

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 530 847**

51 Int. Cl.:

**A61K 45/06** (2006.01)

**A61K 31/137** (2006.01)

**A61K 31/4365** (2006.01)

**A61P 25/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.03.2010 E 10711227 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.01.2015 EP 2413970**

54 Título: **Nuevas estrategias terapéuticas para tratar afecciones neuroinflamatorias**

30 Prioridad:

**30.03.2009 EP 09305265**

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

**06.03.2015**

73 Titular/es:

**PHARNEXT (100.0%)  
11 Rue des Peupliers  
92130 Issy-les-Moulineaux , FR**

72 Inventor/es:

**COHEN, DANIEL;  
NABIROTCHKIN, SERGUEI y  
CHUMAKOV, ILYA**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

**ES 2 530 847 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

Nuevas estrategias terapéuticas para tratar afecciones neuroinflamatorias

**Campo de la invención**

5 La presente invención se refiere generalmente a los campos de la farmacología y la medicina. Más específicamente, la presente invención se refiere a nuevas terapias combinatorias para el tratamiento de la neuroinflamación, en particular en sujetos que tienen un trastorno neurodegenerativo, autoinmune, infeccioso, tóxico o traumático. La invención también describe nuevas composiciones y métodos para tratar enfermedades neuroinflamatorias, tales como esclerosis múltiple.

**Antecedentes de la invención**

10 La neuroinflamación implica principalmente la presencia y activación, en el tejido neural, de dos tipos de células inmunes: microglia (Stoll y Jander, 1999) y leucocitos (Man et al., 2007), causando la liberación local de mediadores inmunes. Las células microgliales son células residentes del sistema nervioso central (SNC) (Kreutzberg, 1996), que participan en su vigilancia inmune y defensa. Se activan en condiciones patológicas y adquieren funciones que finalmente dan lugar a procesos de degeneración por daño o muerte de neuronas (Tilleux y Herman, 2007). Los  
15 leucocitos están localizados a lo largo del cuerpo, incluyendo la sangre y sistema linfático. En condiciones fisiológicas, sólo pequeños números de leucocitos tales como linfocitos T están presentes en el parenquima del SNC. Su paso está limitado por la barrera hemato-encefálica (BBB) (Wekerle et al., 1986; Hickey et al., 1991; Carvey et al., 2005), que es una barrera hermética compuesta por células endoteliales que controla el acceso de elementos de la corriente sanguínea al SNC (Rubin y Staddon, 1999; Prat et al., 2001). En condiciones patológicas, los  
20 leucocitos hematógenos dejan fácilmente la corriente sanguínea y alcanzan el parenquima para participar en una respuesta inflamatoria destructiva (Man et al., 2007; Cardona et al., 2008), ya que se ha mostrado que la integridad de la BBB está alterada durante la inflamación (Lossinsky y Shivers, 2004).

Se ha propuesto que la neuroinflamación está implicada en la naturaleza progresiva de las enfermedades neurodegenerativas (Block y Hong, 2005). La implicación de la neuroinflamación es muy conocida, por ejemplo, en  
25 trastornos neurológicos, tales como Esclerosis múltiple (MS), enfermedad de Alzheimer (AD), enfermedad de Parkinson (PD), Esclerosis lateral amiotrófica (ALS), encefalomiелitis diseminada aguda (ADEM) y Neuromielitis óptica (NMO).

La patogénesis precisa de AD permanece sin aclararse. Sin embargo, se ha propuesto la hipótesis de que AD se manifiesta por una alteración de la BBB y neuroinflamación. De hecho, se ha encontrado un número incrementado  
30 de Ig (Ishii y Haga, 1976; Mann et al., 1982; Licandro et al., 1983) en el parenquima cerebral, así como células T CD4 o CD8 (Itagaki et al., 1988; Rogers et al., 1988; McGeer et al., 1989; Singh, 1997; Neumann, 2001) en el hipocampo y corteza temporal de pacientes con AD. Las moléculas de la clase I y II del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), implicadas en la presentación del antígeno y unión a células T también se han  
35 identificado en áreas que muestran una patología distintiva (Itagaki et al., 1988; Rogers et al., 1988; McGeer et al., 1989; Mattiace et al., 1990; Perlmutter et al., 1992; Gonzalez-Scarano y Baltuch, 1999; Szpak et al., 2001; Kim y de Vellis, 2005; Walker y Lue, 2005).

PD es otro trastorno neurodegenerativo de etiología desconocida. Se ha propuesto la hipótesis de que la alteración de la BBB es un mecanismo causal en PD (Kortekaas et al., 2005). Se ha sugerido que en el estado inflamatorio, los  
40 receptores VCAM-1 e ICAM-1 están regulados al alza, debido a la liberación microglial de citoquinas proinflamatorias (Neumann y Wekerle, 1998). Esta regulación al alza resulta en el reclutamiento de células T y monocitos que portan los diferentes contra receptores adecuados (CD11a/CD18 (LFA-1) y antígeno-4 muy tardío) (Neumann y Wekerle, 1998).

La encefalomiелitis diseminada aguda (ADEM) es un trastorno inflamatorio mediado por inmunidad del SNC. Es una enfermedad monofásica que puede surgir espontáneamente. Sin embargo, el 5 a 25% de los pacientes  
45 experimentan recaída (Marchioni et al., 2005; Tenenbaum et al., 2002) con formas recurrentes o multifásicas. Los síntomas más importantes incluyen fiebre, dolor de cabeza, mareos, convulsiones y coma. La proporción de mortalidad puede alcanzar el 5% (Menge et al., 2007). La etiología exacta de ADEM es actualmente desconocida. Se caracteriza por una desmielinización generalizada en la materia blanca del cerebro y médula espinal. También puede implicar la corteza y estructuras de materia gris profunda. Desde un punto de vista histológico, ADEM se  
50 caracteriza por infiltrados perivenulares de células T y macrófagos, asociado con desmielinización. También se ha identificado daño axonal en los cerebros de algunos pacientes (DeLuca et al., 2004; Ghosh et al., 2004). Se ha sugerido que ADEM puede resultar de la activación de clones de células T reactivos a mielina implicados en un proceso inflamatorio no específico (Tenenbaum et al., 2007). ADEM se compara con la esclerosis múltiple, ya que implica desmielinización autoinmune (Rust, 2000; Poser, 2008). No existe una terapia estándar para ADEM ya que  
55 los resultados se obtienen generalmente de informes de casos y series pequeñas. Los tratamientos comprenden habitualmente terapia inmunosupresora no específica, tal como esteroides, inmunoglobulina, o intercambio de plasma, que se usan en otras enfermedades autoinmunes incluyendo MS (Tenenbaum et al., 2007).

