobre co-cultivos de CS y (DRG)-SC de ganglios de la raíz dorsal

35 TNF- α e IFN- γ (marcados como citocinas) actúan de manera sinérgica disminuyendo la viabilidad celular mediante inducción de NOS y acumulación de ceramida en CS inmortalizadas (FIG. 4) (Nagano et al., 2001). Ninguna de las citocinas solas inducían muerte celular. Estas citocinas también ejercen una acción inhibidora sinérgica sobre la mielinización en co-cultivos de DRG-SC neonatales, que es evidente después de 3 días de tratamiento. No se observó ningún efecto sobre la mielinización con IFN- γ a 50-300 U/ml o bajas concentraciones de TNF- α (10 ng/ml), aunque se observó una moderada acción inhibidora a 100 ng/ml de TNF- α . Se observó muerte celular inducida por citocinas que afecta a las CS y neuronas en co-cultivos tratados durante 7 días.

EJEMPLO 3

Efecto de FTY720 sobre la gravedad de AP en ratones NOD deficientes en B7-2

45 Se ha visto que el FTY720 inhibe la emigración de linfocitos desde los órganos linfoides, y su forma fosforilada ha mostrado que es un potente agonista en cuatro receptores de S1P (Brinkmann et al., 2002; Graler y Goetzl, 2004; Matloubian et al., 2004). Estudios recientes sugieren que el efecto de estos fármacos *in vivo* se puede deber a la regulación hacia debajo de los receptores de S1P por FTY720 o su forma fosforilada (Brinkmann et al., 2002; Grater y Goetzl, 2004; Matloubian et al., 2004). La principal consecuencia de estos agentes es el secuestro de linfocitos en órganos linfoides secundarios, aunque se observó apoptosis a altas concentraciones (Brinkmann et al., 2002; Mandala et al., 2002; Nagahara et al., 2000). La administración oral de FTY720 evita EAE cuando se proporciona en el momento de la inmunización (Brinkmann et al., 2002; Fujino et al., 2003). Sin embargo, previamente no estaba claro si FTY720 o su análogo quiral AAL(R) sería eficaz cuando se administra después del comienzo de la enfermedad.

55 Dado su parecido con PDIC, el ratón NOD deficiente en B7-2 ofrece una oportunidad única para estudiar agentes

que pueden detener la progresión de la enfermedad o potenciar la recuperación en neuropatías autoinmunes. En este modelo de neuropatía autoinmune espontánea, la aparición de los síntomas se produce entre 24 y 28 semanas. Los ratones que se dejan sin tratar se deteriorarán hasta el punto de tetraparesia en 32 semanas.

5 Se usaron ratones hembra NOD deficientes en B7-2 ya que son más propensos a desarrollar SAP que sus parejas macho (Salomon et al., supra). Los ratones eran de 7 meses de edad al comienzo del estudio. A los animales se les proporcionó FTY720 (solución acuosa) una dosis de 0,3 mg/kg o 1 mg/kg o vehículo solo mediante sonda nasogástrica oral una vez al día durante 1 mes. Las concentraciones se eligieron basándose en estudios de dosis - respuesta con relación al agotamiento de linfocitos periféricos, y los datos de los estudios EAE en ratas (Brinkmann et al., 2002; Fujino et al., 2003).

10 Para determinar el efecto de FTY720 sobre puntuaciones clínicas y fuerza de agarre en ratones NOD deficientes en B7-2, se realizaron tanto determinación cualitativa como cuantitativa mediante personal de laboratorio ciego. Para la determinación cuantitativa, se usó una escala nominal (con 0 como normal y 5 como muerto) descrito por otros investigadores (Zhu et al., 2001 a). Para la determinación cuantitativa, se midió la fuerza de la pata posterior y de la anterior con un medidor de la fuerza de agarre (Columbus Instruments). Los animales tratados durante 1 mes con 15 mg/kg de FTY720 (n = 10) mostró menos debilidad cualitativamente y cuantitativamente mayor fuerza de agarre cuando se compara con los animales tratados con vehículo (n = 11) o animales tratados con solamente 0,3 mg/kg de FTY720 (n = 5) (FIG. 5A y 5B). La diferencia en puntuación clínica entre ratones tratados con agua a los 7 meses y a los 8 meses era estadísticamente significativo, con un valor de p de menos de 0,0007 (FIG. 5a). Del mismo modo, la diferencia en puntuación clínica entre ratones tratados con 0,3 mg/kg FTY720 a los 7 meses y a los 8 meses era estadísticamente significativo, con un valor de p de menos de 0,03. Al contrario que a los ratones tratados con 20 vehículo y ratones tratados con 0,3 mg/kg de FTY720, las puntuaciones clínicas de ratones tratados con 1,0 mg/kg de FTY720 no se incrementaban entre el mes 7 y el mes 8. Se observaron resultados similares cuando la fuerza de la pata anterior y de la pata posterior se determinó cuantitativamente. Los ratones tratados con 1,0 mg/kg de FTY720 mostraron una fuerza de agarre aumentada comparada con ratones tratados con vehículo o con 0,3 mg/kg de 25 FTY720 (FIG. 5B). Estos resultados indican que FTY720 puede ser beneficioso incluso cuando se proporciona después de la aparición de los síntomas.

La eficacia de FTY720 también se controló mediante la inducción de linfopenia de sangre periférica. El recuento de linfocitos de sangre periférica disminuyó hasta 50 - 60% de los tratados con vehículo por FTY720 (0,3 mg/kg) (n = 4) y hasta 25 - 30% por FTY720 (1 mg/kg) (n = 3).

