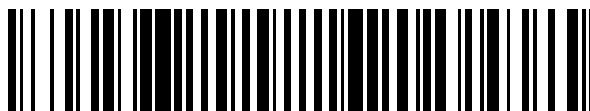


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 424 022**

51 Int. Cl.:

G01N 33/68

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.02.2008** **E 08725256 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.05.2013** **EP 2137537**

54 Título: **Composiciones y usos para tratar la esclerosis múltiple**

30 Prioridad:

08.02.2007 US 888921 P

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

26.09.2013

73 Titular/es:

**BIOGEN IDEC MA, INC. (100.0%)
14 CAMBRIDGE CENTER
CAMBRIDGE, MASSACHUSETTS 02142, US**

72 Inventor/es:

**LUKASHEV, MATVEY E. y
O'NEILL, GILMORE**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 424 022 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Composiciones y usos para tratar la esclerosis múltiple

Se proporcionan determinados compuestos para el tratamiento de enfermedades neurológicas, que incluyen enfermedades neurológicas desmielinizantes, en particular, esclerosis múltiple.

- 5 La esclerosis múltiple (EM) es una enfermedad autoinmune con la actividad autoinmune dirigida contra antígenos del sistema nervioso central (SNC). La enfermedad se caracteriza por la inflamación de partes del SNC, que conduce a la pérdida del recubrimiento de mielina de los axones neuronales (desmielinización), la pérdida de axones y eventualmente la muerte de neuronas, oligodendrocitos y células gliales.

- 10 Se estima que 2.500.000 personas en todo el mundo padecen EM. Es una de las enfermedades más comunes del SNC en adultos jóvenes. La EM es una enfermedad crónica, progresiva e incapacitadora, que generalmente golpea a sus víctimas poco después de la adolescencia, produciéndose el diagnóstico generalmente entre los 20 y los 40 años de edad, aunque el inicio puede producirse antes. La enfermedad no es directamente hereditaria, aunque la susceptibilidad genética desempeña una función en su desarrollo. La EM remitente-recurrente (EMRR) se presenta en forma de ataques recurrentes de disfunción neurológica focal o multifocal. Los ataques pueden producirse, remitir y recurrir, aparentemente de forma aleatoria, a lo largo de muchos años. La remisión a menudo es incompleta y como cada ataque sigue al anterior, se produce una progresión escalonada negativa con un déficit neurológico permanente creciente.

- 20 Aunque varios fármacos inmunoterapéuticos pueden proporcionar alivio en los pacientes con EM, ninguno es capaz de revertir la progresión de la enfermedad, y algunos pueden provocar graves efectos adversos. La mayoría de las terapias actuales para la EM están dirigidas a la reducción de la inflamación y a la supresión o modulación del sistema inmune. A fecha de 2006, los tratamientos disponibles para EM reducen la inflamación y el número de nuevos episodios pero no todos tienen un efecto sobre la progresión de la enfermedad. Una serie de ensayos clínicos han demostrado que la supresión de la inflamación en EM crónica rara vez limita de forma significativa la acumulación de discapacidad debida a la progresión sostenida de la enfermedad, lo que sugiere que el daño neuronal y la inflamación son patologías independientes. Promover la remielinización del SNC como mecanismo de reparación, y por otro lado prevenir la pérdida axonal y la muerte neuronal, son algunos de los objetivos importantes del tratamiento de la EM. Para tener una visión general completa de la EM y sus terapias actuales, véase, p. ej., McAlpine's Multiple Sclerosis, de Alastair Compston et al., 4ª edición, Churchill Livingstone Elsevier, 2006.

- 30 Las "enzimas de fase 2" sirven como mecanismo de protección en células de mamífero contra especies de oxígeno/nitrógeno (ROS/RNS), electrófilos y xenobióticos. Estas enzimas normalmente no son expresadas en sus niveles máximos y su expresión puede inducirse a través de diversos agentes naturales y sintéticos. El factor nuclear factor 2 relacionado con E2 (Nrf2) es un factor de transcripción responsable de la inducción de diversas enzimas antioxidantes y de detoxificación importantes que coordinan una respuesta celular protectora frente a estrés tóxico y metabólico.

- 35 Las ROS/RNS son muy dañinas en el cerebro y el tejido neuronal, donde atacan células post-mitóticas (es decir, que no se dividen) tales como las células gliales, los oligodendrocitos y las neuronas, que son particularmente sensibles a los radicales libres. Este proceso conduce a daño neuronal. Se ha implicado el estrés oxidativo en la patogénesis de diversas enfermedades neurodegenerativas, que incluyen ELA, enfermedad de Alzheimer (EA) y la enfermedad de Parkinson (EP). Para una revisión, véase, p. ej., van Muiswinkel et al., Curr. Drug Targets CNS—Neurol. Disord., 2005, 4: 267-281. Recientemente se ha publicado que una enzima anti-oxidativa bajo control de Nrf2, la NQO1 (NAD(P)H deshidrogenasa, quinona (1), se ve regulada al alza de forma sustancial en tejidos cerebrales de sujetos con EA y EP (Muiswinkel et al., Neurobiol. Aging, 2004, 25: 1253). De forma similar, se publicó un aumento de la expresión de NQO1 en la espina dorsal de sujetos con ELA (Muiswinkel et al., Curr. Drug Targets—CNS. Neurol. Disord., 2005, 4: 267-281) y en lesiones activas y crónicas en los cerebros de pacientes que padecen EM (van Horssen et al., Free Radical Biol. & Med., 2006, 41, 311-311). Estas observaciones indican que el mecanismo de Nrf2 puede activarse en enfermedades neurodegenerativas y neuroinflamatorias como mecanismo protector endógeno. De hecho, más recientemente se ha publicado que la activación inducida de genes dependientes de Nrf2 por determinados compuestos basados en ciclopenanona (NEPP) contrarresta los efectos tóxicos de la inhibición metabólica y la producción de ROS/RNS en el cerebro y protege las neuronas de la muerte *in vitro* e *in vivo* (véase Satoh et al., PNAS, 2006, 103(3): 768-773).

- 55 Además, muchas publicaciones han presentado efectos neuroprotectores de compuestos procedentes de compuestos derivados de plantas naturales ("fitocompuestos"), que incluyen α -tocoferol (vitamina E), licopeno (tomates), resveratrol (uvas rojas), sulforafano (brócoli), EGCG (té verde), etc. Para una revisión, véase Mattson y Cheng, Trends in Neurosci., 2006, 29(11): 632-639. Originalmente, la acción de estos compuestos se atribuyó a sus propiedades anti-oxidantes. Sin embargo, aunque la mayoría de los anti-oxidantes son efectivos sólo a concentraciones elevadas, al menos algunos de estos compuestos parecen ejercer efectos neuroprotectores en dosis mucho menores. La evidencia emergente sugiere que estos compuestos pueden ejercer sus efectos neuroprotectores a través de la activación de mecanismos de respuesta a estrés celular, que incluye el mecanismo de Nrf2, que da como resultado la regulación al alza de genes neuroprotectores. Sin embargo, el mecanismo exacto

de acción de estos compuestos sigue sin comprenderse bien.

Hasta la fecha, se han identificado más de 10 clases de productos químicos diferentes inductores del mecanismo de Nrf2, que incluyen isotiocianatos y sus productos de adición de tiol, ditiocarbamatos, así como 1,2-ditio-3-tionas, derivados de arsénico trivalentes (p. ej., fenil arsenóxido), metales pesados, determinados polienos cíclicos y acíclicos conjugados (que incluyen porfirinas, clorofilinas y clorofil), y dimercaptanos vecinales. Estos inductores tienen pocas similitudes estructurales. Principalmente son electrófilos, y todos pueden reaccionar químicamente con grupos tiol por alquilación, oxidación o reducción, lo que sugiere que el sensor intracelular para inductores probablemente contiene tioles muy altamente reactivos (cisteína). Los inductores pueden modificar grupos tiol a través de una serie de mecanismos que incluyen: alquilación (aceptores de adición de Michael, isotiocianatos, quinonas); oxidación (p. ej., peróxidos e hidroperóxidos); y reacción directa con enlaces de tiol/disulfuro (p. ej., ditiolos vecinales tales como 1,2-dimercaptopropanol, ácido lipoico). Estos diversos mecanismos de respuesta proporcionan plasticidad para las respuestas celulares a diversos estresores electrófilos y oxidantes.

Kappos et al., "BG00012, a novel oral fumarate is effective in patients with relapsing remitting multiple sclerosis", SAGE JOURNALS: MULTIPLE SCLEROSIS, septiembre de 2006, Vol. 12, página 585, P325, publica los resultados de un estudio de fase 2b llevado a cabo para determinar la eficacia de tres dosis de BG00012: 120 mg/día, 360 mg/día y 720 mg/día. Se observó que el BG00012 a 720 mg/día (240 mg tres veces al día) reduce de forma significativa la actividad de lesión cerebral detectable mediante IRM (Imágenes de Resonancia Magnética) en pacientes de EMRR.

En la presente memoria se describen métodos que comprenden al menos uno de los siguientes métodos:

- 1) métodos de selección para obtener al menos un nuevo compuesto candidato para el tratamiento de una enfermedad neurológica;
- 2) métodos de evaluación de las propiedades neuroprotectoras de al menos un fármaco candidato para el tratamiento de una enfermedad neurológica;
- 3) métodos de comparación (p. ej., de bioequivalencia) de al menos dos composiciones farmacéuticas que comprende derivados de ácido fumárico;
- 4) métodos de tratamiento de una enfermedad neurológica mediante la administración al sujeto que lo necesite de al menos un compuesto que sea similar estructuralmente, parcialmente, a DMF o MMF; y
- 5) métodos de tratamiento de una enfermedad neurológica mediante una terapia de combinación que comprende la administración de al menos un primer compuesto que regula al alza el mecanismo de Nrf2, y al menos un segundo compuesto que no regula al alza el mecanismo de Nrf2.

Una enfermedad neurológica es una enfermedad neurodegenerativa tal como, por ejemplo, ELA, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer y enfermedad de Huntington. En la invención la enfermedad neurológica es EM.

El uso médico de la invención comprende la administración oral de DMF o MMF a un mamífero.

En una realización, la invención proporciona una composición farmacéutica para uso en el tratamiento de esclerosis múltiple, composición que consiste en: (a) dimetil fumarato (DMF) o monometil fumarato (MMF), y (b) uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables, donde la composición debe administrarse oralmente a un sujeto que necesite tratamiento para esclerosis múltiple, y donde la dosis de dimetil fumarato o monometil fumarato que debe administrarse es de 480 mg al día.

En algunas realizaciones, la composición consiste en dimetil fumarato (DMF) y uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables. En algunas realizaciones, la composición consiste en monometil fumarato (MMF) y uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables. En algunas realizaciones, la composición debe administrarse en la forma de un comprimido, una suspensión o una cápsula. En algunas realizaciones, la composición debe administrarse al sujeto durante 5, 10, 12, 20, 40, 52, 100 ó 200 semanas o más. En algunas realizaciones, la composición debe administrarse al sujeto durante al menos 12 semanas.