La neuromielitis óptica (NMO) es una enfermedad autoinmune, inflamatoria y desmielinizante infrecuente del SNC que afecta a la mielina de las neuronas situadas en los nervios ópticos y médula espinal. La enfermedad puede ser monofásica o recurrente (Ghezzi et al., 2004). La inflamación extensa del nervio óptico (neuritis óptica) y médula espinal (mielitis) da lugar habitualmente a alteración neurológica grave, permanente, relacionada con recurrencias (por ejemplo, ceguera, paraplejia) en 5 años (Wingerchuk y Weinschenker, 2005). Las características distintivas de NMO son lesiones inflamatorias, cavitación, necrosis y patología axonal. Se han observado tanto en la materia gris como blanca de la médula espinal y nervios ópticos (Lucchinetti et al., 2002). En el inicio de la enfermedad, el parenquima cerebral es normal o puede demostrar pocos cambios no específicos en la materia blanca subcortical. Se ha sugerido que las lesiones cerebrales asintomáticas son frecuentes en NMO en un estadio posterior de la enfermedad (Pittock et al., 2006). Hasta hace poco, se consideraba que NMO era una variante de la esclerosis múltiple. Sin embargo, las características clínicas, de neuroimagen, de laboratorio y patológicas son diferentes. Por ejemplo, los ataques de NMO no están mediados por células T sino por células B de una manera autoinmune (Lucchinetti et al., 2002). Actualmente, no existe un tratamiento óptimo establecido para NMO ya que no se han realizado estudios controlados aleatorizados. Actualmente, los corticosteroides parenterales se emplean ampliamente como tratamiento de primera línea para la neuritis óptica y ataques de mielitis (Mandler et al., 1998), mientras la plasmaféresis terapéutica que tiene como objetivo eliminar autoanticuerpos, complejos inmunes y mediadores inflamatorios del plasma, se aplica en el caso de que fallen los corticosteroides (Keegan et al., 2002; Lehmann et al., 2006).

La esclerosis múltiple se considera como una enfermedad desmielinizante inflamatoria del SNC (Skaper, 2007; Lassmann et al., 2007). Para el 85% de los pacientes, el curso de la enfermedad empieza con una fase de problemas neurológicos recurrentes y reversibles denominado MS Recurrente-Remitente (RRMS). Esta afección aparece sobre la tercera-cuarta década de la vida. Puede durar años y décadas, con fases alternantes de ataques con recaídas, durante las cuales los pacientes recuperan la función neurológica (Trapp y Nave, 2008). Los ataques duran de unos pocos días a semanas, y las remisiones de unos pocos meses a años. Después de 8 a 20 años, los pacientes entran en MS Secundaria Progresiva (SPMS) que se caracteriza por un decline neurológico continuo e irreversible. Una enfermedad más rara denominada MS Primaria Progresiva (PPMS) afecta al 15% de los pacientes con MS. No ocurren recaídas en la forma PPMS de la enfermedad y la enfermedad es progresiva desde el inicio. Ocurre más tarde que la forma RRMS (39 frente a 29 años). El cincuenta por ciento de los pacientes con MS son incapaces de realizar responsabilidades hogareñas y laborales 10 años después del inicio de la enfermedad, y el 50% son no ambulatorios 25 años después del inicio de la enfermedad (Trapp y Nave, 2008). Las alteraciones morfológicas en la anatomía del SNC dan lugar a parálisis, alteraciones sensoriales, ausencia de coordinación, y alteración visual entre las características más comunes. Estas alteraciones (detectadas por imágenes de resonancia magnética (MRI), evaluaciones histopatológicas y curso de la enfermedad varían significativamente entre pacientes (Agrawal y Yong, 2007).

La esclerosis múltiple (MS) es la enfermedad neurológica no traumática más frecuente entre los adultos jóvenes en América del Norte y Europa, con una incidencia de 3,6 y 2,0 casos por 100.000 personas-año para mujeres y hombres, respectivamente (Alonso y Hernan, 2008). Múltiples factores tales como genética, medioambiente y agentes infecciosos son parte del desarrollo de MS. Se considera una enfermedad no heredada. Sin embargo, se puede heredar una mayor susceptibilidad a adquirir MS y se ha propuesto que MS es una enfermedad compleja que implica múltiples genes con una baja penetrancia (Olsson y Hillert, 2008). Un riesgo incrementado de desarrollar MS también se ha asociado con la clase II del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) (Trapp y Nave, 2008), incluyendo el gen HLA-DRB1 que representa el 16 a 60% de la susceptibilidad genética (Haines et al., 1998). Esto apoya la implicación del sistema inmune en la fisiopatología de MS. Se han asociado con MS genes de susceptibilidad adicionales, tales como cadena alfa del receptor Interleuquina-7 y 2 que presentan una razón de probabilidades baja de 1,3 (Olsson y Hillert, 2008). La inflamación, degradación de BBB, desmielinización y transección axonal son características patológicas de la lesiones de MS agudas. En la fase RRMS, la discapacidad está causada por áreas focales de inflamación donde se destruyen la mielina, oligodendrocitos (responsables de la formación de mielina) y axones (Ganter et al., 1999; Bjartmar et al., 2000; Lovas et al., 2000; Trapp et al., 1998). La atención se centra principalmente en las lesiones desmielinizadas en la materia blanca en el estadio crónico de la enfermedad. Sin embargo, se ha acumulado evidencia de que áreas grandes de la materia gris también están afectadas en los pacientes con MS (Stadelmann et al., 2008). Se ha mostrado que las células T (principalmente células T CD8+ restringidas a la clase I de MHC) participan activamente en la inflamación, además de microglia activadas (Lassmann et al., 2007). Además, se ha observado alteración de la BBB (Hochmeister et al., 2006; Kirk et al., 2003), permitiendo a las células T entrar en el SNC. La recaída dura unos pocos meses y los pacientes recuperan la función neurológica, debido a la resolución de la inflamación y remielinización (Trapp et al., 1998; Ferguson et al., 1997). La transición hacia los estadios SPMS y PPMS ocurre cuando el SNC no puede compensar por más tiempo la pérdida neuronal adicional (Trapp et al., 1999). En los estadios SPMS y PPMS, permanece la desmielinización focal de la materia blanca, pero son infrecuentes nuevas lesiones inflamatorias activas desmielinizantes. Las lesiones activas preexistentes se extienden lentamente, mostrando una pequeña actividad de degradación de mielina especialmente en los márgenes. Estas lesiones muestran infiltrados inflamatorios moderados, principalmente compuestos por células T (células T CD8+) y microglia activa (Prineas et al., 2001). Además, se observa la atrofia difusa de la materia gris y blanca así como "materia blanca con apariencia normal" (NAWM) (Miller et al., 2002).