30 Se realizaron estudios electrofisiológicos para determinar el efecto de FTY720 sobre la función del nervio ciático *in vivo* en un subconjunto de los animales de estudio. Los ratones tratados con 1,0 mg/kg de FTY720 demostraron una latencia distal (DL) mejorada y velocidad de conducción (CV) comparado con los ratones control tratados con agua, pero no demostraron amplitud mejorada de los potenciales de acción muscular del compuesto ciáticos (PAMC) (Tabla 1). La Figura 6 del mismo modo ilustra que el tratamiento con FTY720 mejora la DL y CV (FIG. 6B, que muestra un resumen de los resultados de los experimentos realizados sobre 12 nervios a partir de 6 ratones tratadas con agua y 14 nervios de ratones tratados con 7 FTY720) pero no la amplitud de los PAMC ciáticos (FIG. 6A).

Tabla 1

| | Vehículo | FTY720 (1 mg/kg) (* p < 0,02; **p < 0,01) |
|--------------------------------------|-----------------|--|
| Latencia Distal (ms) | 2,59 ± 0,3 | 1,58 ± 0,3* |
| Velocidad de conducción (m/s) | 14,7 ± 3,0 | 22,8 ± 3,2** |
| Amplitud (mV) | 3,75 ± 1,8 | 3,8 ± 0,7 |

40 Para evaluar además el efecto de FTY720 sobre ratones NOD deficientes en B7-2, se realizó evaluación histológica para determinar la infiltración de células inflamatorias. Usando o bien el procedimiento cuantitativo o semicuantitativo, los ratones tratados con 1,0 mg/kg de FTY720 (n = 7) mostraron infiltración de células inflamatorias disminuida en comparación con ratones tratados con agua (n = 6) (FIG. 7). Estas diferencias observadas eran estadísticamente significativas con un valor de p de menos de 0,02 cuando se compara ratones tratados con agua con ratones tratados con FTY720 usando el procedimiento cuantitativo y un valor de p de menos de 0,003 cuando se 45 hace la comparación usando el procedimiento semicuantitativo. Para el procedimiento cuantitativo, se midieron áreas de tejido mediante análisis de imagen y el número de células inflamatorias contadas a aumento de x 20. Los resultados se promediaron y se expresaron las células por mm² de sección de tejido. Para el procedimiento semicuantitativo, se graduó la inflamación como: 1, una pocas células inflamatorias mononucleares dispersadas a menudo subperineuriales; 2, manguito perivenular con células inflamatorias mononucleares (uno o dos focos); 3, manguito multifocal perivenular extensivo e inflamación endoneurial muy extendida. 50

El tratamiento con FTY720 también prevenía la desmielinización y pérdida de fibras mielinizadas. Se prepararon secciones Epon a partir de ratones tratados con vehículo (n = 6) y ratones tratados con 1,0 mg/kg de FTY720 (n = 7). Los ratones tratados con FTY720 mostraron una disminución en el porcentaje de fibras mielinizadas perdidas y un incremento en la desmielinización (FIG. 8). Estas diferencias eran estadísticamente diferentes con un valor de p de menos de 0,015. El porcentaje de pérdida de fibras mielinizadas en secciones epon se determinó por un observador ciego usando una cuadrícula. Se graduó la desmielinización como sigue: 1, axones demielinizados aislados perivascularmente o dispersos; 2, muchos focos de desmielinización perivascular; 3, desmielinización extensiva, perivascular y confluyente.

EJEMPLO 4

10 Investigación del efecto de FTY720 sobre la permeabilidad de la Barrera Sangre Nervio

Experimentos adicionales determinarán si FTY720 y compuestos relacionados, tal como el agonista SEW2871 de S1P1, pueden atenuar la interrupción de la barrera sangre nervio (BSN) cuando se proporciona después del comienzo de la enfermedad. Para investigar el efecto de FTY720 sobre la permeabilidad de la BSN, se inyecta azul de Evans (AEB) por vía intravenosa a ratones NOD deficientes en B7-2 1 antes del sacrificio. Ratones tratados con vehículo se comparan con ratones el día 1 de tratamiento con FTY720 y el día 3 de tratamiento con FTY720. Se toman imágenes confocales de AEB con formación de imágenes DIC de secciones longitudinales del nervio ciático usando condiciones similares (por ejemplo, la misma lente, potencia láser, tamaño de agujero de alfiler, etc.). Si la pérdida de AEB en los tejidos nerviosos se atenúa por FTY720, este resultado indicará que el efecto terapéutico de FTY720 está mediado al menos en parte aliviando la ruptura de la BSN. Los resultados negativos (es decir, sin efecto sobre la capacidad de AEB de cruzar la BSN) implicaría que la capacidad de FTY720 de disminuir la infiltración inflamatoria en las secciones del nervio ciático en ratones SAP se produce por una disminución de la migración de infocitos a los órganos diana en lugar de una acción predominante sobre los receptores de S1P1 y / o S1P3 expresados por células endoteliales.

Experimentos adicionales también determinarán si, en este modelo de ratón, la inmunorreactividad de esplenocitos hacia antígenos supuestos se altera por FTY720 y compuestos relacionados. Se aislarán esplenocitos de ratones SAP tratados con vehículo, FTY720, o compuestos relacionados con FTY720. La proliferación de esplenocitos controlada por la incorporación de timidina (por ejemplo, ensayo de ³H-timidina). También se determinaron la producción de citocina en respuesta al péptido de la proteína P0 (180 - 199) (10 - 20 µg/ml), péptido de la proteína P2 (57 - 81) (10 - 20 µg/ml), mielina de SNP purificada (100 µg/ml), y lisado de CS (100 µg/ml). Una disminución en la proliferación de esplenocitos y producción de citocinas indicarían que la activación de los linfocitos T se disminuye en respuesta a FTY720 y compuestos relacionados. Esto indicaría que estos compuestos pueden actuar a tantota fase temprana (cebado) como la tardía (efector) de la enfermedad.