En otra realización, la invención proporciona dimetil fumarato (DMF) o monometil fumarato (MMF) para uso en el tratamiento de esclerosis múltiple, donde el dimetil fumarato (DMF) o el monometil fumarato (MMF) es el único compuesto neuroprotector administrado, y donde el dimetil fumarato (DMF) o el monometil fumarato (MMF) debe administrarse oralmente a un sujeto que necesite el tratamiento para esclerosis múltiple a una dosis de 480 mg al día.

En algunas realizaciones, el dimetil fumarato (DMF) es el único compuesto neuroprotector que debe administrarse. En algunas realizaciones, el monometil fumarato (MMF) es el único compuesto neuroprotector que debe administrarse. En algunas realizaciones, el dimetil fumarato (DMF) o el monometil fumarato (MMF) debe administrarse en forma de un comprimido, una suspensión o una cápsula. En algunas realizaciones, el dimetil fumarato (DMF) o el monometil fumarato (MMF) debe administrarse al sujeto durante 5, 10, 12, 20, 40, 52, 100 ó 200 semanas o más. En algunas realizaciones, el dimetil fumarato (DMF) o el monometil fumarato (MMF) debe administrarse al sujeto durante al menos 12 semanas.

Otras características y realizaciones de la invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción y reivindicaciones.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

5 Figura 1: demuestra que el DMF y el MMF son activadores de Nrf2 a concentraciones que se encuentran dentro del rango de exposición clínica (células en cultivo).

Figura 2: muestra los resultados de experimentos de ARNi.

Figura 3: muestra evidencias de la activación de Nrf2 por DMF y MMF *in vivo*.

Figura 4: muestra evidencias de la activación de Nrf2 por DMF y MMF *in vivo*.

10 Los ésteres de ácido fumárico, tales como DMF, han sido propuestos para el tratamiento de EM (véase, p. ej., Schimrigk et al., Eur. J. Neurol., 2006, 13(6): 604-10; Drugs R&D, 2005, 6(4): 229-30).

En la presente memoria se describen, entre otras cosas, los medios para identificar compuestos con una nueva modalidad terapéutica útiles en al menos una de múltiples indicaciones neurológicas y, opcionalmente, complementarios a otros fármacos para el tratamiento de una enfermedad neurológica, que incluyen una serie de inmunomoduladores empleados actualmente.

15 El DMF es un miembro de un grupo grande de moléculas anti-oxidantes conocidas por sus propiedades citoprotectoras y anti-inflamatorias. Estas moléculas también comparten la propiedad de la activación del mecanismo de Nrf2. Por tanto, el descubrimiento de que el DMF activa el mecanismo de Nrf2 en conjunción con los efectos neuroprotectores del DMF ofrece además un razonamiento para la identificación de moléculas relacionadas
20 estructural y/o mecanísticamente, de las que podría esperarse que fueran terapéuticamente efectivas para el tratamiento de trastornos neurológicos, tales como, p. ej., la EM.

En esta sección se definen determinados términos; a lo largo de la descripción se proporcionan definiciones adicionales.

Los términos “activación” y “regulación al alza”, cuando se usan en referencia al mecanismo de Nrf2, se usan de manera indistinta en la presente memoria.

25 Los términos “enfermedad” y “trastorno” se usan de manera indistinta en la presente memoria.

La expresión “un fármaco para el tratamiento de una enfermedad neurológica” se refiere a un compuesto que presenta un beneficio terapéutico en una enfermedad neurológica especificada, tal como se muestra en al menos un modelo animal de una enfermedad neurológica, o en ensayos clínicos humanos, para el tratamiento de una enfermedad neurológica.

30 El término “neuroprotección” y términos afines se refieren a la prevención o a la reducción de la degeneración neuronal, que incluye, por ejemplo, la desmielinización y/o la pérdida axonal, y/o la muerte neuronal y/o de oligodendrocitos. La neuroprotección se puede dar a través de varios mecanismos, p. ej. a través de la reducción de la inflamación, proporcionando factores neurotróficos, capturando radicales libres, etc. Tal como se usa en la presente memoria, un compuesto se considera neuroprotector si (1) regula al alza el mecanismo de Nrf2 por encima
35 de un umbral determinado, y (2) proporciona neuroprotección, independientemente de otros posibles mecanismos de acción.

Los términos “tratamiento”, “método terapéutico”, “beneficios terapéuticos” y otros similares se refieren a medidas tanto terapéuticas como profilácticas/preventivas. Por tanto, los que necesitan el tratamiento pueden incluir tanto individuos que ya presenten una enfermedad especificada como aquellos que presenten riesgo de adquirir dicha
40 enfermedad.

Las expresiones “dosis terapéuticamente efectiva” y “cantidad terapéuticamente efectiva” se refieren a la cantidad de un compuesto que da como resultado al menos una prevención o retraso del inicio o el alivio de los síntomas de un trastorno neurológico en un sujeto, o la consecución de un resultado biológico deseado, tal como una neurodegeneración reducida (p. ej., desmielinización, pérdida axonal y muerte neuronal) o una inflamación reducida
45 de las células del SNC.

En la presente memoria se describen métodos para evaluar las propiedades neuroprotectoras de compuestos de ensayo, que incluyen los siguientes métodos:

- 1) métodos de selección para obtener nuevos compuestos candidatos que pueden ser útiles para el tratamiento de una enfermedad neurológica;
- 50 2) métodos de evaluación de las propiedades neuroprotectoras de fármacos y candidatos que se usan o se proponen para el tratamiento de una enfermedad neurológica;
- 3) métodos de comparación (p. ej., de bioequivalencia) de dos o más composiciones farmacéuticas que

contienen derivados de ácido fumárico.

Tal como se describe en la presente memoria, los métodos 1-3 pueden comprender:

- a) poner en contacto una célula con el compuesto de ensayo,
- b) determinar si el mecanismo de Nrf2 es regulado al alza en la célula,
- y, en algunas realizaciones, adicionalmente llevar a cabo la(s) siguiente(s) etapa(s):
- c) determinar si el compuesto de ensayo frena o previene la desmielinización, la pérdida axonal y/o la muerte neuronal, y/o
- d) seleccionar el compuesto de ensayo como candidato para el tratamiento de la neurodegeneración en una enfermedad neurológica si 1) el mecanismo de Nrf2 es regulado al alza, y 2) si se previene o frena la desmielinización, la pérdida axonal y/o la muerte neuronal.

Método 1

Los métodos para seleccionar un compuesto candidato para el tratamiento de una enfermedad neurológica tal como se describen en la presente memoria comprenden:

- a) poner en contacto una célula con una pluralidad de compuestos de ensayo,
- b) determinar si el mecanismo de Nrf2 es regulado al alza en la célula, y
- c) seleccionar de entre la pluralidad de compuestos al menos un compuesto que regule al alza el mecanismo de Nrf2,

donde una regulación al alza del mecanismo de Nrf2 por el al menos un compuesto seleccionado indica que el al menos un compuesto seleccionado puede ser útil para el tratamiento de una enfermedad neurológica. Por ejemplo, la pluralidad de compuestos puede estar representada por una biblioteca química combinatoria, y el método de escrutinio puede ser llevado a cabo mediante un escrutinio de alta capacidad como el descrito, p. ej., en "High-Throughput Screening in Drug Discovery (Methods and Principles in Medicinal Chemistry)", de Jörg Hüser (ed.), John Wiley & Sons (2006).

También se describen bibliotecas combinatorias de compuestos en, p. ej. "Solid-Supported Combinatorial and Parallel Synthesis of Small-Molecular-Weight Compound Libraries" (Tetrahedron Organic Chemistry) Ian Salusbury (ed.), Elsevier (1998); "Combinatorial Libraries: Synthesis, Screening and Application Potential (Library Binding)", de Riccardo Cortese (ed.), Walter de Gruyter (1995). Las bibliotecas de compuestos pueden ser, por ejemplo, bibliotecas de quinona y otras bibliotecas descritas en Mittoo, Comb. Chem. & High Throughput Screen, 2006, 9: 421-423.

El al menos un compuesto o pluralidad de compuestos que está siendo escrutado y/o seleccionado comprende al menos un compuesto seleccionado de al menos uno de los siguientes grupos de compuestos: agentes alquilantes moderados, aceptores de adición de Michael o compuestos que son metabolizados a aceptores de adición de Michael, que incluyen compuestos de las Fórmulas I, II, III ó IV.

El al menos un compuesto se selecciona entre ácido fumárico, sus sales, y derivados de ácido fumárico.

Método 2

En la presente memoria también se describen métodos para evaluar las propiedades neuroprotectoras de al menos un fármaco o candidato de fármaco para el tratamiento de al menos una enfermedad neurológica. Dichos métodos comprenden:

- a) poner en contacto una célula con el al menos un fármaco o candidato a fármaco, y
- b) determinar si el mecanismo de Nrf2 es regulado al alza en la célula,

donde la regulación al alza del mecanismo de Nrf2 por el al menos un fármaco o candidato a fármaco indica que el al menos un fármaco o candidato a fármaco es neuroprotector en el tratamiento de un humano que presente una enfermedad neurológica.

La regulación al alza del mecanismo de Nrf2 por el al menos un fármaco o candidato a fármaco puede indicar que el al menos un fármaco o candidato a fármaco tiene al menos una actividad seleccionada entre frenar la desmielinización, frenar la pérdida de axones y frenar la tasa de muerte neuronal.

El método de evaluación del al menos un fármaco o candidato a fármaco puede comprender una etapa adicional:

- c) evaluar la desmielinización, la pérdida de axones y/o la muerte neuronal.

Las etapas a) y c) pueden llevarse a cabo *in vivo* en al menos un modelo de una enfermedad neurológica, p. ej., tal como se describe a continuación.

En los métodos descritos, particularmente aquellos en los que la enfermedad neurológica es esclerosis múltiple u

otra enfermedad desmielinizante, el al menos un fármaco o candidato de fármaco evaluado para una enfermedad neurológica se elige entre los siguientes: FTY720 (2-(4-octilfenetil)-2-aminopropano-1,3-diol; Novartis); anticuerpo anti-IL 12 (p. ej., ABT-874; Abbot Laboratories); GSK683699 (GSK/Tanabe); NeuroVax (Immune Response Corp.; Darlington, Curr. Opin. Mol. Ther., 2005, 7(6): 598-603); anticuerpo anti-CCR2 (p. ej., MLN 1202; Millennium); interferón β -1a (p. ej., Avonex®; Biogen Idec); anticuerpo anti- α 4-integrina (p. ej. Tysabri®; Biogen Idec/Elan); anticuerpo anti-CD20 (p. ej., Rituxan®; Biogen Idec/Genentech); TV 5010 (Teva); NBI-788 (Neurocrine); MBP8298 (BioMS (véase Warren et al., Eur. J. Neurol., 2006, 13(8): 887-95); Mylinax (Oral Cladribine; 2-clorodesoxi-adenosina; Seronol/IVAX); Teriflunomide ((Z)-2-ciano-N-(4-(trifluorometil)-fenil)-3-hidroxibut-2-enamida; Sanofi-Aventis); Temsirolimus (Wyeth); Laquinimod (5-cloro-N-etil-1,2-dihidro-4-hidroxi-1-metil-2-oxo-N-fenilquinolina-3-carboxamida; Active Biotech/Teva); e interferón tau (Tauferon; Pepgen).