Los mecanismos de la enfermedad pertinentes a la neuroinflamación se han inferido frecuentemente de la Encefalomiелitis Autoinmune Experimental (EAE), un modelo animal de MS. Este modelo se induce por la sensibilización de los animales con tejido cerebral, mielina o antígenos proteicos o por transferencia pasiva de células T autorreactivas (Lassmann, 2008). Los animales desarrollan una enfermedad desmielinizante inflamatoria que se parece mucho a MS (Lassmann, 2008). Este modelo también apoya la hipótesis según la cual MS es una enfermedad autoinmune. De hecho, los datos inmunológicos muestran células T autorreactivas y autoanticuerpos en la circulación y en el fluido cerebroespinal. Como la inflamación es una característica distintiva principal de las lesiones de MS aguda, se han evaluado estrategias anti-inflamatorias agresivas durante RRMS, realizando efectos neuroprotectores. El interferón  $\beta$  (IFN $\beta$ ) y acetato de glatiramer (GA) se usan comúnmente para tratar RRMS. Los efectos inflamatorios de IFN $\beta$  se refieren a la disminución de la presentación de antígeno, apoptosis, y entrada de células inmunes en el SNC (Neuhaus et al., 2005). GA mimetiza la proteína básica de mielina (MBP), un componente principal de la mielina del SNC. Reduce la presentación de antígeno y estimula la secreción por células T de citoquinas asociadas con acciones anti-inflamatorias o linfocitos T auxiliares 2 (Neuhaus et al., 2001). Natalizumab, un anticuerpo monoclonal humanizado específico para integrinas  $\alpha 4$ , también se ha propuesto para el tratamiento de RRMS (Polman et al., 2006; O'Connor et al., 2004). Otro estudio sugiere un papel de eritropoyetina recombinante como un agente protector en MS, pero hay numerosos problemas asociados con esta estrategia ya que el uso de eritropoyetina y análogos de eritropoyetina da lugar al direccionamiento simultáneo hacia las propiedades eritropoyéticas y protectoras de tejidos de la eritropoyetina (Konstantinopoulos et al., 2007).

Existe una necesidad de terapias eficientes para tratar la neuroinflamación. También existe una gran necesidad en la técnica de terapias nuevas y efectivas para el tratamiento de enfermedades que tienen un componente neuroinflamatorio, tales como esclerosis múltiple, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, esclerosis lateral amiotrófica, encefalomiелitis diseminada aguda y neuromiелitis óptica.

#### Resumen de la invención

El propósito de la presente invención es proporcionar nuevas estrategias terapéuticas para el tratamiento de afecciones neuroinflamatorias, en particular específicas para enfermedades neurológicas. La invención proporciona específicamente nuevas composiciones para tratar la neuroinflamación por la modulación (por ejemplo, reducción o reversión) de dicha afección en un sujeto. En particular, la invención se refiere a terapias combinadas para tratar la neuroinflamación afectando la cascada de extravasación.

El objeto de esta invención se refiere a una composición como se define en las reivindicaciones. La invención también describe una composición que comprende una combinación de al menos dos compuestos seleccionados de irbesartán, idraparinux, otamixabán, SR48692, cilostazol, mecamilamina, y clopidogrel, o sales, profármacos, derivados, o formulaciones de liberación sostenida de éstos, para uso en el tratamiento de la neuroinflamación.

La presente invención también describe composiciones que comprenden compuestos que modifican la cascada de extravasación de leucocitos modulando la permeabilidad del endotelio, formación de matriz extracelular, adhesión y motilidad celulares, tensión de cizalla en el endotelio y agregación plaquetaria.

La presente invención describe además composiciones para tratar la neuroinflamación, que comprenden una combinación de al menos dos compuestos seleccionados del grupo que consiste en un modulador de la permeabilidad del endotelio, un modulador de la formación de matriz extracelular, un modulador de la adhesión y motilidad celulares, modulador de la tensión de cizalla en el endotelio y un modulador de la agregación plaquetaria, o sales o profármacos o derivados o formulaciones de liberación sostenida de éstos.

Las composiciones según la invención pueden usarse para tratar la neuroinflamación en un sujeto que tiene un trastorno neurodegenerativo, autoinmune, infeccioso, tóxico o traumático.

Preferiblemente, las composiciones según la invención se usan para tratar la neuroinflamación en un sujeto que tiene esclerosis múltiple (MS).

La presente invención también describe una composición para uso en el tratamiento de la esclerosis múltiple, que comprende una combinación de al menos dos compuestos seleccionados del grupo que consiste en irbesartán, idraparinux, otamixabán, SR48692, mecamilamina, cilostazol, clopidogrel, o sales o profármacos o derivados, o formulaciones de liberación sostenida de éstos. La presente invención también describe una composición que comprende una combinación de al menos mecamilamina y clopidogrel, o sales, profármacos, derivados o formulaciones de liberación sostenida de éstos.

Además, la invención también describe una composición que comprende una combinación de al menos mecamilamina y clopidogrel, o sales, profármacos, derivados o formulaciones de liberación sostenida de éstos, para uso en el tratamiento de la esclerosis múltiple. La presente invención describe además una composición que comprende una combinación de al menos dos compuestos elegidos del grupo que consiste en irbesartán, idraparinux, otamixabán y SR48692, sales, profármacos, derivados o formulaciones de liberación sostenida de éstos.

También, la invención también describe una combinación de al menos irbesartán, idraparinux, otamixabán y SR48692, sales, profármacos, derivados o formulaciones de liberación sostenida de éstos.

La invención también describe un método para tratar la neuroinflamación en un sujeto humano o animal, que comprende administrar a dicho sujeto, que lo necesita, una cantidad efectiva de una composición de la invención.

- 5 La invención también describe un método para tratar esclerosis múltiple en un sujeto, que comprende administrar a dicho sujeto, que lo necesita, una cantidad efectiva de una composición de la invención.

Como se describirá adicionalmente en la presente solicitud, los compuestos de las composiciones de la invención pueden administrarse simultáneamente, separadamente, secuencialmente y/o repetidamente al mismo sujeto.

- 10 La invención también describe un método para evaluar la eficacia del tratamiento de la neuroinflamación en un sujeto, en el que las células derivadas del sujeto se exponen *in vitro* a una composición de la invención.

#### Leyenda breve de las figuras

- 15 Figura 1: Evolución de la puntuación clínica global después del tratamiento combinatorio de mecamilamina y clopidogrel. La puntuación clínica global del modelo EAE en ratones se analiza durante los 28 días siguientes a la inmunización. El tratamiento está constituido por hidrógeno sulfato de clopidogrel (270 µg/kg/día proporcionado oralmente, SIGMA, 098K46261) e hidrocloreuro de mecamilamina (9 µg/kg/día proporcionado oralmente, TOCRIS, 1A/92335). La media de la puntuación clínica de cada grupo (n= 10 ratones para cada grupo) se calculó +/- error estándar de la media para los días 0, 5, 8, 9, 12, 14, 16, 19, 21, 23, 26 y 28 días después de la inmunización (meca+clopi significa tratamiento combinatorio mecamilamina y clopidogrel).