EJEMPLO 5

Investigación del papel de los receptores de S1P en células de Schwann (CS)

CS purificadas de nervios ciáticos de rata neonatales se tratan con TNF-α (100 ng/ml) + IFN-γ (200 U/ml) durante 48 a 72 hrs en condiciones sin suero con o sin FTY720-P (0,01-1 µM). Las dosificaciones de TNF-α e IFN-γ establecidas se basan en estudios previos (Nagano et al., 2001). Para determinar si FTY720-P puede disminuir la muerte de las CS, se ensayó el nivel de apoptosis celular después de la tinción nuclear mediante yoduro de propidio y mediante el ensayo de azul de tripano. Si FTY720-P disminuye la muerte de las CS, se usan procedimientos de ARNsi para determinar qué subtipo de receptor de S1P media este efecto. Este planteamiento también se puede emplear para determinar si agonistas de la S1P diferentes de FTY720-P, tales como S1P o SEW2871, pueden inhibir la muerte de las CS.

En el caso de que FTY720-P u otros agonistas de receptores de la S1P inhiban la muerte de las CS, se realizan experimentos adicionales para examinar el efecto de FTY720-P y otros agonistas de receptores de la S1P sobre la fosforilación de ERK1/2 y Akt, que son moléculas de señalización ligadas a la supervivencia y proliferación celular. Si no se observa ningún efecto en los ensayos de supervivencia, proliferación y fosforilación, este resultado implicaría que los receptores de la S1P no son críticos para la supervivencia, diferenciación, o mielinización de las CS. Resultados posteriores de los estudios anteriores indicarían que los receptores de la S1P pueden servir como dianas potenciales para los agentes glioprotectores.

50 REFERENCIAS

- Bermingham et al., J Neurosci. Res., 63: 516 - 524, 2001.
- Brinkmann et al., J. Biol. Chem., 277: 21453 - 21457, 2002.
- Chandross et al., Molec. Cell Neurosci., 7: 479 - 500, 1996.
- Chiba et al., J Immunol., 160: 5037 - 5044, 1998.

- Choudhary et al. , J. Neurol., 242: 252 - 253, 1995.
- Constantinescu et al., J Neurol. Sci., 143: 14 - 18, 1996.
- Coroneos et al., J. Biol. Chem., 270: 23305 - 23309, 1995.
- Cuvillier et al., Nature, 381: 800 - 803, 1996.
- 5 Dorsam et al., J. Inmunol., 171: 3500 - 3507, 2003.
- Fujino et al., J. Pharmacol. Exp. Ther., 305: 70 - 77, 2003.
- Graeler et al., J. Inmunol., 169: 4084 - 4087, 2002.
- Graler et al., J Cell Biochem., 89: 507 - 519, 2003.
- Graler and Goetzl, FASEB J., 16: 1874 - 1878, 2004.
- 10 Hadden et al., Neurology, 53: 57 - 61, 1999.
- Hida et al., J. Neurosci., 18: 8712 - 8719, 1998.
- Idzko et al., FASEB J., 16: 625 - 627, 2002.
- Jin et al., Blood, 101: 4909 - 4915, 2003.
- Karandikar et al., J. Neuroimmunol., 89: 10 - 18, 1998.
- 15 Kiefer et al., J Neurol. Neurosurg. Psychiat., 69: 362 - 368, 2000.
- Kim et al., J. Neuroimmunol., 51: 177 - 183, 1994.
- Kiuchi et al., J. Med. Chem., 43: 2946 - 2961, 2000.
- Kuchroo et al., Cell, 80: 707 - 718, 1995.
- Kuntzer et al., Neurology, 53: 1364 - 1365, 1999.
- 20 Lee et al., Biochim. Biophys. Acta, 1582: 175 - 177, 2002.
- Li et al., J. Biol. Chem., 278: 9585 - 9591, 2003.
- Liu et al., Am. J. Respir. Cell Mol. Biol., 24: 711 - 719., 2001.
- Mandala et al., Science, 296: 346 - 349, 2002.
- Matloubian et al., Nature. 427: 355 - 360, 2004.
- 25 Matsuda et al., Transplant Proc., 30: 2355 - 2357, 1998.
- McGiffert and Chun, FEBS Lett., 531(1): 103 - 108,2002.
- Murata et al., Biochem. J., 352(3): 809 - 815, 2000.
- Nagahara et al., Immunopharmacology, 48: 75 - 85, 2000.
- Nagano et al., J. Neurochem., 77: 1486 - 1495, 2001.
- 30 Novartis Media Release, "FTY720, a novel once - daily oral medication, shows promising results in treatment of multiple sclerosis," [online] recuperado de <http://www.novartispharma.at/download/presse/international/FTY720%20-%20ENGLISH%20-%24FINAL.pdf>.
- Oyama et al., Jpn. J. Pharmacol., 76: 377 - 385, 1998.
- Pinschewer et al., J. Inmunol., 164: 5761 - 5770, 2000.
- 35 Prineas and McLeod, J. Neurol. Sci., 27: 427 - 458, 1976.
- Remington's Science and Practice of Pharmacy, 21^a Ed., Mack Printing Company, 2005.
- Ropper, Neurol., 60: S16 - S22, 2003.