El al menos un fármaco o candidato a fármaco que está siendo evaluado puede ser al menos un compuesto seleccionado de al menos una clase seleccionado entre un agente alquilante moderado, un aceptor de adición de Michael y un compuesto que se metaboliza en un aceptor de adición de Michael, que incluyen compuestos de las Fórmulas I, II, III ó IV.

El compuesto puede ser ácido fumárico, su sal, o un derivado de ácido fumárico.

Método 3

También se describen métodos para comparar (p. ej. en bioequivalencia) al menos dos composiciones farmacéuticas. Dichos métodos comprenden:

- a) poner en contacto una célula con al menos una primera composición que comprende un compuesto de ensayo, y
- b) comparar el nivel de regulación al alza del mecanismo de Nrf2 en la célula producido por el compuesto de ensayo con el nivel correspondientes a la regulación al alza del mecanismo de Nrf2 en una célula tratada con al menos una segunda composición ("composición de comparación"), que comprende DMF, MMF o ambos.

Niveles sustancialmente disimilares de regulación al alza por la al menos una primera composición y la al menos una segunda composición pueden indicar que las composiciones no son bioequivalentes.

El compuesto de ensayo puede ser ácido fumárico, sus sales, un derivado de ácido fumárico, o mezclas de los mismos. La primera composición puede comprender al menos uno de DMF, MMF, o ambos, DMF y MMF. La dosis y/o la formulación de la al menos una primera composición pueden diferir de la dosis y/o formulación de la al menos una segunda composición. La al menos una primera composición puede ser una composición de liberación controlada tal como, p. ej., las composiciones descritas en el documento WO 2006/037342.

El método puede comprender además una etapa adicional:

- c) comparar al menos un parámetro farmacocinético de las al menos una primera y una segunda composiciones.

Los parámetros farmacocinéticos y los métodos para evaluarlos son bien conocidos y se describen en, p. ej., "Pharmacokinetics", segunda edición (Drugs and the Pharmaceutical Sciences) de Milo Gibaldi et al. (ed.), Informa Healthcare (1982). Los ejemplos de dichos parámetros farmacocinéticos que pueden ser evaluados incluyen la vida media en suero, la eliminación y la distribución de volúmenes.

Parámetro(s) farmacocinético(s) sustancialmente disimilar(es) de las al menos una primera y al menos una segunda composiciones pueden indicar que las composiciones no son bioequivalentes.

El compuesto de ensayo que se está evaluando puede ser un agente alquilante moderado, y más específicamente, un aceptor de adición de Michael, o un compuesto que se metaboliza en un aceptor de adición de Michael.

El compuesto de ensayo puede ser ácido fumárico o su sal, o un derivado de ácido fumárico.

También se describen métodos para tratar un mamífero que padece o que tiene riesgo de desarrollar una enfermedad neurológica, que incluyen los siguientes métodos:

- 1) métodos de tratamiento de una enfermedad neurológica mediante la administración a un sujeto que lo necesite de al menos un compuesto que sea similar estructuralmente, de forma parcial, a DMF o MMF (que incluyen los compuestos seleccionados usando los métodos 1-3 descritos anteriormente); y
- 2) métodos de tratamiento de un trastorno neurológico mediante una terapia de combinación que incluye la administración de un primer compuesto que no regula al alza el mecanismo de Nrf2 y un segundo compuesto que regula al alza el mecanismo Nrf2.

Método 4

También se proporciona un uso para el tratamiento de EM mediante administración de DMF o MMF a un sujeto que

lo necesite.

El uso comprende la administración de DMF o MMF oralmente a una dosis de 480 mg al día.

- 5 El uso médico implica frenar o prevenir la neurodegeneración (más específicamente, p. ej., la desmielinización, la pérdida axonal y/o la muerte neuronal) en un sujeto que lo necesite, mediante la administración de DMF o MMF durante un periodo de tiempo suficiente para conseguir al menos uno de los objetivos, frenar la desmielinización o prevenirla, frenar la pérdida axonal o prevenirla y frenar la muerte neuronal o prevenirla, p. ej. en al menos un 30 %, un 50 %, 100 % o más respecto a un control, en un periodo de tiempo de al menos 5, 10, 12, 20, 40, 52, 100 ó 200 semanas o más.

Método 5

- 10 También se describe el uso para tratar a un mamífero que tiene una enfermedad neurológica mediante terapia de combinación. Dicho uso comprende:

- a) administrar al mamífero una cantidad terapéuticamente efectiva de al menos un primer compuesto que regule al alza el mecanismo de Nrf2, y
15 b) administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de al menos un segundo compuesto que no regule al alza el mecanismo de Nrf2.

El al menos un primer compuesto, usado en la etapa (a), puede ser un compuesto de Fórmula I, II, III ó IV, p. ej., DMF o MMF; y el al menos un segundo compuesto, que se usa en la etapa (b), pueden ser un compuesto inmunosupresor o un compuesto inmunomodulador que no regule al alza el mecanismo de Nrf2 (p. ej., en más de un 30 %, un 50 %, un 100 % respecto a un control).

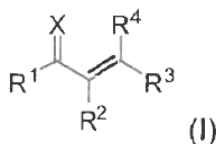
- 20 El uso descrito en la presente memoria comprende la administración al mamífero de una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto de Fórmula I, II, III ó IV.

- En el método 5 descrito en la presente memoria, el al menos un primer compuesto y el al menos un segundo compuesto pueden administrarse concurrentemente (como composiciones separadas o como una composición mixta) o consecutivamente en intervalos solapados o no solapados. En la administración secuencial, el al menos un
25 primer compuesto y el al menos un segundo compuesto se pueden administrar en cualquier orden. La longitud de un intervalo solapado es de más de 2, 4, 6, 12, 24 ó 48 semanas, por ejemplo.

- Los aceptores de adición de Michael generalmente incluyen olefinas o acetilenos conjugados a un grupo atractor de electrones, tal como grupos que contengan carbonilo, grupos que contengan tiocarbonilo, ciano, sulfonilo, sulfonamido, amido, formilo, ceto y nitro. Los ejemplos de grupos carbonilo incluyen ésteres de ácido carboxílico y
30 ácido carboxílico.

En los métodos descritos, el al menos un compuesto que está siendo sometido a escrutinio, identificado, evaluado o usado para tratar un trastorno neurológico se selecciona entre un agente alquilante moderado, un aceptor de adición de Michael y un compuesto que se metaboliza a partir de un aceptor de adición de Michael.

- 35 Tal como se describe en la presente memoria, el aceptor de adición de Michael puede tener la estructura de Fórmula I:



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, donde:

- X es O; S; C(R)-alquilo (C₁₋₁₂); ó C(R)-alquenilo (C₂₋₁₂), donde R es H, alquilo (C₁₋₁₂) ó alquenilo (C₂₋₁₂);
40 R¹, R², R³ y R⁴ se seleccionan de forma independiente entre: H; OH; O⁻; CO₂H, CO₂⁻; SH; S⁻; SO₂H, SO₂⁻; alquilo (C₁₋₂₄); alquenilo (C₁₋₂₄); arilo (C₆₋₅₀), CO₂-alquilo (C₁₋₂₄); SO₂-alquilo (C₁₋₂₄); CO₂-alquenilo (C₁₋₂₄); SO₂-alquenilo (C₁₋₂₄); CO₂Y, donde Y es psoralen-9-ilo, retinilo, alfa-tocoferol, calciferilo, corticosteroid-21-ilo o monosacárid-ω-ilo; alcoxi (C₁₋₂₄); alquenilo (C₁₋₂₄); arilo (C₆₋₅₀); alquiltio (C₁₋₂₄); alqueniltio (C₁₋₂₄), ariltio (C₆₋₅₀), amino; amido; arilalquilo; ciano; nitro; sulfonilo; sulfóxido; sulfonamido; formilo; ceto; y aminoácidos D y L naturales o no
45 naturales; o dos cualesquiera de X, R¹, R² y R³, y R⁴ pueden estar unidos para formar un resto cíclico; y donde los grupos alquilo, alcoxi, alquenilo, alquenilo, arilo y arilo pueden estar sustituidos opcionalmente con al menos un grupo elegido entre halógeno (F, Cl, Br ó I), OH, alcoxi (C₁₋₄), nitro y ciano.

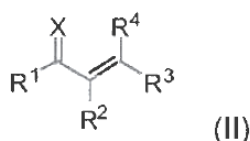
Tal como se describe en la presente memoria, el al menos un aceptor de adición de Michael puede tener la estructura de la Fórmula I, con los siguientes condicionantes:

R^1 se seleccionan de entre: H; OH; O^- ; CO_2H , CO_2^- ; SH; S^- ; SO_2H , SO_2^- ; alquilo (C_{1-24}); alquenido (C_{1-24}); arilo (C_{6-50}), CO_2 -alquilo (C_{1-24}); SO_2 -alquilo (C_{1-24}); CO_2 -alquenido (C_{1-24}); SO_2 -alquenido (C_{1-24}); CO_2Y , donde Y es psoralen-9-ilo, retinilo, alfa-tocoferol, calciferilo, corticosteroid-21-ilo o monosacárid- ω -ilo; alcoxi (C_{1-24}); alquenilo (C_{1-24}); arilo (C_{6-50}); alquiltio (C_{1-24}); alqueniltio (C_{1-24}), ariltio (C_{6-50}); arilalquilo; amino; amido; ciano; nitro; sulfonilo; sulfóxido; sulfonamido; formilo; ceto; y aminoácidos D y L naturales o no naturales; y donde los grupos alquilo, alcoxi, alquenido, alquenilo, alquenilo, arilo y arilo pueden estar sustituidos opcionalmente con al menos un grupo elegido entre halógeno (F, Cl, Br ó I), OH, alcoxi (C_{1-4}), nitro y ciano;

R^2 se seleccionan de entre: H; CO_2H , CO_2^- ; SO_2H , SO_2^- ; alquilo (C_{1-24}); alquenido (C_{1-24}); arilo (C_{6-50}), CO_2 -alquilo (C_{1-24}); SO_2 -alquilo (C_{1-24}); CO_2 -alquenido (C_{1-24}); SO_2 -alquenido (C_{1-24}); CO_2Y , donde Y es psoralen-9-ilo, retinilo, alfa-tocoferol, calciferilo, corticosteroid-21-ilo o monosacárid- ω -ilo; alcoxi (C_{1-24}); alquenilo (C_{1-24}); arilo (C_{6-50}); alquiltio (C_{1-24}); alqueniltio (C_{1-24}), ariltio (C_{6-50}); amido; arilalquilo; ciano; nitro; sulfonilo; sulfóxido; sulfonamido; formilo; ceto; y aminoácidos D y L naturales o no naturales; y donde los grupos alquilo, alcoxi, alquenido, alquenilo, arilo y arilo pueden estar sustituidos opcionalmente con al menos un grupo elegido entre halógeno (F, Cl, Br ó I), OH, alcoxi (C_{1-4}), nitro y ciano; y