#### Descripción detallada de la invención

- 20 La presente invención proporciona nuevas estrategias terapéuticas para el tratamiento de la neuroinflamación y enfermedades neuroinflamatorias. La invención describe nuevas composiciones y métodos, que permiten una corrección efectiva de dichas enfermedades y pueden usarse en cualquier sujeto mamífero.

- 25 En particular, los inventores han identificado varios compuestos que, en combinación o combinaciones, pueden influir efectivamente en rutas biológicas que dan lugar a la neuroinflamación, modulando estadios específicos de la migración patológica de las células inmunes a través de la barrera hemato-encefálica.

- 30 En el contexto de la invención, el término "neuroinflamación" designa una afección patológica caracterizada por un daño o destrucción de tejido neural (tal como sin limitación células del sistema nervioso central, incluyendo, por ejemplo, células neuronales o gliales (por ejemplo, oligodendrocitos), o sus fragmentos específicos, tales como neuritas, axones, o mielina) que resulta de la inducción de células inmunes. En particular, la neuroinflamación puede estar provocada por la activación de células microgliales que liberan citoquinas proinflamatorias y/o por la activación de células T y/o B y/o monocitos/macrófagos. El término "neuroinflamación" incluye particularmente afecciones patológicas caracterizadas o causadas por la extravasación de leucocitos a través de la barrera hemato-encefálica en al parenquima cerebral, siguiendo procesos tales como, por ejemplo, rodamiento, activación, adhesión, locomoción, protrusión, y/o transmigración de leucocitos.

- 35 En el contexto de la invención, el término "trastorno neuroinflamatorio o enfermedad neuroinflamatoria" designa una enfermedad que tiene un componente de neuroinflamación tal como, en particular, un trastorno neurodegenerativo, autoinmune, infeccioso, tóxico o traumático, en el que el componente inflamatorio podría ser un factor etiológicamente o patológicamente exacerbante. Preferiblemente, dichas enfermedades neurodegenerativas, autoinmunes, infecciosas, tóxicas o traumáticas con componente inflamatorio incluyen esclerosis múltiple (MS), enfermedad de Alzheimer (AD), enfermedad de Parkinson (PD), Esclerosis lateral amiotrófica (ALS), Encefalomiелitis diseminada aguda (ADEM) y Neuromielitis óptica (NMO).

- 40 En el contexto de la invención, el término "tratamiento" incluye la terapia curativa, prevención, profilaxis, retraso o reducción de dolor y distrés provocados por la neuroinflamación o por enfermedades neuroinflamatorias como se ha definido anteriormente. El término "tratamiento" incluye en particular el control de la progresión de la neuroinflamación y síntomas asociados.

- 45 En el contexto de la invención, el término "compuesto" o "fármaco" designa los compuestos químicos como se nombran específicamente en la solicitud o se identifican con su número CAS correspondiente, así como cualquier sal, hidrato, éster, éter, isómeros, racemato, conjugados, pro-fármacos de éstos farmacéuticamente aceptables de cualquier pureza.

- 50 También, el término "combinación" o "terapia combinatoria" o "tratamiento combinatorio" designa un tratamiento en el que al menos dos o más compuestos se co-administran a un sujeto para causar un efecto biológico. En una terapia combinada según esta invención, los al menos dos fármacos pueden administrarse juntos o separadamente, al mismo tiempo o secuencialmente. También, los al menos dos fármacos pueden administrarse mediante diferentes

rutas y protocolos. Como resultado, aunque pueden formularse conjuntamente, los fármacos de una combinación también pueden formularse separadamente.

Las terapias combinatorias de la invención están dirigidas principalmente a rutas biológicas, que se han identificado por los inventores como implicadas en la neuroinflamación. Más específicamente, un análisis profundo de los resultados de experimentos de biología celular, formación de perfiles de expresión pan-genómicos y estudios de asociación genética que revelan mecanismos moleculares y celulares subyacentes a las características patofisiológicas de la neuroinflamación, han permitido a los inventores descifrar rutas biológicas implicadas en las afecciones neuroinflamatorias, y crear un modelo biológico de redes de neuroinflamación de rutas celulares desreguladas, dando lugar a daño de tejido neural. Los inventores priorizaron las redes funcionales ligadas a la migración de células inmunes al SNC a través de la barrera hemato-encefálica, una etapa clave en la patogénesis de la neuroinflamación y trastornos neuronales que comprenden una parte inflamatoria importante.

La interacción de las células inmunes con el compartimento del endotelio es un proceso complejo por etapas controlado estrictamente a los niveles celular y molecular. La migración transendotelial de las células inmunes a tejido dañado (extravasación) se reconoce como un proceso fisiológico clave, que está implicado en la inmunidad tanto innata como adaptativa, y, por lo tanto, juega un papel protector en condiciones normales o podría dar lugar a la destrucción incontrolada de tejido, cuando se desregula por estímulos patológicos.

Los estímulos inflamatorios, tales como histamina o citoquinas TNF $\alpha$  o IL-1, provocan un remodelado funcional profundo de las células endoteliales y las transforman en mediadores efectivos del reclutamiento y paso de los leucocitos a tejidos dañados. Las células endoteliales activadas son capaces de capturar quimioquinas, producidas por otras células en su superficie y, de esta manera, crear un microentorno óptimo para la adhesión de leucocitos en endotelio activado.

La adhesión de leucocitos al endotelio incluye la captura temporal dependiente de selectina y rodamiento de los leucocitos en el endotelio, seguido de arresto de leucocitos desencadenado por quimioquinas. La transición del estadio de rodamiento lento a arresto de leucocitos en el endotelio está mediada por las integrinas de leucocitos, que se unen a sus ligandos, por ejemplo ICAM1/2 y VCAM1, expresados en las células endoteliales (Campbell et al., 1998).

La adherencia fuerte y específica de los leucocitos al endotelio, estimulada por estímulos inflamatorios, finaliza por la migración (diapédesis) de las células inmunes a través de la capa de células endoteliales y membrana basal a tejidos dañados extravasculares. La migración de leucocitos ocurre bien a través de contactos celulares en el endotelio (ruta intercelular) o a través del citoplasma de las células endoteliales (ruta transcelular) (Jordan y Sessa, 2007; Vestweber, 2007).