- Rosen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos, 100: 10907 - 10912, 2003.
- Salomon et al., J. Exp. Med., 194: 677 - 684, 2001.
- Sato et al., Brain Res. Mol. Brain Res., 74: 182 - 189, 1999.
- Schaphorst et al., Am. J. Physiol./ Lung Cell Mol. Physiol., 285: 258 - 267, 2003.
- 5 Schneider - Schaulies et al., Neuron., 7: 995 - 1005, 1991.
- Spiegel and Milstien, J. Membr. Biol., 146: 225 - 237, 1995.
- Spiegel and Milstien, Molec. Cell Biol., 4: 397 - 40, 2003.
- Stoll et al., J. Neuroimmunol., 45: 175 - 182, 1993.
- Suzuki et al., Transplant Proc., 28: 1375 - 1376, 1996.
- 10 Terai et al., Neurosci., 116: 1053 - 1062, 2003.
- Vallat et al., Neurology, 60: S23 - 28, 2003.
- Weiner et al., J. Neurosci., 21: 7069 - 7078, 2001.
- Windh et al., J. Biological Chem., 274: 27351 - 27358, 1999.
- Wohlleben et al., Glia, 30: 373 - 381, 2000.
- 15 Xie et al., J. Immunol., 170: 3662 - 3670, 2003.
- Yamagata et al., Glia, 41: 199 - 206, 2003.
- Zhu et al., Exp. Neuro., 169: 472 - 478, 2001 a.
- Zhu et al., J. Neuroimmunol., 114: 114 - 121, 2001b.
- Zondag et al., Biochem. J., 330(2): 605 - 609, 1998.
- 20

REIVINDICACIONES

1. Composición farmacéutica que comprende FTY720, FTY720-P, AAL(R), o AFD(R) para uso en el tratamiento de polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica (PDIC) en un sujeto.
- 5 2. Composición para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la composición se va a administrar al sujeto antes o después de la aparición de los síntomas de la polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica (PDIC).
3. Composición para uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, estando la composición adaptada para la administración oral.
- 10 4. Composición para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la composición se va a administrar en combinación con una cantidad eficaz de un inmunosupresor, de un corticosteroide, o de una inmunoglobulina.
5. Composición farmacéutica que comprende FTY720, FTY720-P, AAL(R), o AFD(R) para uso en el alivio de un síntoma de polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica (PDIC) en un sujeto.
6. Composición farmacéutica que comprende FTY720, FTY720-P, AAL(R), o AFD(R) para uso en la prolongación del tiempo de recaída de polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica (PDIC).