R^3 y R^4 se seleccionan de forma independiente de entre: H; CO_2H , CO_2^- ; SO_2H , SO_2^- ; alquilo (C_{1-24}); alquenido (C_{1-24}); arilo (C_{6-50}), CO_2 -alquilo (C_{1-24}); SO_2 -alquilo (C_{1-24}); CO_2 -alquenido (C_{1-24}); SO_2 -alquenido (C_{1-24}); CO_2Y , donde Y es psoralen-9-ilo, retinilo, alfa-tocoferol, calciferilo, corticosteroid-21-ilo o monosacárid- ω -ilo; alcoxi (C_{1-24}); alquenilo (C_{1-24}); arilo (C_{6-50}); alquiltio (C_{1-24}); alqueniltio (C_{1-24}), ariltio (C_{6-50}); amido; arilalquilo; ciano; nitro; sulfonilo; sulfóxido; sulfonamido; formilo y ceto; y donde los grupos alquilo, alcoxi, alquenido, alquenilo, arilo y arilo pueden estar sustituidos opcionalmente con al menos un grupo elegido entre halógeno (F, Cl, Br ó I), OH, alcoxi (C_{1-4}), nitro y ciano; y

Tal como se describe en la presente memoria, el al menos un aceptor de adición de Michael puede tener la estructura de la Fórmula II:



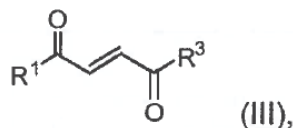
o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, donde:

X se selecciona de O; S; C(R)-alquilo (C_{1-12}); y C(R)-alquenido (C_{2-12}), donde R se selecciona de H, alquilo (C_{1-12}) y alquenido (C_{2-12}); y R^1 , R^2 , R^3 y R^4 se seleccionan de forma independiente entre: H; OH; O^- ; CO_2H , CO_2^- ; alquilo (C_{1-12}); alquenido (C_{1-12}) y CO_2 -alquilo (C_{1-12}); o cualesquiera dos de X, R^1 , R^2 y R^3 pueden unirse para formar un resto cíclico.

En los compuestos de las Fórmulas I-IV descritos en la presente memoria, la sal farmacéuticamente aceptable puede ser una sal de un catión metálico (M), donde M puede ser un metal alcalino, alcalinotérreo o de transición, tal como Li, Na, K, Ca, Zn, Sr, Mg, Fe ó Mn.

En los métodos descritos, los compuestos de la Fórmula I incluyen ácido fumárico, sus sales, y derivados de ácido fumárico.

Tal como se describe en la presente memoria, el al menos un compuesto de Fórmula I puede tener la estructura de la Fórmula III:

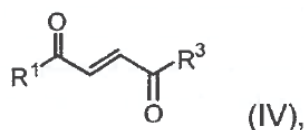


o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, donde:

R^1 y R^3 se seleccionan de forma independiente entre OH; O^- ; alcoxi (C_{1-24}); alquenilo (C_{1-24}); arilo (C_{6-50}); psoralen-9-ilo; retinilo; alfa-tocoferol; calciferilo; corticosteroid-21-ilo; monosacárid- ω -ilo; amino; y un aminoácido D ó L natural o no natural; y donde al menos uno de los grupos alcoxi (C_{1-24}); alquenilo (C_{1-24}) y arilo (C_{6-50}) puede estar sustituido opcionalmente con al menos un grupo elegido entre halógeno (F, Cl, Br ó I), OH, alcoxi (C_{1-4}), nitro y ciano.

Los compuestos en los que al menos uno de R^1 y R^3 se deriva de un aminoácido D ó L natural o no natural se describen en las Solicitudes de Patente de EE.UU. N° 10/433.295, párrafos 10 a 11 y 18 a 28, y 11/421.083.

Tal como se describe en la presente memoria, el compuesto de fórmula (I) puede presentar la estructura de la Fórmula IV:



o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, donde:

- 5 R^1 y R^3 se seleccionan de forma independiente entre OH; O⁻; alcoxi (C₁₋₂₄); aliloxi; viniloxi; ariloxi (C₆₋₅₀); psoralen-9-iloxi; retiniloxi; alfa-tocoferoloxi; calciferiloxi; corticosteroid-21-iloxi; monosacárid- ω -iloxi; amino; y un aminoácido D ó L natural o no natural; y donde al menos uno de los grupos alcoxi (C₁₋₂₄); aliloxi, viniloxi y ariloxi (C₆₋₅₀) puede estar sustituido opcionalmente con al menos un grupo elegido entre Cl, F, I, Br, OH, alcoxi (C₁₋₄), nitro y ciano.
- 10 El “derivado de ácido fumárico” descrito en la presente memoria se elige a partir de compuestos de la Fórmula III, compuestos de la Fórmula IV y los siguientes:
- 15 1) amidas de ácido fumárico derivadas de aminoácidos D ó L naturales o no naturales, como los descritos en las Solicitudes de Patente de EE.UU. Nº 10/433.295, párrafos 10 a 11 y 18 a 28, y 11/421.083.
- 2) un oligómero de ácido fumárico carbocíclico u oxacíclico, como el descrito en la Solicitud de Patente de EE.UU. Nº 10/511.564, párrafos 15-44; y
- 3) un derivado de glicerol o alcano diol o poliol de ácido fumárico, como el descrito en las Patentes de EE.UU. Nº 4.851.439, 5.149.695, 5.451.667, en las columnas 2-4.

En la invención, “derivado de ácido fumárico” es DMF ó MMF.

- 20 En los métodos descritos, el al menos un compuesto que es sometido a escrutinio, evaluado, comparado o usado para el tratamiento de un trastorno neurológico no es ácido fumárico o su sal, o un derivado de ácido fumárico (p. ej., DMF ó MMF).

- 25 El Nrf2 (factor nuclear 2 relacionado con factor E2; para la secuencia del Nrf2, véase el Nº de Acceso AAB32188) es un factor de transcripción que, al activarse por estrés oxidativo, se une al elemento de respuesta antioxidante (ARE, del inglés “antioxidant response element”), y activa la transcripción de genes regulados por Nrf2. Este mecanismo ha sido bien caracterizado en lo que respecta a su función en la detoxificación hepática y la quimioprevención a través de la activación de la expresión de gen de fase II. Los genes regulados por ARE también pueden contribuir al mantenimiento de la homeostasis redox sirviendo como sistemas anti-oxidantes endógenos. Actualmente, la lista de genes regulados por Nrf2 contiene más de 200 genes que codifican proteínas y enzimas implicadas en la detoxificación y la respuesta antioxidante (Kwak et al., J. Biol. Chem., 2003, 278: 8135) tales como, p. ej., HO-1,
- 30 ferritina, glutatona peroxidasa, glutatona-S-transferasas (GSTs), NAD(P)H:quinona oxidoreductasas, conocidas ahora comúnmente como nicotinamida quinona oxidoreductasa 1 (NQO1; EC 1.6.99.2; también conocidas como DT diaforasa y menadiona reductasa), NQO2, g-glutamylcisteína sintasa (g-GCS), glucuronosiltransferasa, ferritina y heme oxigenasa-1 (HO-1), así como una cualquiera de las proteínas enzimáticas enumeradas en la Tabla 1 de Chen & Kunsch, Curr. Pharm. Designs, 2004, 10: 879-891; Lee et al., J. Biol. Chem., 2003, 278(14): 12029-38, y Kwak, ver
- 35 anterior.

- Por consiguiente, en los métodos descritos en la presente memoria, el al menos un gen regulado por Nrf2 que se usa para determinar la activación del mecanismo de Nrf2 puede seleccionarse entre una enzima de detoxificación de fase II, una enzima anti-oxidante, una enzima del sistema generador de NADPH, y el propio Nrf2. Los ejemplos de enzimas de detoxificación de fase II incluyen NQO1, NQO2, GST-Ya, GST-pi, GST-theta 2, GST-mu (1,2,3),
- 40 GST 3 microsomal, γ -GCS catalítico, GCS regulador, epoxidasa hidrolasa microsomal, UDP-glucuronosiltransferasa, transaldolasa, transketolasa y enzima metabolizadora de fármaco. Los ejemplos de enzimas anti-oxidantes incluyen HO-1, ferritina (L), glutatona reductasa, glutatona peroxidasa, metalotioneína I, tioredoxina, tioredoxina reductasa, peroxirredoxina MSP23, Cu/Zn superóxido dismutasa y catalasa. Los ejemplos de las enzimas del sistema generador de NADPH incluyen enzima málica, UDP-glucosa deshidrogenasa, malato oxidoreductasa y
- 45 glucosa-6-fosfato deshidrogenasa.

El elemento de respuesta antioxidante (ARE, también denominado elemento de respuesta electrófilo (EpRE), GRE1, ARE4 y StREb) es un elemento regulador de ADN que actúan en cis con una secuencia de nucleótidos central de 5'-TGA(C/T/G)NNNGC-3' (SEQ ID NO: 1) (Rushmore et al., J. Biol. Chem., 1991, 266(18): 11632-9; véase también Nioi et al., Mutation Res., 2004, 555: 14-171).

- 50 Por consiguiente, la secuencia de ADN del elemento ARE, a cual se une el Nrf2 (tanto si el primero es parte de un gen endógeno como si es una construcción artificial), puede comprender la secuencia ARE central TGA(C/T/G)NNNGC (SEQ ID NO: 2) o la secuencia ARE de consenso (G/A)TGA(C/T/G)NNNGC(A/G) (SEQ ID NO:

3). La secuencia ARE puede comprender una cualquiera de las secuencias “potenciadoras mínimas” mostradas en la Tabla 1.

La secuencia ARE puede comprender además al menos una de las secuencias correspondientes 5'- y 3'-USR tal como se muestra en la Tabla 1. En algunas realizaciones, la secuencia ARE comprende la secuencia GTGANNNGCA (SEQ ID NO: 4), o más particularmente, sus versiones de ratón (NNNN=gtcg) o de humano (NNNN=ctca).