En las últimas etapas de la extravasación de los leucocitos desde el sistema vascular, las células inmunes necesitan penetrar la membrana basal endotelial y la cubierta de pericitos. La migración de los leucocitos a través de la membrana basal depende de la activación de las familias de integrina  $\beta$ 1,  $\beta$ 2 y  $\beta$ 3 y proteasas de leucocitos de la superficie celular, que facilitan la interacción de los receptores de leucocitos con ligandos extracelulares o generan gradientes quimiotácticos en el interior de la matriz extracelular.

Por lo tanto, la migración de los leucocitos a través del endotelio está asegurada por la cooperación firme entre las células inmunes y endoteliales, y está acompañada de su remodelado funcional, que se manifiesta por cambios en la permeabilidad del endotelio y por la activación de rutas de adhesión y motilidad celulares en las células endoteliales e inmunes. Además, los cambios adaptativos en las condiciones de tensión de cizalla y formación de matriz extracelular parecen crear un microentorno óptimo para la interacción productiva entre las células endoteliales e inmunes y la migración exitosa de los leucocitos a tejidos inflamados. Consecuentemente, el paso de los leucocitos a través del endotelio podría estar modulado por numerosos estímulos externos, proporcionados por otros tipos celulares, por ejemplo, por células musculares, pericitos, mastocitos o plaquetas activadas.

Los inventores han identificado y ensayado la combinación de fármacos que tienen como diana el proceso de extravasación, y lo modifican para mejorar la afección de pacientes que padecen neuroinflamación y enfermedades neuroinflamatorias (tales como trastornos neurodegenerativos, autoinmunes, infecciosos, tóxicos o traumáticos con componentes inflamatorios). Los diferentes elementos funcionales de este proceso de extravasación se han analizado, como se ha discutido anteriormente, y se han tomado como diana numerosas moléculas como moduladores positivos o negativos importantes de la transmigración de leucocitos.

Más específicamente, los inventores han seleccionado un número de compuestos, que, en combinación, alteran una o más de las funciones biológicas afectadas en las afecciones neuroinflamatorias. Más específicamente, estos compuestos son capaces de modular rutas funcionales principales implicadas, como se ha descrito anteriormente, en la extravasación de leucocitos, concretamente: remodelado de la permeabilidad del endotelio, adhesión y motilidad celulares, formación de la matriz extracelular, condiciones de tensión de cizalla y agregación plaquetaria, como candidatos prometedores para la intervención terapéutica combinatoria en el contexto de enfermedades neuroinflamatorias humanas. Por ejemplo, los compuestos que modifican la cascada de extravasación de leucocitos incluyen:

- moduladores del **remodelado de la permeabilidad del endotelio**, seleccionados preferiblemente de bosentán (número CAS 147536-97-8), fondaparinux (número CAS 114870-03-0), pentazocina (número CAS 359-83-1), nifuroxazida (número CAS 965-52-6), tiludronato (número CAS 89987-06-4), gliclazida (número CAS 21187-98-4), irbesartán (número CAS 138402-11-6), loperamida (número CAS 53179-11-6),

5 - moduladores de la **adhesión y motilidad celulares** seleccionados preferiblemente de terbinafina (número CAS 91161-71-6), carbonato de litio (número CAS 554-13-2), ácido valproico (número CAS 99-66-1), diosmina (número CAS 520-27-4), captopril (número CAS 62571-86-2), metformina (número CAS 657-24-9), quetoprofeno (número CAS 22071-15-4), cromoglicato (número CAS 16110-51-3), bacitracina (número CAS 1405-87-4), eflornitina (número CAS 67037-37-0), benzobromarona (número CAS 3562-84-3), SR48692 (Nombre UPAC: ácido 2-[[1-(7-cloroquinolin-4-il)-5-(2,6-dimetoxifenil)pirazol-3-carbonil]amino]adamantano-2-carboxílico), glibenclamida (número CAS 10238-21-8), ácido tranexámico (número CAS 1197-18-8),

10 - moduladores de la **formación de matriz extracelular** seleccionados preferiblemente de argatrobán (número CAS 74863-84-6), lisinopril (número CAS 83915-83-7), quinapril (número CAS 85441-61-8), ramipril (número CAS 87333-19-5), idraparinux (número CAS 162610-17-5), otamixabán (número CAS 193153-04-7), enoxaparina (número CAS 9005-49-6), disulfiram (número CAS 97-77-8), espironolactona (número CAS 52-01-7),

15 - moduladores de **tensión de cizalla en el endotelio** seleccionados preferiblemente de amlodipina (número CAS 88150-42-9), clonidina (número CAS 4205-90-7), liotironina (número CAS 6893-02-3), diltiazem (número CAS 42399-41-7), gentamicina (número CAS 1403-66-3), neomicina (número CAS 1404-04-2), mecamilamina (número CAS 60-40-2), estreptomycin (número CAS 57-92-1), y

20 - moduladores de la **agregación plaquetaria**, preferiblemente inhibidores de la agregación plaquetaria, seleccionados preferiblemente de cilostazol (número CAS 73963-72-1), tirofiban (número CAS 144494-65-5), clopidogrel (número CAS 113665-84-2), ticlopidina (número CAS 55142-85-3).

La presente invención proporciona nuevas estrategias terapéuticas para tratar neuroinflamación, en particular en un sujeto que tiene una enfermedad neurodegenerativa, autoinmune, infecciosa o tóxica. La invención describe el nuevo uso de combinaciones de compuestos que permite una corrección efectiva de dichas enfermedades y que pueden usarse en cualquier sujeto mamífero.

Estas combinaciones de compuestos son particularmente ventajosas porque afectan diferentes rutas y son así más efectivas. Estos compuestos incluyen modificadores potentes de módulos funcionales asociados con procesos de la cascada de extravasación, que pueden, de manera complementaria, aditiva o sinérgica, reducir o minimizar la neuroinflamación en el sistema nervioso central.

Teniendo en cuenta la complejidad funcional de la cascada de extravasación diana de la presente invención, los inventores consideran el tratamiento combinatorio como la estrategia más apropiada para la modulación terapéutica efectiva y el tratamiento de afecciones de neuroinflamación.

Además, los inventores han identificado combinaciones de fármacos, que tienen como diana módulos funcionales implicados en fases consecutivas de la cascada de extravasación y, por lo tanto, caracterizadas por una eficacia terapéutica incrementada en comparación con las eficacias terapéuticas de los fármacos individuales. Los inventores demuestran que esta estrategia puede usarse para el desarrollo de terapias combinatorias que contienen preferiblemente dosis ultra bajas de compuestos activos y, de esta manera, permite potencialmente disminuir los efectos secundarios indeseables de los fármacos individuales.