15

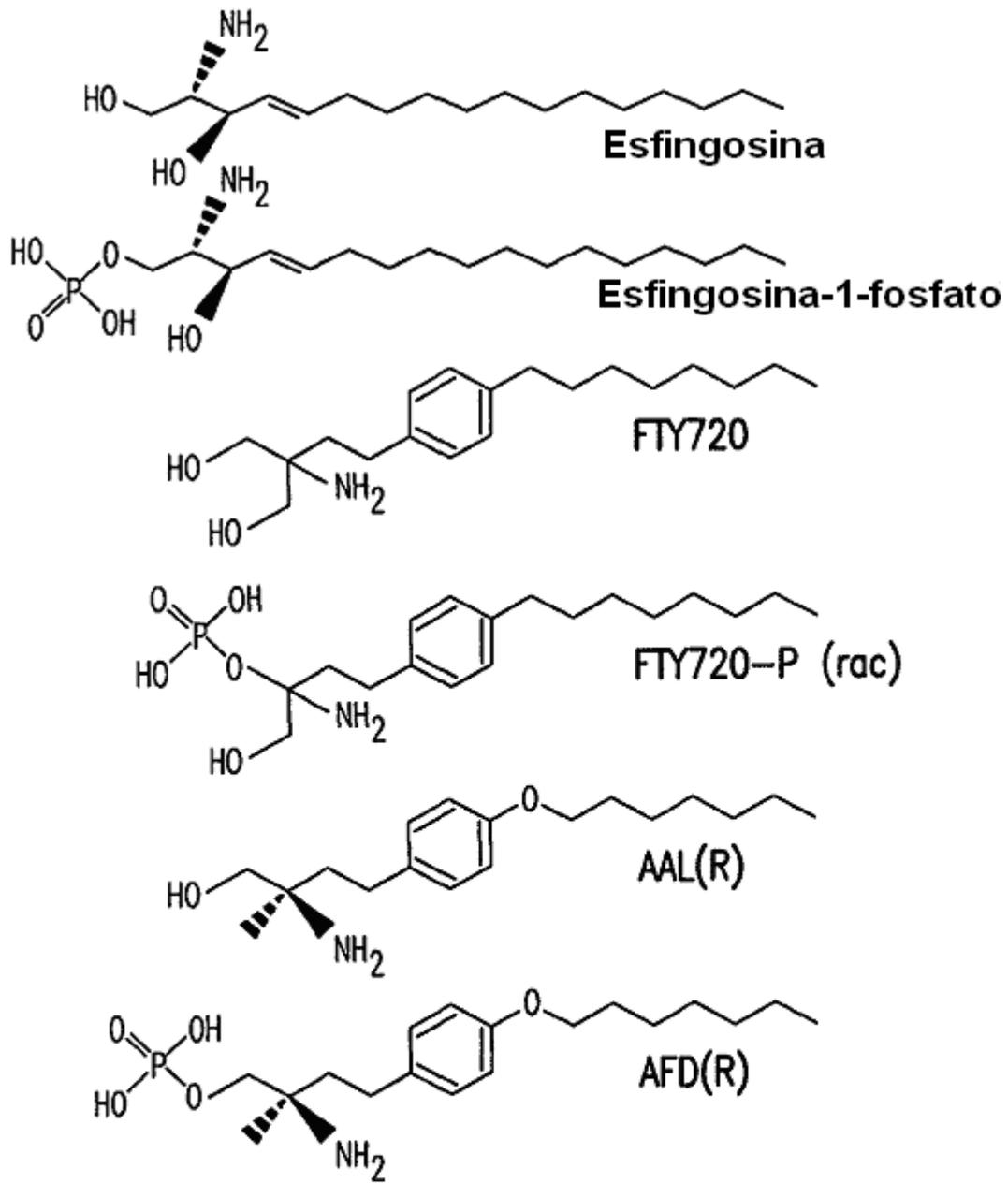


FIG. 1

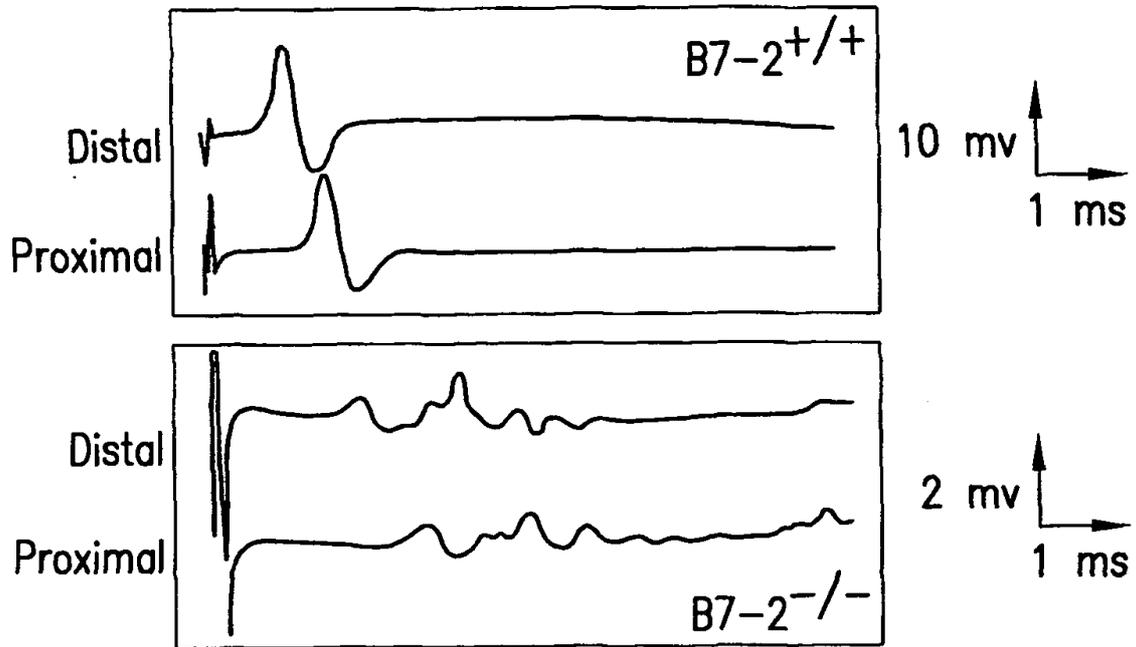


FIG.2

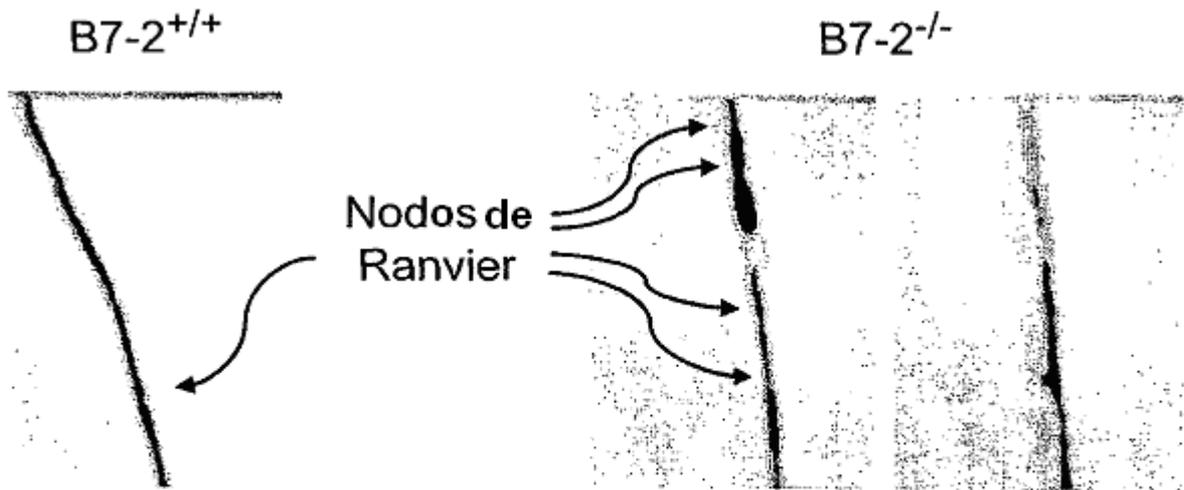