Tabla 1

Especie	Gen	Elemento	5'-USR	Potenciador mínimo	3'-USR	SEQ ID NO
ratón	nqo1	ARE	agTCaCa	GTGAgtcgGCA	aaattt	SEQ ID NO: 5
rata	NQO1	ARE	agTCaCa	GTGACttgGCA	aaatct	SEQ ID NO: 6
humano	NQO1	ARE	agTCaCa	GTGACtcaGCA	gaatct	SEQ ID NO: 7
ratón	gsta1	EpRE	gcTAAtg	GTGACaaaGCA	actttc	SEQ ID NO: 8
rata	GSTA2	ARE	gcTAAtg	GTGACaaaGCA	actttc	SEQ ID NO: 9
ratón	gsta3	ARE	ctcAggc	ATGACattGCA	tttttc	SEQ ID NO: 10
rata	GSTP1	GPE1	agTCAct	ATGATtcaGCA	acaaaa	SEQ ID NO: 11
humano	GCLC	ARE4	ccTCccc	GTGACtcaGCG	ctttgt	SEQ ID NO: 12
humano	GCLM	EpRE	gaagAca	ATGACtaaGCA	gaaatc	SEQ ID NO: 13
ratón	ho1	StREb	cccAAcc	ATGACacaGCA	taaaag	SEQ ID NO: 14
ARE “central”...			TGACnnnGC			SEQ ID NO: 15
ARE consenso...			TAAnn	ATGACnnnGCA	aaaa	SEQ ID NO: 16
			C	G T G	tttt	

A continuación se muestra un modelo actual de la función del Nrf2. En condiciones basales, el Nrf2 es secuestrado en el citoplasma por la proteína asociada a ECH de tipo Kelch ligada a actina (Keap1; N° de acceso NP_987096 para Keap1 humana), un proteína adaptadora de ubiquitina ligasa Cullin 3. Más específicamente, se cree que el dominio N-terminal del Nrf2, conocido como dominio Neh2, interacciona con el dominio C-terminal de tipo Kelch de la Keap1. En respuesta a agentes xenobióticos o a estrés oxidativo, se libera el Nrf2 del complejo Keap1/Nrf2, promoviendo con ello la traslocalización nuclear del Nrf2 y la activación concomitante de la transcripción de genes mediada por ARE. La función de la Keap1, a su vez, requiere la asociación con Cullin3, una proteína de estructura que posiciona la Keap1 y su sustrato en proximidad de E3 ligasa Rbx1, lo que permite que el sustrato (Nrf2) sea poliubiquitinado y, por tanto, marcado para degradación. El mecanismo exacto de cómo el complejo Keap1/Nrf2 siente el estrés oxidativo no se comprende del todo. La Keap1 humana contiene 25 residuos de cisteína, y una hipótesis plantea que actúan como sensores del estrés oxidativo; se cree que 9 de las cisteínas son altamente reactivas (Dinkova-Kostova et al., PNAS, 2005, 102(12): 4584-9). Se ha planteado la teoría, aunque no se transmite para los propósitos de esta invención, de que la alquilación de las cisteínas conduce a un cambio conformacional, lo que da como resultado la liberación del Nrf2 de los complejos Nrf2/Keap1/Cullin3, seguida de la traslocalización nuclear del Nrf2 liberado.

Los métodos 1-3 descritos en la presente memoria comprenden poner en contacto una célula con al menos un compuesto de ensayo y determinar si el mecanismo de Nrf2 es regulado al alza en la célula. En dichos métodos, una regulación al alza del mecanismo de Nrf2 por encima de un umbral (p. ej. en al menos un 30 %, un 50 %, un 100 %, un 200 %, un 500 % respecto a un control) indica que el al menos un compuesto tiene ciertas propiedades biológicas beneficiosas para el tratamiento de una enfermedad neurológica (p. ej., propiedades neuroprotectoras).

La capacidad de un compuesto para activar el mecanismo de Nrf2 se puede determinar mediante uno o más ensayos *in vitro* e *in vivo*, que incluyen, p. ej., los siguientes ensayos descritos a continuación.

i) *Niveles de expresión de Nrf2* – La secuencia de la región promotora del gen *nrf2* (-1065 a -35) ha sido publicada, por ejemplo, en Chan et al., PNAS, 1996, 93: 13943-13948. Se puede usar una construcción de expresión construida artificialmente que contiene el elemento promotor de Nrf2 y un gen indicador artificial. Alternativamente, se puede usar PCR o transferencia Northern para determinar los niveles de expresión de ARNm de Nrf2, o transferencia Western para determinar los niveles de proteína Nrf2. Los ejemplos de procedimientos para determinar los niveles de expresión de Nrf2 se describen en Kwak et al., Mol. Cell. Biol. 2002, 22(9): 2883-2892, y Kwak et al., Mol. Med., 2001, 7: 135-145. Se pueden producir anticuerpos contra Nrf2 empleando métodos conocidos en la técnica y que se encuentran disponibles comercialmente, por ejemplo, en StressGen. Por consiguiente, en algunas

realizaciones, se activa el mecanismo de Nrf2 de tal modo que aumentan los niveles de expresión de Nrf2 en, por ejemplo, al menos un 30 %, un 50 %, un 100 %, un 200 %, un 500 % o más en comparación con un estado no activado.

ii) *Localización subcelular y/o traslocalización nuclear de Nrf2* – Dichos ensayos incluyen la tinción de células, o el análisis de extractos celulares citoplasmáticos frente a extractos celulares nucleares. Por ejemplo, se puede preparar una construcción de proteína de fusión de Nrf2-proteína de fluorescencia verde (GFP, del inglés “green fluorescence protein”) e introducirse en células y visualizarse como se describe, p. ej., en Kraft et al., J. Neurosci., 2004, 24, 1101-1112; y en Satoh et al., PNAS, 2006, 103(3): 768-773. Por consiguiente, en algunas realizaciones, se activa el mecanismo Nrf2 de tal modo que aumenta la relación de Nrf2 citoplasmático a Nrf2 nuclear, por ejemplo, en al menos un 30 %, un 50 %, un 100 %, un 200 %, un 500 % o más en comparación con el estado no activado.

iii) *Niveles de expresión y/o actividad de uno o más genes bajo el control de Nrf2* – Dichos genes bajo el control de Nrf2 incluyen genes indicadores endógenos o introducidos artificialmente en construcciones indicadoras introducidas en células. Por ejemplo, los niveles de expresión de NQO1 endógena o introducida exógenamente se pueden determinar como se describe en los Ejemplos. Alternativamente, se puede preparar una construcción de gen indicador con uno o más sitios ARE ligados operativamente a un gen indicador (p. ej., luciferasa o GFP), como se describe, p. ej., en Satoh et al., PNAS, 2006, 103(3): 768-773. Los niveles de expresión de un producto génico inducido por Nrf-2 se pueden medir a nivel de proteína (p. ej. mediante transferencia Western o ensayos de actividad enzimática) o a nivel de ARNm (p. ej., mediante PCR). Los métodos para llevar a cabo RT-PCR se describen, p. ej., en Calabrese et al., J. Neurosci. Res., 2005, 79: 509-521 para HO-1, en Wierinckx et al., J. Neuroimmunology, 2005, 166: 132-143 para NQO1. Los métodos para medir la actividad enzimática de NQO1, que por ejemplo usan menadiona como sustrato, se describen en Dinkova-Kostova et al., PNAS, 2001, 98: 3404-09 o por Prochaska et al., Anal. Biochem., 1988, 169: 328-336. Los métodos para medir la actividad de GST, usando por ejemplo 1-cloro-2,4-dinitrobenzenceno como sustrato, se describen en Ramos-Gomez et al., J. Neurosci., 2004, 24(5): 1101-1112 y Habig et al., 1974, J. Biol. Chem., 219, 7130-7139. Los métodos para medir la actividad de HO-1 se describen, por ejemplo, en Calabrese et al., 2005, J. Neurosci. Res., 79: 509-521. Por consiguiente, se puede activar el mecanismo de Nrf2 de tal modo que aumenten los niveles de expresión y/o la actividad del gen producido, por ejemplo, en al menos un 30 %, un 50 %, un 100 %, un 200 %, un 500 % o más en comparación con el estado no activado.

iv) *Niveles de unión de Nrf2 a ARE* – Por ejemplo, dichos ensayos pueden utilizar ensayos de desplazamiento de electromovilidad (EMSA) y ensayo de Inmunoprecipitación de Cromatina (ChIP), como se describe, p. ej., en Satoh et al., PNAS, 2006, 103(3): 768-773 y Kwak et al., Mol. Cell. Biol., 2002, 22(9): 2883-2892. Por consiguiente, se puede activar el mecanismo de Nrf2 de tal modo que aumente el nivel de unión de Nrf2 a ARE, por ejemplo, en al menos un 30 %, un 50 %, un 100 %, un 200 %, un 500 % o más en comparación con el estado no activado.

v) *La estabilidad de los complejos Nrf2/Keap1* – Dicho ensayo puede incluir el análisis de complejos inmunoprecipitados con Nrf2 y/o Keap1 u otras proteínas asociadas a Nrf2/Keap1, como se describe, p. ej., en Satoh et al., PNAS, 2006, 103(3): 768-773. Se pueden producir anticuerpos anti-Keap1 usando métodos conocidos en la técnica y están disponibles comercialmente, por ejemplo, en Santa Cruz Biotechnology. Por consiguiente, se puede activar el mecanismo de Nrf-2 de tal modo que aumente la estabilidad de los complejos Nrf2/Keap1, por ejemplo, en al menos un 30 %, un 50 %, un 100 %, un 200 %, un 500 % o más en comparación con el estado no activado.

vi) *Modificación (p. ej., niveles de alquilación) de Keap1 y otras proteínas asociadas a Nrf2/Keap1* – Dichos ensayos pueden incluir análisis de espectrometría de masas de Keap1 inmunoprecipitada, usando técnicas como las descritas, p. ej., en Dinkova-Kostova et al., PNAS, 2005, 102(12): 4584-9 y Gao et al., J. Biol. Chem., manuscrito publicado on-line M607622200. Se puede activar el mecanismo de Nrf-2 de tal modo que aumente el nivel de Keap1 y otras proteínas asociadas a Nrf2/Keap1, por ejemplo, en al menos un 30 %, un 50 %, un 100 %, un 200 %, un 500 % o más en comparación con el estado no activado.

La capacidad alquilante de un compuesto se puede determinar usando Keap1 recombinante, mediante una reacción de competición con 5,5'-ditiobis(ácido 2-nitrobenzoico) (DTNB) como se describe, p. ej., en Gao et al., J. Biol. Chem., manuscrito publicado on-line M607622200.

La célula que se pone en contacto con al menos un compuesto de ensayo puede ser una neurona o una línea de células neuronales. La célula que se pone en contacto con el al menos un compuesto de ensayo puede seleccionarse entre una línea celular de carcinoma de colon (p. ej., DLD1), una línea celular de neuroblastoma (p. ej., SKNSH o IMR32), y un monocito primario. La célula puede ser una célula en cultivo (*in vitro*) o puede estar dentro de un animal (*in vivo*).

La viabilidad celular y, en particular, la viabilidad neuronal se pueden determinar *in vivo* o *in vitro* usando cualquier método adecuado, que incluye métodos como los descritos en los Ejemplos. Por ejemplo, la viabilidad neuronal se puede determinar usando un ensayo MTT tras exposición de cultivos de células neuronales a niveles citotóxicos de glutamato como se describe, p. ej., en Shih et al., J. Neurosci., 2005, 25(44): 10321-35. Adicionalmente, también se puede determinar la viabilidad celular en ensayos en los que se induce la muerte celular por daño oxidativo, por ejemplo, por la adición de glucosa oxidasa a cultivos celulares de astrocitos, como se describe, p. ej. en Calabrese et al., J. Neurosci. Res., 2005, 79: 509-521. Se pueden llevar a cabo ensayos *in vivo* como se describe, p. ej., en

Misgeld, *Histochem. Cell Biol.*, 2005, 124: 189-196.