La invención también describe composiciones que comprenden una combinación de 2 compuestos, 3 compuestos ó 4 compuestos seleccionados del grupo que consiste en un modulador de la permeabilidad del endotelio, un modulador de la formación de matriz extracelular, un modulador de la adhesión y motilidad celulares, un inhibidor de la agregación plaquetaria y un modulador de la tensión de cizalla en el endotelio, o sales o profármacos o derivados o formulaciones de liberación sostenida de éstos. También pueden considerarse combinaciones más complejas. Estos compuestos pueden formularse conjuntamente o separadamente, y administrarse conjuntamente, separadamente o secuencialmente.

Además, la invención describe composiciones que comprenden al menos una de las combinaciones de compuestos siguientes, para administración combinada, separada o secuencial:

50 - al menos un modulador de la permeabilidad del endotelio (seleccionado preferiblemente de bosentán, fondaparinux, pentazocina, nifuroxazida, tiludronato, gliclazida, irbesartán, loperamida) y al menos un inhibidor de la agregación plaquetaria (seleccionado preferiblemente de cilostazol, tirofiban, clopidogrel, ticlopidina);

- al menos un modulador de la formación de matriz extracelular (seleccionado preferiblemente de argatrobán, lisinopril, quinapril, ramipril, idraparinux, otamixabán, enoxaparina, disulfiram, espironolactona) y al menos un inhibidor de la agregación plaquetaria (seleccionado preferiblemente de cilostazol, tirofiban, clopidogrel, ticlopidina);

- al menos un modulador de la adhesión y motilidad celulares (seleccionado preferiblemente de terbinafina, carbonato de litio, ácido valproico, diosmina, captopril, metformina, cromoglicato, bacitracina, eflornitina, benzobromarona, SR48692, glibenclamida, ácido tranexámico) y al menos un inhibidor de la agregación plaquetaria (seleccionado preferiblemente de cilostazol, tirofibrán, clopidogrel, ticlopidina);
  - 5 - al menos un modulador de la tensión de cizalla en el endotelio (seleccionado preferiblemente de amlodipina, clonidina, liotironina, diltiazem, gentamicina, mecamilamina, neomicina, estreptomina) y al menos un inhibidor de la agregación plaquetaria (seleccionado preferiblemente de cilostazol, tirofibrán, clopidogrel, ticlopidina);
  - al menos un modulador de la formación de matriz extracelular (seleccionado preferiblemente de argatrobán, lisinopril, quinapril, ramipril, idraparinux, otamixabán, enoxaparina, disulfiram, espirolactona) y al menos un  
10 modulador de la permeabilidad del endotelio (seleccionado preferiblemente de bosentán, fondaparinux, pentazocina, nifuroxazida, tiludronato, gliclazida, irbesartán, loperamida);
  - al menos un modulador de la formación de matriz extracelular (seleccionado preferiblemente de argatrobán, lisinopril, quinapril, ramipril, idraparinux, otamixabán, enoxaparina, disulfiram, espirolactona) y al menos un  
15 modulador de la adhesión y motilidad celulares (seleccionado preferiblemente de terbinafina, carbonato de litio, ácido valproico, diosmina, captopril, metformina, cromoglicato, bacitracina, eflornitina, benzobromarona, SR48692, glibenclamida, ácido tranexámico);
  - al menos un modulador de la adhesión y motilidad celulares (seleccionado preferiblemente de terbinafina, carbonato de litio, ácido valproico, diosmina, captopril, metformina, cromoglicato, bacitracina, eflornitina, benzobromarona, SR48692, glibenclamida, ácido tranexámico) y al menos un modulador de la permeabilidad del  
20 endotelio (seleccionado preferiblemente de bosentán, fondaparinux, pentazocina, nifuroxazida, tiludronato, gliclazida, irbesartán, loperamida);
  - al menos un modulador de la adhesión y motilidad celulares (seleccionado preferiblemente de terbinafina, carbonato de litio, ácido valproico, diosmina, captopril, metformina, cromoglicato, bacitracina, eflornitina, benzobromarona, SR48692, glibenclamida, ácido tranexámico) y al menos un modulador de la tensión de cizalla en  
25 el endotelio (seleccionado preferiblemente de amlodipina, clonidina, liotironina, diltiazem, gentamicina, mecamilamina, neomicina, estreptomina);
  - al menos un modulador de la permeabilidad del endotelio (seleccionado preferiblemente de bosentán, fondaparinux, pentazocina, nifuroxazida, tiludronato, gliclazida, irbesartán, loperamida) y al menos un modulador de  
30 la tensión de cizalla en el endotelio (seleccionado preferiblemente de amlodipina, clonidina, liotironina, diltiazem, gentamicina, mecamilamina, neomicina, estreptomina).
- La invención describe además una composición que comprende al menos un modulador de la formación de matriz extracelular, preferiblemente idraparinux u otamixabán, y al menos un inhibidor de la agregación plaquetaria, preferiblemente cilostazol, clopidogrel, ticlopidina o tirofibrán. La invención también describe composiciones que  
35 comprenden al menos un modulador de la adhesión y motilidad celulares, preferiblemente terbinafina, bacitracina, ácido tranexámico, diosmina o SR48692 y al menos un inhibidor de la agregación plaquetaria, preferiblemente cilostazol, clopidogrel, ticlopidina o tirofibrán. La invención describe además una composición que comprende al menos un modulador de la formación de matriz extracelular, preferiblemente idraparinux, otamixabán, o argatrobán, y al menos un modulador de la adhesión y motilidad celulares, preferiblemente ácido tranexámico o el antagonista del receptor de la neurotensina SP48692. La invención también describe una composición que comprende al menos  
40 un modulador de la permeabilidad del endotelio, preferiblemente irbesartán, y al menos un inhibidor de la agregación plaquetaria, preferiblemente cilostazol, clopidogrel, ticlopidina o tirofibrán. También se describe una composición que comprende al menos un modulador de la tensión de cizalla en el endotelio, preferiblemente mecamilamina, y al menos un inhibidor de la agregación plaquetaria, preferiblemente clopidogrel, cilostazol, ticlopidina o tirofibrán. La presente invención también describe composiciones para tratar neuroinflamación, que comprenden al menos:
- 45 - un modulador de la permeabilidad del endotelio, preferiblemente irbesartán,
  - un modulador de la formación de matriz extracelular, preferiblemente idraparinux u otamixabán,
  - un modulador de la adhesión y motilidad celulares, preferiblemente SR48692,
  - un modulador de la tensión de cizalla en el endotelio, preferiblemente mecamilamina, y
  - un inhibidor de la agregación plaquetaria, preferiblemente clopidogrel o cilostazol.
- 50 La presente invención también describe composiciones que comprenden un modulador de la permeabilidad del endotelio (seleccionado preferiblemente de bosentán, fondaparinux, pentazocina, nifuroxazida, tiludronato, gliclazida, irbesartán, loperamida); un modulador de la formación de matriz extracelular (seleccionado preferiblemente de argatrobán, lisinopril, quinapril, ramipril, idraparinux, otamixabán, enoxaparina, disulfiram, espirolactona), un modulador de la adhesión y motilidad celulares (seleccionado preferiblemente de terbinafina, carbonato de litio, ácido valproico, diosmina, captopril, metformina, cromoglicato, bacitracina, eflornitina, benzobromarona, SR48692,  
55

glibenclamida, ácido tranexámico), un modulador de la tensión de cizalla en el endotelio (seleccionado preferiblemente de amlodipina, clonidina, liotironina, diltiazem, gentamicina, mecamilamina, neomicina, estreptomycin), y un inhibidor de la agregación plaquetaria (seleccionado preferiblemente de cilostazol, tirofibán, clopidogrel, ticlopidina).