FIG.3

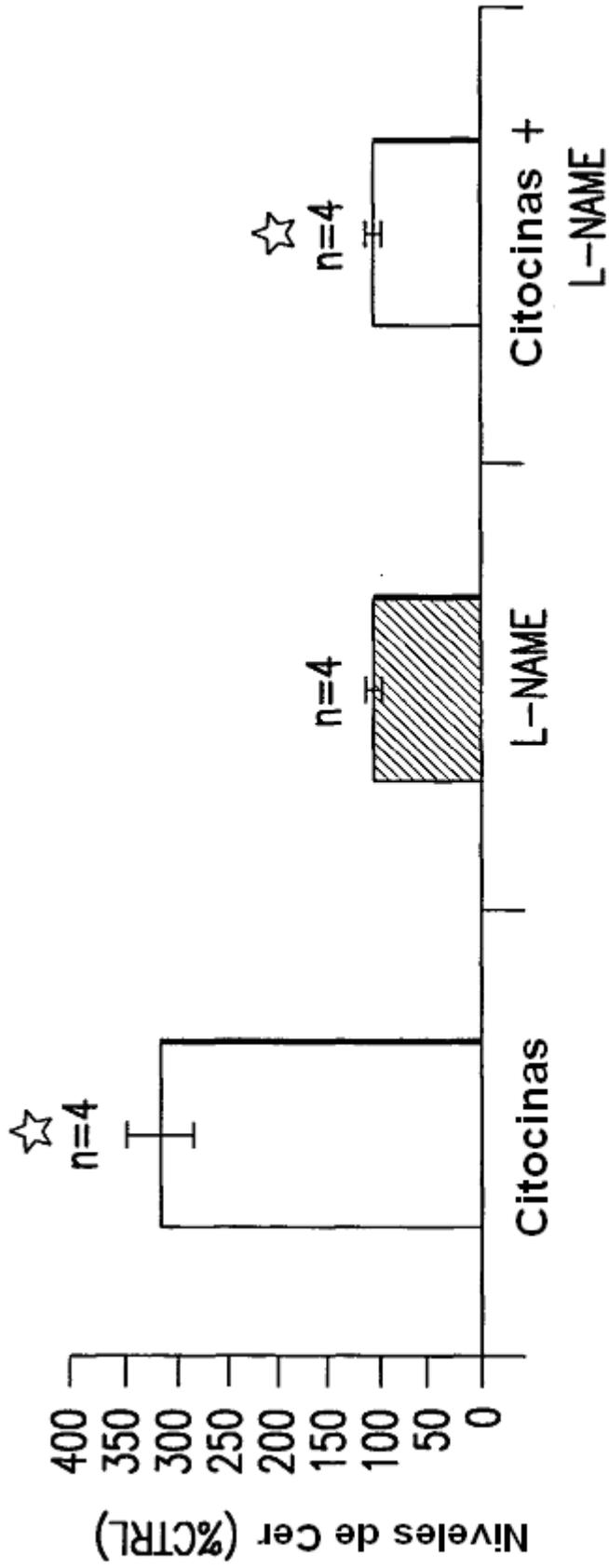


FIG.4

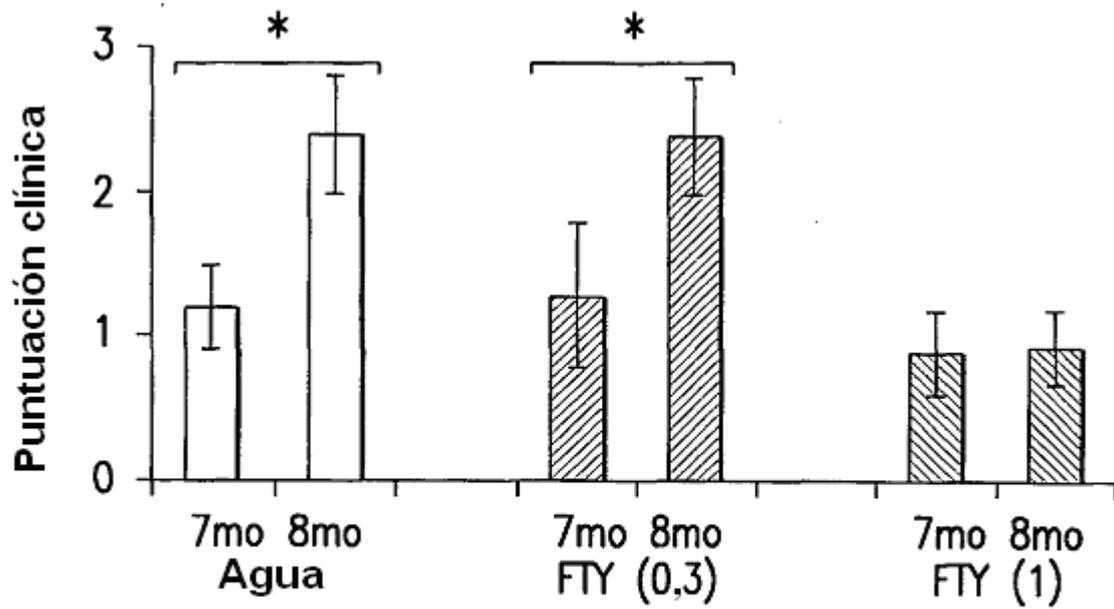


FIG.5A