La cantidad del gen indicador expresado se puede determinar mediante cualquier método adecuado. Los niveles de expresión, a cualquier nivel de ARN o proteína, se pueden determinar usando métodos rutinarios. Habitualmente los niveles de expresión son graduados y/o normalizados respecto a la cantidad total de ARN o proteína de la muestra y/o un control, que normalmente es un gen doméstico tal como actina o GAPDH. Los niveles de ARN se determinan mediante PCR cuantitativa (p. ej., RT-PCR), transferencia Northern, o cualquier otro método para determinar niveles de ARN, p. ej., como se describe en "Cloning: A Laboratory Manual", de Sambrook et al. (ed.), 2ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989; Lodie et al., *Tissue Eng.*, 2002, 8(5): 739-751; o como se describe en los Ejemplos. Los niveles de proteína se determinan usando transferencia Western, ELISA, ensayos de actividad enzimática, o cualquier otro método para determinar niveles de proteína como se describe, p. ej., en "Current Protocols in Molecular Biology", de Ausubel et al. (ed.), John Wiley and Sons, 1998.

Los niveles de expresión también se pueden determinar usando ensayos de gen indicador en extractos de célula/tejido o mediante obtención de imágenes de tejido o del animal completo. Además de la IRM, también se pueden obtener imágenes de tejidos en animales vivos mediante detección de fluorescencia (Hoffman *Lancet Oncol.*, 2002, 3: 546-556; Tung et al., *Cancer Res.*, 2000, 60: 4953-4958), detección de bioluminiscencia (Shi et al., *PNAS*, 2001, 98: 12754-12759; Luke et al., *J. Virol.*, 2002, 76: 12149-12161; y en las Patentes de EE.UU. Nº 5.650.135 y 6.217.847), tomografía de emisión de positrones (Liang et al., *Mol. Ther.*, 2002, 6: 73-82), fluorescencia de infrarrojo cercano (Tung et al., *Cancer Res.*, 2000, 60: 4953-4958), o imágenes de rayos X (Hemminki et al., *J. Nat. Cancer Inst.*, 2002, 94: 741-749).

Una enfermedad neurológica como la descrita en la presente memoria puede ser una enfermedad neurodegenerativa tal como, por ejemplo, ELA, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer y enfermedad de Huntington. En la invención, la enfermedad neurológica es esclerosis múltiple (EM). La forma de EM se puede seleccionar entre: EM remitente-recurrente (EMRR), EM progresiva secundaria (EMPS), EM progresiva primaria (EMPP) y EM maligna (Variante de Marburg).

El sujeto que está siendo tratado o al que se le administra el compuesto para los usos descritos en la presente memoria, es un mamífero que lo necesita, tal como un sujeto que necesita neuroprotección, que incluye un sujeto que padece, o presenta riesgo de desarrollar, una enfermedad desmielinizante y otra enfermedad neurodegenerativa especificada. El sujeto es un mamífero, y puede ser un roedor u otro animal de laboratorio, p. ej., un primate no humano. En algunas realizaciones, el sujeto es humano.

Las enfermedades neurodegenerativas se describen, por ejemplo, en "Neurodegenerative Diseases: Neurobiology, Pathogenesis and Therapeutics", M. Flint Beal, Anthony E. Lang, Albert C. Ludolph, Cambridge University Press (11 de julio de 2005). Los ejemplos de enfermedades neurológicas adecuadas para los métodos descritos en la presente memoria incluyen enfermedades neurodegenerativas tales como la esclerosis lateral amiotrófica (ELA), la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Alzheimer y la enfermedad de Huntington. Otros ejemplos incluyen enfermedades neurológicas desmielinizantes que incluyen, además de la EM, las siguientes enfermedades: leucoencefalomielitis hemorrágica aguda, enfermedad de Hurst, encefalomielitis diseminada aguda, neuritis óptica, enfermedad de Devic, lesiones de la médula espinal, mielitis necrotizante aguda, mielitis transversal, mielopatía progresiva crónica, leucoencefalopatía multifocal progresiva (LMP), mielopatía de radiación, mielopatía asociada a HTLV-1, desmielinización aislada monofásica, mielínolisis pontina central y leucodistrofia (p. ej., adrenoleucodistrofia, leucodistrofia metacrómica, enfermedad de Krabbe, enfermedad de Canavan, enfermedad de Alexander, enfermedad de Pelizaeus-Merzbacher, enfermedad de desaparición de materia blanca, síndrome oculodentodigital, síndrome de Zellweger), polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica (PDIC), polineuropatía desmielinizante inflamatoria aguda (PDIA), atrofia óptica de Leber y enfermedad de Charcot-Marie-Tooth.

Los ejemplos adicionales de enfermedades adecuadas para los métodos descritos en la presente memoria incluyen la polineuritis y los trastornos mitocondriales con desmielinización. Estos trastornos pueden presentarse conjuntamente, y posiblemente verse agravadas, con diabetes, p. ej., diabetes mellitus dependiente de insulina (DMDI; diabetes de tipo I), u otras enfermedades.

Un compuesto de ensayo puede analizarse adicionalmente en un modelo animal de EM, conocido como Encefalomielitis Autoinmune Experimental (EAE) (Tuohy et al., *J. Immunol.*, 1988, 141: 1126-1130, Sobel et al. *J. Immunol.*, 1984, 132: 2393-2401, y Traugott, *Cell Immunol.*, 1989, 119: 114-129). La EAE recurrente crónica proporciona un modelo experimental bien establecido para evaluar agentes que sería útil para el tratamiento de EM. La EAE de ratón es un trastorno desmielinizante autoinmune inducido con muchas similitudes con la EM humana en sus manifestaciones clínicas. Tanto en la EAE como en la EM, la enfermedad clínica está asociada a una disfunción de la barrera de sangre cerebral (BSC), una infiltración del sistema nervioso central por células mononucleares (principalmente macrófagos y linfocitos T, y productos de suero), y una desmielinización (Baker et al. *J. Neuroimmunol.*, 1990, 28: 261; Butter et al., *J. Neurol. Sci.*, 1991, 104: 9; Harris et al., *Ann. Neurol.*, 1991, 29: 548; Kermonde et al., *Brain*, 1990, 113: 1477).

Los signos clínicos de EM y patologías desmielinizantes en EAE son el resultado de la inmunización con proteínas o péptidos de mielina del SNC (p. ej., MBP, PLP y MOG) en condiciones de Thr1 (modelo de inmunización directa), o

mediante transferencia adoptiva de células Th1 específicas de antígeno de SNC (modelo de transferencia adoptiva) (Ben-Nun et al., Eur. J. Immunol., 1981, 11: 195-199; Ando et al., Cell Immunol., 1989, 124: 132-143; Zamvil et al., Nature, 1985, 317: 355-358; Zamvil et al., Ann. Rev. Immunol., 1990, 8: 579-621). Por ejemplo, en el modelo de ratón SJL de la EAE, la inmunización con el péptido de SNC PLP 139-151 ó transferencia adoptiva de células Th1 específicas de PLP da como resultado un curso de enfermedad que consiste en una fase aguda con pérdida de tono de cola entre los día 10 y 12, seguida de una parálisis de miembros traseros e infiltración de células mononucleares del SNC (Tuohy et al., J. Immunol., 1988, 141: 1126-1130, Sobel et al., J. Immunol., 1984, 132: 2393-2401, y Traugott, Cell Immunol., 1989, 119: 114-129). La resolución de los signos clínicos y la recuperación se producen entre los días 20 y 25 y los animales pueden sufrir varias recaídas adicionales menos severas que la fase inicial. Se ha usado la EAE para evaluar estrategias terapéuticas para la enfermedad autoinmune mediada por células T debido a las similitudes clínicas e histopatológicas con la EM desmielinizante humana.

La capacidad de un compuesto para frenar o prevenir la neurodegeneración (que incluye la desmielinización y la muerte neuronal) se puede determinar en el modelo de EAE o en otro modelo animal, que incluye por ejemplo la enfermedad desmielinizante inducida por virus de encefalomyelitis de ratón de Thielier (TMEV, del inglés "Thielier's murine encephalomyelitis virus"), virus de hepatitis de ratón (MHV, del inglés "murine hepatitis virus"), Virus de Bosque de Semliki o virus Sindbis como se describe, p. ej., en Ercoli et al., J. Immunol., 2006, 175: 3293-3298.

Se puede evaluar opcionalmente un compuesto en al menos un modelo animal adicional (véase de forma general, "Immunologic Defects in Laboratory Animals", ed. Gershwin et al., Plenum Press, 1981), por ejemplo, tal como el siguiente: el modelo de ratón SWR X NZB (SNF1) (Uner et al., J. Autoimmune Disease, 1998, 11 (3): 233-240), el modelo de ratón transgénico KRN (K/BxN) (Ji et al., Immunol. Rev., 1999, 69: 139); ratones NZB X NZW (B/W), un modelo para SLE (Riemekasten et al., Arthritis Rheum., 2001, 44(10): 2435-2445); el modelo de ratón NOD de diabetes (Baxter et al., Autoimmunity, 1991, 9(1): 61-67), etc.); o modelos de ratón de esclerosis múltiple (véase, p. ej., Linker et al., Eur. J. Immunol., 2002, 8(6): 620-624, y Fugster et al., Nat. Med., 1999, 29: 626-632; y Gold et al., Brain, 2006, 129: 1953-1971).

Las dosis preliminares, por ejemplo, tal como se determinan en los ensayos con animales, y el escalado de las dosis para administración a humanos, se llevan a cabo según las prácticas aceptadas en la técnica. Se pueden determinar la toxicidad y la eficacia terapéutica mediante procedimientos estándares en cultivos celulares o animales experimentales, p. ej., para determinar la DL₅₀ (la dosis letal para el 50 % de la población) y la DE₅₀ (la dosis terapéuticamente efectiva en el 50 % de la población). La relación de dosis entre efectos tóxicos y terapéuticos es el índice terapéutico y se puede expresar como la relación DL₅₀/DE₅₀. En algunas realizaciones se usan composiciones que presentan índices terapéuticos elevados.

La dosis terapéuticamente efectiva se puede estimar inicialmente a partir de ensayos de cultivos celulares. Se puede formular una dosis en modelos animales para alcanzar un intervalo de concentración en circulación en plasma que incluya la CI₅₀ (es decir, la concentración de compuesto terapéutico que logra una inhibición media máxima de los síntomas) según se ha determinado en ensayos de cultivos celulares o modelos animales. Los niveles en plasma se pueden medir, por ejemplo, mediante ELISA o HPLC. Los efectos de cualquier dosis particular se pueden monitorizar en un bioensayo adecuado. Los ejemplos de dosis son: aproximadamente 0,1 x CI₅₀, aproximadamente 0,5 x CI₅₀, aproximadamente 1 x CI₅₀, aproximadamente 5 x CI₅₀, 10 x CI₅₀, aproximadamente 50 x CI₅₀ y aproximadamente 100 x CI₅₀.

Los datos obtenidos de los ensayos *in vitro* o de los estudios en animales se pueden usar para formular un rango de dosis para uso en humanos. Las dosis terapéuticamente efectivas obtenidas en un modelo animal se pueden convertir para uso en otro animal, incluyendo humanos, usando factores de conversión conocidos en la técnica (véase, p. ej., Freireich et al., Cancer Chemother. Reports, 1966, 50(4): 219-244 y la Tabla 2 de Factores de Dosis de Área Superficial Equivalente).