- 5 En particular, las terapias de combinación para neuroinflamación comprenden una combinación de al menos dos compuestos seleccionados de irbesartán, idraparinux, otamixabán, SR48692, cilostazol, mecamilamina y clopidogrel, o sales o profármacos de éstos.

Por ejemplo, las composiciones para tratar neuroinflamación, comprenden al menos una de las combinaciones de compuestos siguientes:

- 10 - idraparinux e irbesartán,  
 - idraparinux y mecamilamina,  
 - irbesartán y SR4896,  
 - irbesartán y mecamilamina,  
 - mecamilamina y clopidogrel,
- 15 - otamixabán y SR4896,  
 - otamixabán y clopidogrel,  
 - SR4896 y mecamilamina,  
 - SR4896 y clopidogrel,  
 - cilostazol e idraparinux,
- 20 - cilostazol e irbesartán,  
 - cilostazol y mecamilamina,  
 - cilostazol y SR4896,  
 - idraparinux y otamixabán,  
 - idraparinux y SR4896,
- 25 - idraparinux y clopidogrel,  
 - irbesartán y otamixabán,  
 - otamixabán y mecamilamina,  
 - cilostazol y otamixabán,  
 - mecamilamina y clopidogrel y tamixabán,
- 30 - mecamilamina y cilostazol e idraparinux,  
 - mecamilamina y clopidogrel e irbesartán,  
 - mecamilamina y clopidogrel e idraparinux,  
 - mecamilamina y clopidogrel y SR48692,  
 - mecamilamina y cilostazol e irbesartán,
- 35 - mecamilamina y cilostazol y otamixabán, o  
 - mecamilamina y cilostazol y SR48692.

Todas las terapias de combinación según la invención también pueden usarse para tratar enfermedades neuroinflamatorias tales como enfermedades neurodegenerativas, autoinmunes, infecciosas, tóxicas o traumáticas con un componente neuroinflamatorio, por ejemplo esclerosis múltiple (MS).

- 40 En una realización particular, todas las composiciones según la invención también pueden usarse para tratar neuroinflamación en sujetos que tienen trastornos neurodegenerativos.

La invención describe además un método para tratar neuroinflamación, que comprende administrar a un sujeto que lo necesita una cantidad efectiva de cualquier combinación de compuestos de composiciones como se ha descrito anteriormente. Dicho método comprende la administración de una combinación de al menos dos compuestos descritos anteriormente o sales o profármacos o derivados o formulaciones de liberación sostenida de éstos.

5 Cualquiera de los varios usos o métodos de tratamiento descritos en la presente memoria también puede incluir una etapa opcional de diagnosticar que un paciente tiene neuroinflamación, o identificar un individuo en riesgo de desarrollar neuroinflamación.

Esta invención también describe un método para tratar neuroinflamación en un sujeto, que comprende administrar simultáneamente, separadamente o secuencialmente a dicho sujeto, que necesita dicho tratamiento, una cantidad efectiva de cualquier combinación de al menos dos compuestos de composiciones mencionados anteriormente, o sales o profármacos de éstos.

A este respecto, esta invención describe un método para tratar neuroinflamación, comprendiendo el método (1) evaluar si un sujeto tiene una enfermedad neuroinflamatoria y (2) tratar al sujeto que tiene esta enfermedad con una cantidad efectiva de una composición según la invención. La determinación de si un sujeto tiene neuroinflamación puede hacerse por varios ensayos conocidos *per se* en la técnica.

La invención también describe un método para evaluar la eficacia del tratamiento de la neuroinflamación en un sujeto, en el que células derivadas del sujeto se exponen *in vitro* a una composición de la invención.

La invención puede usarse para tratar neuroinflamación o enfermedades neuroinflamatorias en cualquier sujeto mamífero, particularmente sujetos humanos.

20 Como se ilustra en la Tabla 1, las terapias de combinación de la invención inducen una respuesta positiva en el tratamiento de la neuroinflamación.

Los compuestos de composiciones según la presente invención pueden administrarse simultáneamente, separadamente o secuencialmente a un mismo sujeto. En otras realizaciones, dichos compuestos se formulan en formas de dosificación sólidas o líquidas, para administración única o repetida a un paciente. Preferiblemente, las composiciones de la invención comprenden además uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables.

La terapia según la invención puede llevarse a cabo como combinación de fármacos y/o conjuntamente con cualquier otra terapia. Puede proporcionarse en casa, en el despacho del médico, una clínica, un departamento ambulatorio hospitalario, o un hospital, de manera que el médico pueda observar los efectos de la terapia de cerca y hacer cualesquiera ajustes necesarios.

30 La duración de la terapia depende del estadio de la enfermedad que se está tratando, la edad y condición del paciente, y cómo responde el paciente al tratamiento.

La dosificación, frecuencia y modo de administración de cada componente de la combinación pueden controlarse independientemente. Por ejemplo, un fármaco puede administrarse oralmente mientras el segundo fármaco puede administrarse intramuscularmente. La terapia de combinación puede proporcionarse en ciclos de administración y no administración que incluyen periodos de descanso de manera que el cuerpo del paciente tiene la oportunidad de recuperarse de cualesquiera efectos secundarios todavía imprevistos. Los fármacos también pueden formularse conjuntamente de manera que una administración administra ambos fármacos.

#### **Formulación de composiciones farmacéuticas**

40 La administración de cada fármaco de la combinación puede ser por cualquier medio adecuado que resulte en una concentración del fármaco que, combinada con el otro componente, sea capaz de disminuir la neuroinflamación.