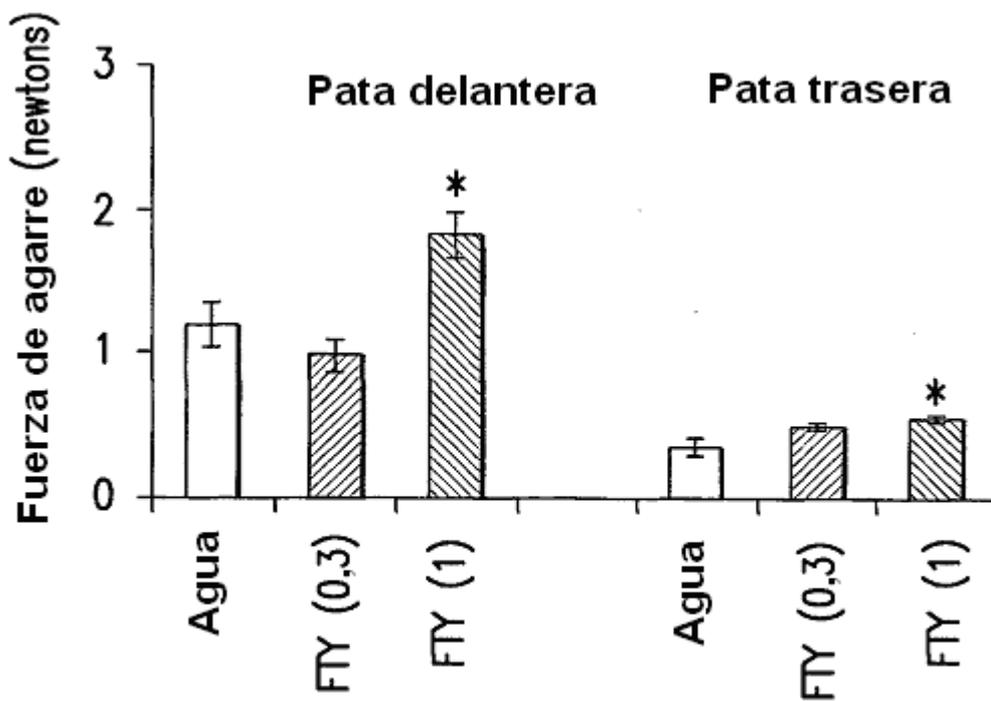


FIG.5B

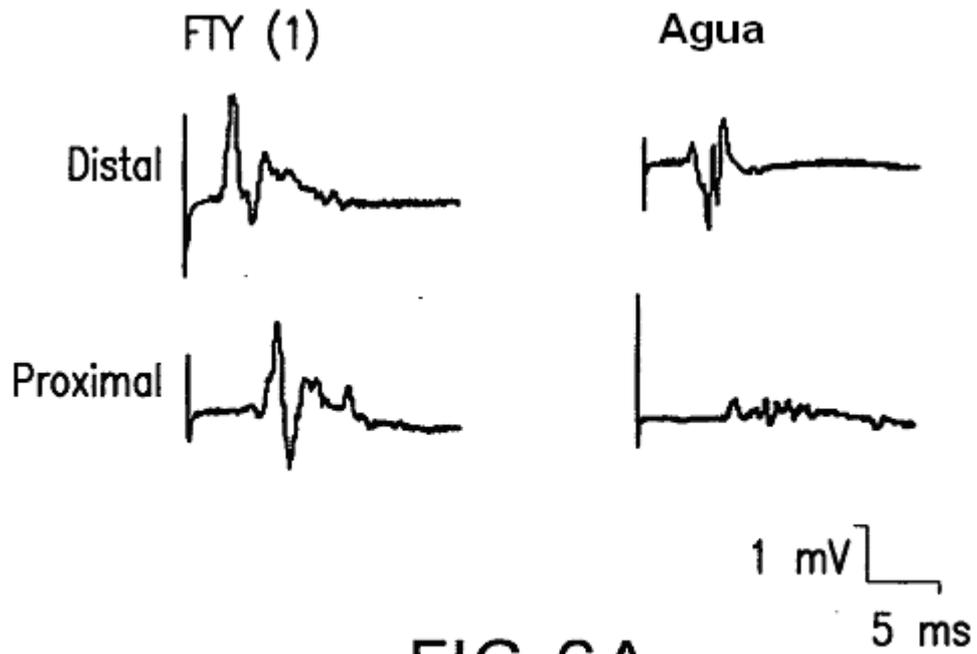


FIG.6A

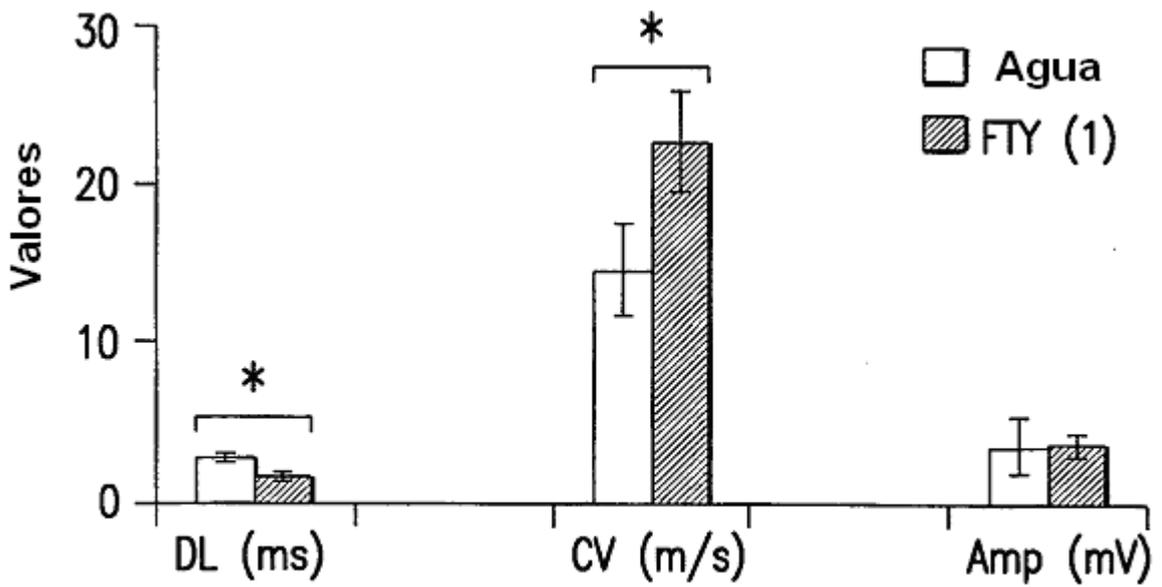