Tabla 2

Para: De:	Ratón (20 g)	Rata (150 g)	Mono (3,5 kg)	Perro (8 kg)	Humano (60 kg)
Ratón	1	1/2	1/4	1/6	1/12
Rata	2	1	1/2	1/4	1/7
Mono	4	2	1	3/5	1/3
Perro	6	4	3/5	1	1/2
Humano	12	7	3	2	1

La dosis de dichos compuestos puede encontrarse en el intervalo de concentraciones en circulación que incluyen la DE₅₀ con escasa o nula toxicidad. La dosis puede variar dentro de este intervalo dependiendo de la forma de dosis empleada y la ruta de administración utilizada. Generalmente, una cantidad terapéuticamente efectiva puede variar

con la edad, la condición y el sexo del sujeto, así como con la gravedad de la afección médica del sujeto. Los ejemplos de dosis farmacéuticamente aceptables para los compuestos descritos en la presente memoria van de 1 µg/kg a 25 mg/kg, dependiendo de los compuestos, la gravedad de los síntomas y la progresión de la enfermedad. Las dosis terapéuticamente efectivas apropiadas pueden ser seleccionadas por un médico y aproximadamente oscilan entre 1 µg/kg y 20 mg/kg, entre 1 µg/kg y 10 mg/kg, entre 1 µg/kg y 1 mg/kg, entre 10 µg/kg y 1 mg/kg, entre 10 µg/kg y 100 µg/kg, entre 100 µg/kg y 1 mg/kg. Adicionalmente, en los Ejemplos se indican determinadas dosis específicas.

Para DMF o MMF, una cantidad efectiva puede oscilar entre 1 mg/kg y 50 mg/kg (p. ej., entre 2,5 mg/kg y 20 mg/kg o entre 2,5 mg/kg y 15 mg/kg). Las dosis efectivas también variarán, como reconocerá el especialista en la técnica, dependiendo de la ruta de administración, el uso de excipientes, y la posibilidad de utilización conjunta con otros tratamientos terapéuticos que incluyen el uso de otros agentes terapéuticos. En particular, una dosis efectiva de DMF o MMF para ser administrada a un sujeto oralmente es de 480 mg al día. Tal como se describe en la presente memoria, se pueden administrar 720 mg al día en administraciones separadas de 2, 3, 4 ó 6 dosis iguales.

La dosis puede ser determinada por un médico y ajustarse, según sea necesario, para adecuarse a los efectos observados del tratamiento. Las composiciones de pueden dar como dosis en bolo, para maximizar los niveles en circulación durante el mayor periodo de tiempo tras la dosis. También se puede usar una infusión continua tras la dosis de bolo.

Las composiciones usadas en los métodos descritos en la presente memoria comprenden además un excipiente farmacéuticamente aceptable. Tal como se usa en la presente memoria, la expresión "excipiente farmacéuticamente aceptable" se refiere a cualquiera y a todos los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y de retardo de la absorción que sean compatibles con la administración farmacéutica. El uso de dichos medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas es bien conocido en la técnica. Las composiciones también pueden contener otros compuestos activos que proporcionen funciones terapéuticas suplementarias, adicionales o mejoradas. Las composiciones farmacéuticas también se pueden incluir en un recipiente, paquete o dispensador junto con instrucciones para la administración.

Se formula una composición farmacéutica para que sea compatible con su ruta pretendida de administración. Los métodos para lograr la administración son conocidos en la técnica. La "administración" no se limita a un sistema de administración particular y puede incluir, sin limitación, administración parenteral (que incluye inyección subcutánea, intravenosa, intramedular, intraarticular, intramuscular o intraperitoneal), rectal, tópica, transdermal u oral (por ejemplo, en cápsulas (p. ej., como polvos, gránulos, microcomprimidos, micropartículas, etc.), suspensiones, o comprimidos). Ejemplos de algunas formulaciones que contienen DMF y/o MMF se proporcionan, p. ej., en las Patentes de EE.UU. nº 6.509.376 y 6.436.992.

La administración a un individuo se puede producir en una única dosis o en administraciones repetidas, y en cualquiera de diversas formas salinas fisiológicamente aceptables, y/o con un vehículo y/o aditivo farmacéuticamente aceptable como parte de una composición farmacéutica. Las formas salinas fisiológicamente aceptables y las técnicas y excipientes para formulación farmacéutica son bien conocidas por los especialistas en la técnica.

Los siguientes Ejemplos tienen un objetivo ilustrativo y no limitan las invenciones reivindicadas.

EJEMPLOS

Ejemplo 1

Se trataron células DLD1 de carcinoma de colon humano con DMF o MMF a las concentraciones indicadas (5, 15 ó 50 µM) durante 16 horas, se aclararon con PBS y se recolectaron en tampón de muestra SDS reductor. Los lisatos fueron sometidos a SDS PAGE y las proteínas separadas fueron transferidas electroforéticamente a membranas de nitrocelulosa para análisis Western blot. Para la detección de Nrf2 y NQO1, las membranas se incubaron con los respectivos anticuerpos primarios durante una noche a 4 °C, se lavaron y se incubaron con anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa seguido de sustrato quimioluminiscentes de peroxidasa. La detección de la banda de luminiscencia de la proteína diana y la adquisición de imágenes se llevaron a cabo usando una estación de imagen Kodak2000R equipada con CCD. Los resultados mostrados en la Figura 1 demuestran que el DMF y el MMF son potentes activadores del Nrf2 a concentraciones dentro del rango de exposición clínica.

Ejemplo 2

Se cultivaron células DLD1 en MEM suplementado con suero bovino fetal al 10 %. Las células fueron transfectadas con los ARNsi indicados usando el reactivo Lipofectamine (Invitrogen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante y 30 horas después se estimularon con DMF 30 µM durante 40 horas. Las células se recolectaron y procesaron para análisis de transferencia Western de los niveles de Nrf2 y NQO1 como se ha descrito en el Ejemplo 1. Las fuentes y la identidad de los reactivos usados en los Ejemplos 1 y 2 se especifican en la Tabla 3 presentada a continuación:

	Diana	Reactivo	Fuente/Secuencia	Vendedor
Anticuerpo primario	Nrf2	Nrf2 (T-19)	anticuerpo policlonal de cabra	Santa Cruz Biotechnology
	Keap1	Keap1 (E-20)	anticuerpo policlonal de cabra	Santa Cruz Biotechnology
	NQO1	NQO1 (A180)	anticuerpo monoclonal de ratón	Santa Cruz Biotechnology
	GAPDH	Anti-GAPDH	anticuerpo monoclonal de ratón	Ambion
Anticuerpo secundario	antirratón	HRP-IgG de ratón	oveja	Amersham Biosciences
	anti-conejo	HRP-IgG de conejo	asno	Amersham Biosciences
	anti-cabra	HRP-IgG de cabra	bovino	Santa Cruz Biotechnology
ARNsi	Nrf2	Nrf2-2	UCAUUGAACUGC UCUUUGGUU (antisentido) (SEQ ID NO: 17)	Dharmacon
	Keap1	Keap1-1	GAAUUAAGGCGG UUUGUCCUU (antisentido) (SEQ ID NO: 18)	Dharmacon

Los resultados se muestran en la Figura 2 (para facilitar la representación, la imagen del Western blot está representada al revés). Los resultados demuestran que la regulación al alza inducida por DMF de NQO1 requiere Nrf2 y puede ser replicada mediante activación de Nrf2 a través de la represión de Keap1. Por lo tanto, el DMF actúa como agonista de Nrf2 provocando la acumulación celular de Nrf2 y la expresión de gen diana de Nrf2.

Ejemplo 3

Para la inducción de EAE, los ratones recibieron inyecciones s.c. en los costados y en la base de la cola de 50 µg de péptido MOG 35-55 en PBS emulsificado en un volumen igual de adyuvante de Freund completo (CFA, del inglés "complete Freund's adjuvant") que contenía tuberculosis H37RA de Mycobacterium (Difco, Detroit, MI, EE.UU.) a una concentración final de 0.5 mg/mL. En los días 0 y 2 se administraron dos inyecciones de toxina pertussis (List Biological Laboratories Inc., California, EE.UU.; 200 ng por ratón i.p.).

Se diluyeron el DMF y el MMF en 200 µL de Methocel/H₂O al 0,08 % como vehículo y se administraron oralmente comenzando en el día 3 después de la inmunización (p.i.) hasta la finalización. Cada grupo de tratamiento consistió en 8 animales: solo vehículo como control negativo, 5 mg/kg de peso corporal de DMF dos veces al día, 15 mg/kg de peso corporal de DMF dos veces al día, 15 mg/kg de peso corporal de MMF dos veces al día. Los compuestos se obtuvieron a través de Fumapharm AG. Se usó la administración oral para asegurar una dosificación exacta y evitar la degradación del compuesto.

Se fijaron tejidos de espina dorsal en paraformaldehído al 4 % y se embebieron en parafina. Se desparafinaron láminas y se rehidrataron en disoluciones graduadas de alcohol. La recuperación de antígenos se llevó a cabo sumergiendo las láminas en Citrato 10 mM, pH 6,0 durante 20 minutos en un horno a presión a 120 °C (Pascal, Dako Cytomation).

Se aplicó inmunohistoquímica usando el auto-teñidor Dako como se indica a continuación. La reacción de peroxidasa endógena se detuvo mediante una incubación de 10 minutos en H₂O₂ / Metanol al 3 %. Se añadió anticuerpo de Nrf2 anti conejo C-20 (sc-722, Santa Cruz Biotechnology) a una dilución de 1:250 en Diluyente Dako con Componentes Reductores de Fondo (Dako nº S3022). El anticuerpo C-20 se detectó usando HRP-polímero marcado anti-conejo Envision (Dako nº K4003) y se usó DAB (Vector Labs nº SK-4100) como sustrato cromogénico. Se llevó a cabo un análisis morfométrico de inmunotinción de Nrf2 usando el software ImageJ de NIH.

Los resultados, mostrados en las Figuras 3 y 4, demuestran la activación por MMF y DMF de Nrf2 *in vivo*.

REIVINDICACIONES

- 1.- Una composición farmacéutica para uso en el tratamiento de esclerosis múltiple, composición que consiste en:
 - (a) dimetil fumarato o monometil fumarato, y
 - (b) uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables,5 donde la composición debe administrarse oralmente a un sujeto que necesite en el tratamiento para esclerosis múltiple, y
donde la dosis de dimetil fumarato o monometil fumarato que debe administrarse es de 480 mg al día.
- 2.- La composición farmacéutica para uso como en la reivindicación 1, donde la composición consiste en dimetil fumarato y uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables.
- 10 3.- La composición farmacéutica para uso como en la reivindicación 1, donde la composición consiste en monometil fumarato y uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables.
- 4.- La composición farmacéutica para uso como en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde la composición debe administrarse en forma de un comprimido, una suspensión o una cápsula.
- 15 5.- La composición farmacéutica para uso como en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde la composición se debe administrar al sujeto durante 5, 10, 12, 20, 40, 52, 100 ó 200 semanas o más.
- 6.- La composición farmacéutica para uso como en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde la composición debe administrarse al sujeto durante al menos 12 semanas.
- 20 7.- Dimetil fumarato o monometil fumarato para uso en el tratamiento de esclerosis múltiple, donde el dimetil fumarato o el monometil fumarato es el único compuesto neuroprotector que se va a administrar, y donde el dimetil fumarato o el monometil fumarato se debe administrar oralmente a un sujeto que necesite el tratamiento para esclerosis múltiple con una dosis de 480 mg al día.
- 8.- Dimetil fumarato para uso como en la reivindicación 7, donde el dimetil fumarato es el único compuesto neuroprotector que debe administrarse.
- 25 9.- Monometil fumarato para uso como en la reivindicación 7, donde el monometil fumarato es el único compuesto neuroprotector que debe administrarse.
- 10.-El dimetil fumarato o monometil fumarato para uso como en una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, donde el dimetil fumarato o el monometil fumarato deben administrarse en forma de un comprimido, una suspensión o una cápsula.
- 30 11.-El dimetil fumarato o monometil fumarato para uso como en una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 10, donde el dimetil fumarato o el monometil fumarato deben administrarse al sujeto durante 5, 10, 12, 20, 40, 52, 100 ó 200 semanas o más.
- 12.-El dimetil fumarato o monometil fumarato para uso como en una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 11, donde el dimetil fumarato o el monometil fumarato deben administrarse al sujeto durante al menos 12 semanas.

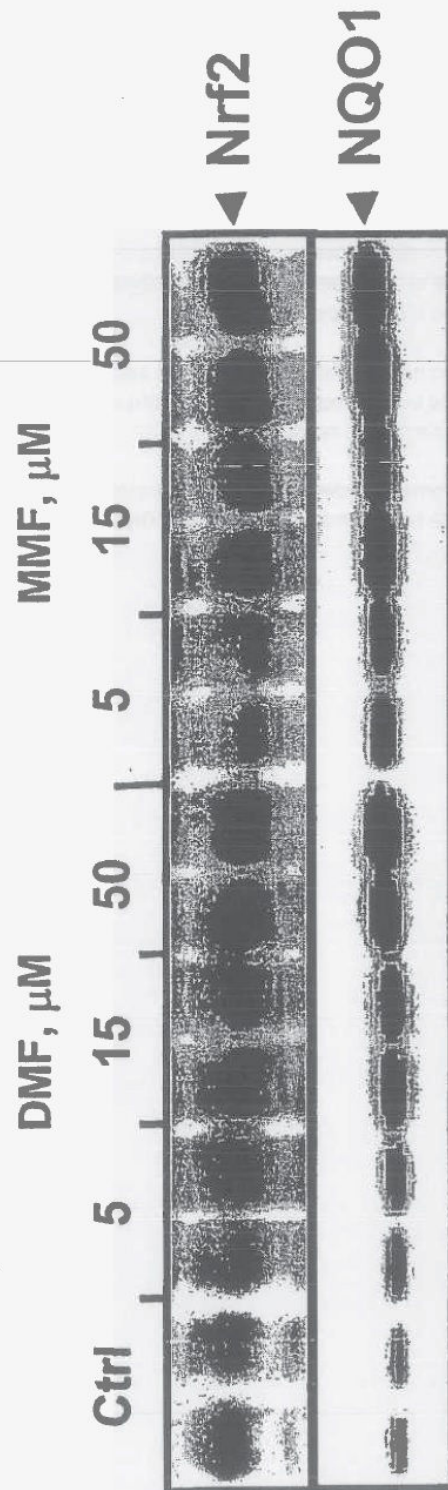


Figura 1

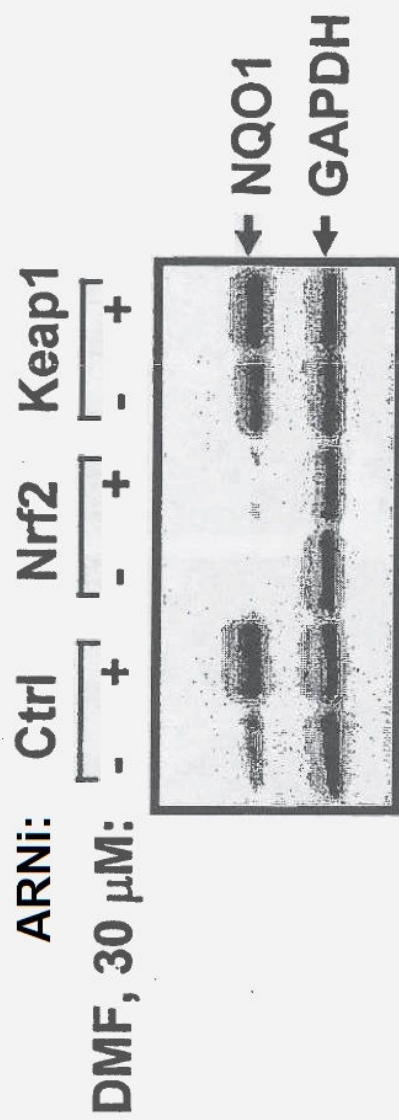


Figura 2

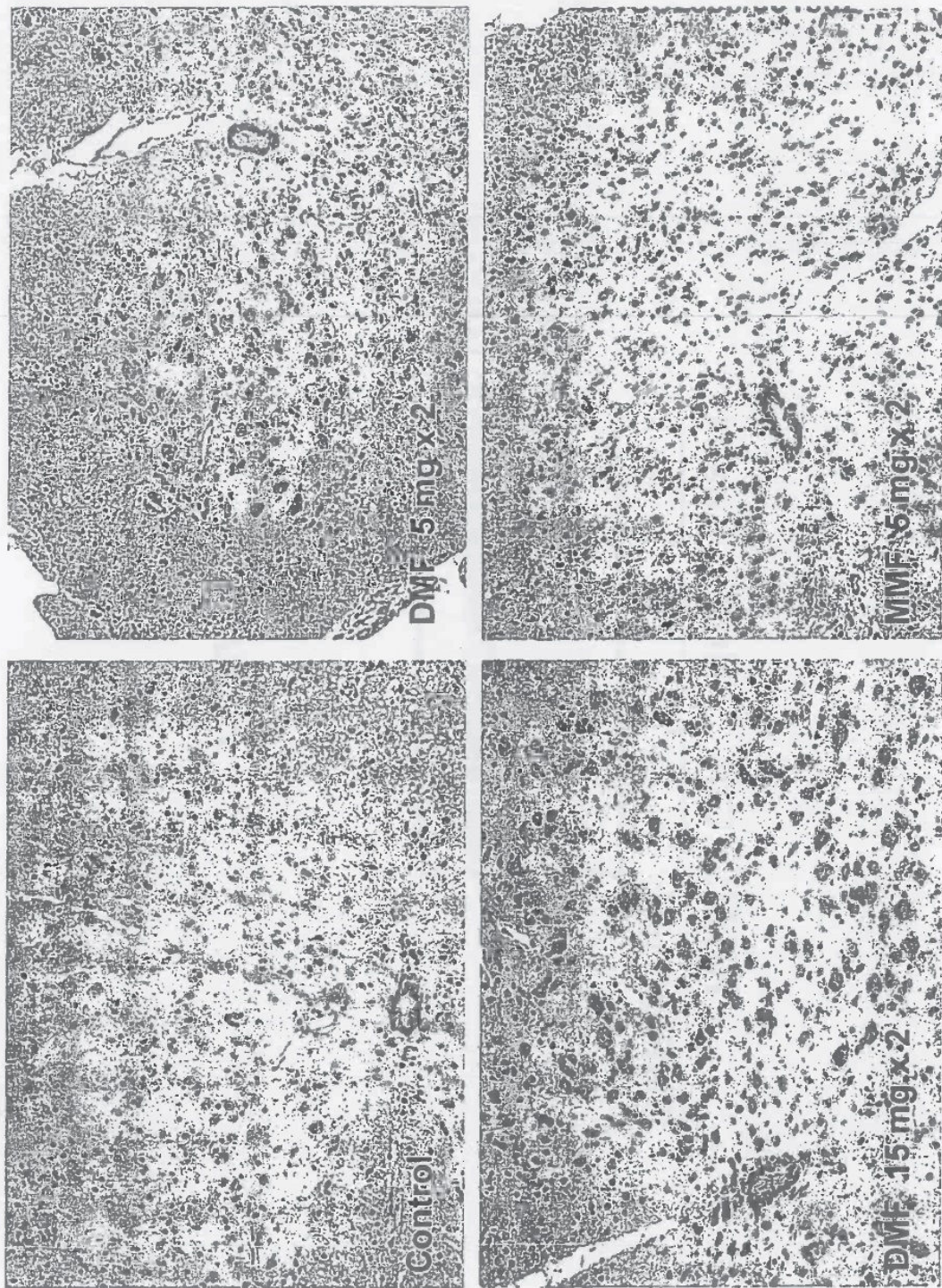


Figura 3

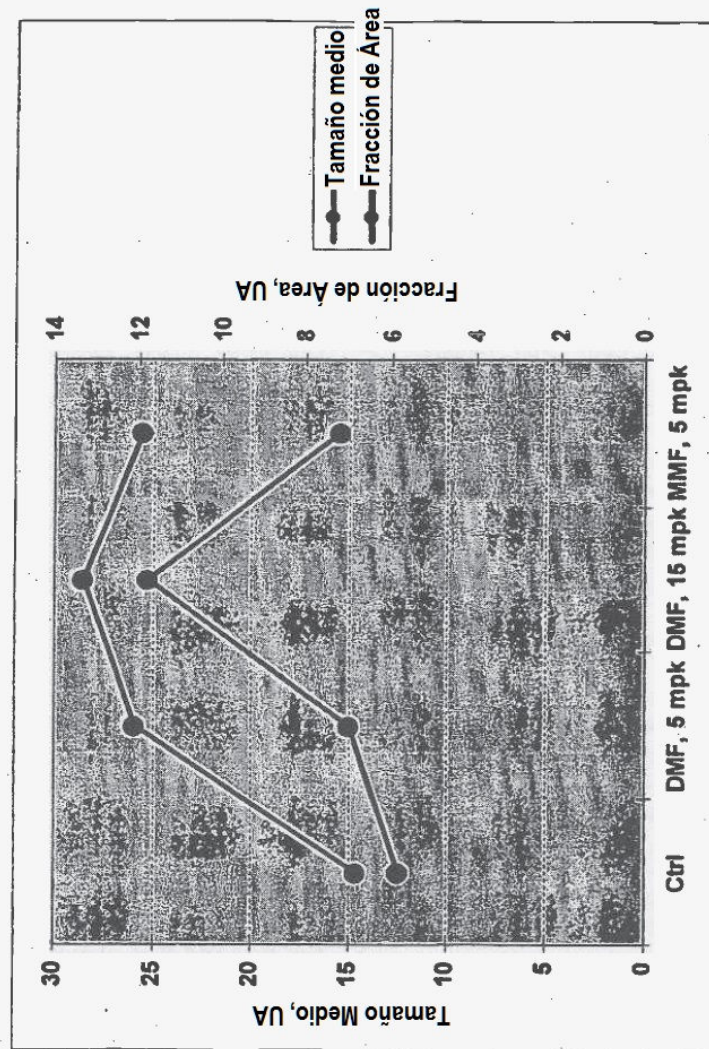


Figura 4