FIG.6B

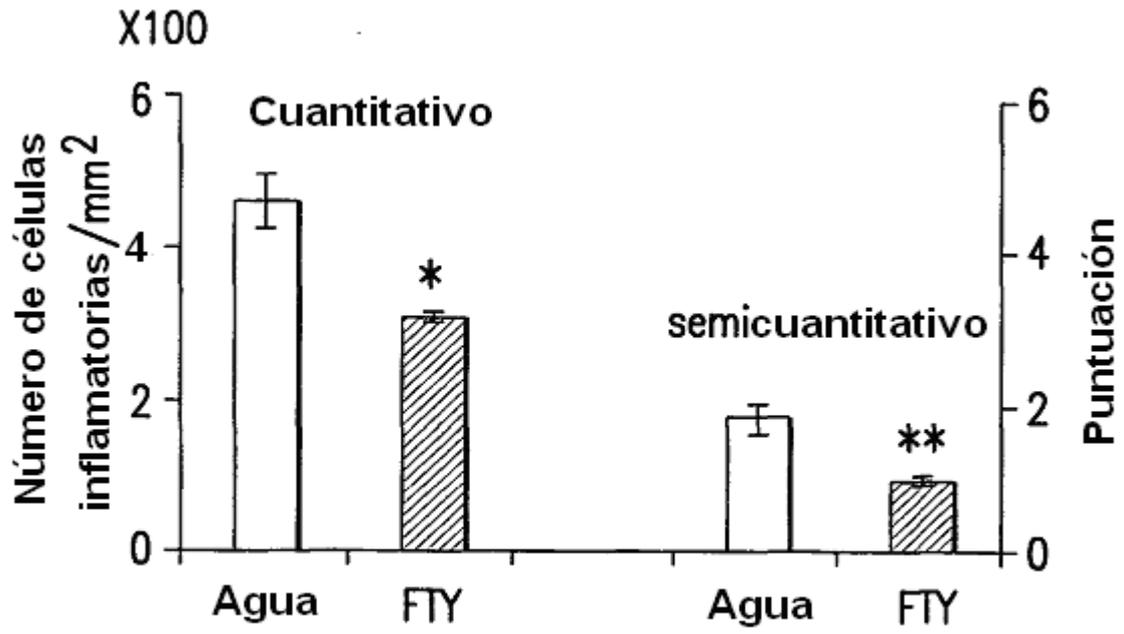


FIG.7

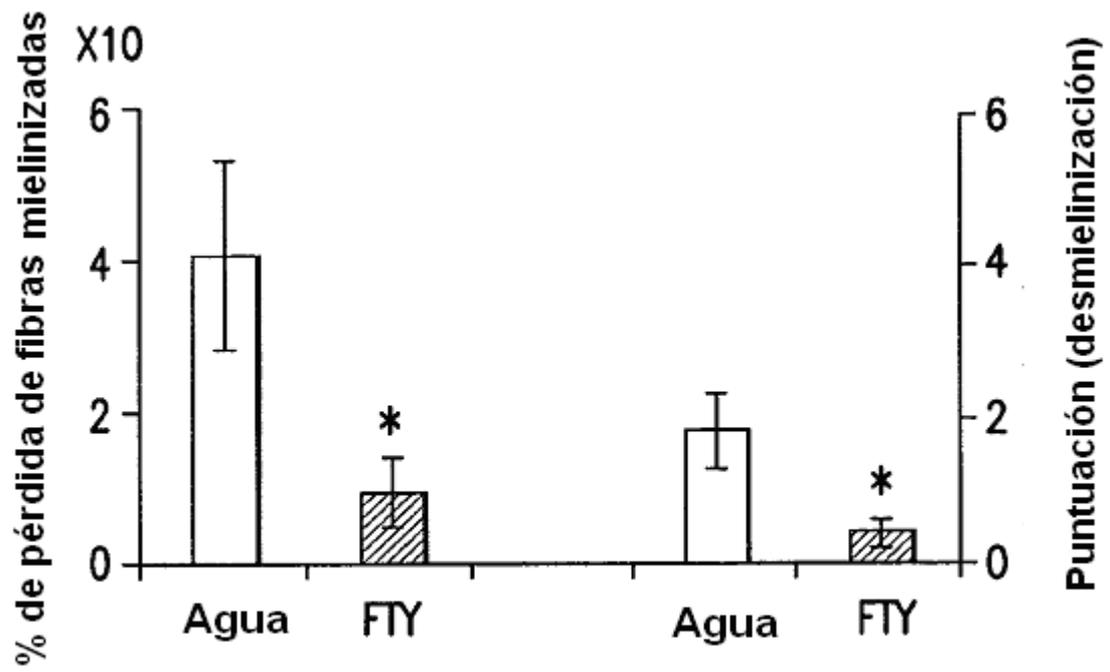


FIG.8