Aunque es posible administrar los ingredientes activos de la combinación como el compuesto químico puro, es preferible presentarlos como composición farmacéutica, también referida en este contexto como formulación farmacéutica. Las composiciones posibles de la invención incluyen aquellas adecuadas para administración oral, rectal, intratecal, percutánea, mucosal, tópica (incluyendo transdérmica, bucal y sublingual), o parenteral (incluyendo subcutánea, intramuscular, intravenosa e intradérmica). Las composiciones de la invención también pueden administrarse por inhalación.

Más comúnmente, estas formulaciones farmacéuticas se prescriben al paciente en "envases del paciente" que contienen un número de unidades de dosificación u otros medios para la administración de dosis unitarias medidas para uso durante un periodo de tratamiento claro en un único contenedor, habitualmente en un envase blister. Los envases del paciente tienen una ventaja sobre las prescripciones tradicionales, en las que el farmacéutico divide el suministro de un paciente de una forma farmacéutica a partir de un suministro a granel, de que el paciente siempre tiene acceso al prospecto contenido en el envase del paciente, que normalmente está ausente en las prescripciones tradicionales. Se ha mostrado que la inclusión de un prospecto mejora el cumplimiento del paciente con las instrucciones del médico. Así, la invención incluye además una formulación farmacéutica, como se ha descrito anteriormente en la presente memoria, en combinación con un material de envasado adecuado para dichas

5 formulaciones. En dicho envase del paciente el uso pretendido de una formulación para el tratamiento de combinación puede inferirse por instrucciones, facilidades, provisiones, adaptaciones y/o otros medios para ayudar en el uso de la formulación lo más adecuadamente para el tratamiento. Dichas medidas hacen que el envase del paciente sea especialmente adecuado para y esté adaptado para uso para el tratamiento con la combinación de la presente invención.

10 El fármaco puede estar contenido en cualquier cantidad apropiada en cualquier sustancia vehicular adecuada, y puede estar presente en una cantidad de 1-99% en peso del peso total de la composición. La composición puede proporcionarse en una forma de dosificación que es adecuada para la ruta de administración oral, parenteral (por ejemplo, intravenosamente, intramuscularmente), rectal, cutánea, nasal, vaginal, inhalante, piel (parche), u ocular. Así, la composición puede estar en la forma, por ejemplo, de comprimidos, cápsulas, pastillas, polvos, granulados, suspensiones, emulsiones, disoluciones, geles incluyendo hidrogeles, pastas, pomadas, cremas, apósitos, pociones, dispositivos de administración osmótica, supositorios, enemas, inyectables, implantes, pulverizadores, o aerosoles.

15 Las composiciones farmacéuticas pueden formularse según la práctica farmacéutica convencional (véase, por ejemplo, Remington: The Science and Practice of Pharmacy (20<sup>a</sup> ed.), ed. A. R. Gennaro, Lippincott Williams y Wilkins, 2000 y Encyclopedia of Pharmaceutical Technology, eds. J. Swarbrick y J. C. Boylan, 1988-1999, Marcel Dekker, Nueva York).

20 Las composiciones farmacéuticas según la invención pueden formularse para liberar el fármaco activo sustancialmente inmediatamente después de la administración o en cualquier momento o periodo de tiempo predeterminado después de la administración.

25 Las formulaciones de liberación controlada incluyen (i) formulaciones que crean una concentración sustancialmente constante del fármaco en el cuerpo durante un periodo de tiempo prolongado; (ii) formulaciones que después de un tiempo de retraso predeterminado crean una concentración sustancialmente constante del fármaco en el cuerpo durante un periodo de tiempo prolongado; (iii) formulaciones que sostienen la acción del fármaco durante un periodo de tiempo predeterminado manteniendo un nivel de fármaco relativamente constante, efectivo, en el cuerpo con la minimización concomitante de los efectos secundarios indeseables asociados con las fluctuaciones en el nivel plasmático de la sustancia fármaco activa; (iv) formulaciones que localizan la acción del fármaco, por ejemplo, por la posición espacial de un régimen de liberación controlada adyacente a o en el tejido u órgano enfermo; y (v) formulaciones que dirigen la acción del fármaco usando vehículos o derivados químicos para administrar el fármaco a un tipo celular diana particular.

30 La administración de fármacos en la forma de una formulación de liberación controlada se prefiere especialmente en casos en los que el fármaco, bien solo o en combinación, tiene (i) un índice terapéutico estrecho (es decir, la diferencia entre la concentración plasmática que da lugar a efectos secundarios perjudiciales o reacciones tóxicas y la concentración plasmática que da lugar a un efecto terapéutico es pequeña; en general, el índice terapéutico, TI, se define como la proporción de la dosis letal media (DL50) respecto a la dosis efectiva media (DE50)); (ii) una ventana de absorción estrecha en el tracto gastrointestinal; o (iii) una vida media biológica muy corta de manera que se requiere una dosificación frecuente durante un día con el fin de sostener el nivel plasmático a un nivel terapéutico.

35 Se puede seguir cualquiera de varias estrategias con el fin de obtener la liberación controlada en la que la velocidad de liberación supera a la velocidad de metabolismo del fármaco en cuestión. La liberación controlada puede obtenerse por la selección apropiada de varios parámetros de formulación e ingredientes, incluyendo, por ejemplo, varios tipos de composiciones y recubrimientos de liberación controlada. Así, el fármaco se formula con excipientes apropiados en un régimen farmacéutico que, después de la administración, libera el fármaco de una manera controlada (composiciones de comprimidos o cápsula de unidad única o múltiple, disoluciones de aceite, suspensiones, emulsiones, microcápsulas, microesferas, nanopartículas, parches, y liposomas).

#### 45 **Formas de dosificación sólida para uso oral**

50 Las formulaciones para uso oral incluyen comprimidos que contienen el o los ingredientes activos en una mezcla con excipientes no tóxicos farmacéuticamente aceptables. Estos excipientes pueden ser, por ejemplo, diluyentes o materiales de relleno inertes (por ejemplo, sacarosa, celulosa microcristalina, almidones incluyendo almidón de patata, carbonato de calcio, cloruro de sodio, fosfato de calcio, sulfato de calcio, o fosfato de sodio); agentes de granulación y disgregantes (por ejemplo, derivados de celulosa incluyendo celulosa microcristalina, almidones incluyendo almidón de patata, croscarmelosa de sodio, alginatos, o ácido alginico); agentes aglutinantes (por ejemplo, goma arábiga, ácido alginico, alginato de sodio, gelatina, almidón, almidón pregelatinizado, celulosa microcristalina, carboximetilcelulosa de sodio, metilcelulosa, hidroxipropil metilcelulosa, etilcelulosa, polivinilpirrolidona, o polietilen glicol); y agentes lubricantes, deslizantes, y antiadhesivos (por ejemplo, ácido estearico, sílices, o talco). Otros excipientes farmacéuticamente aceptables pueden ser colorantes, agentes saporíferos, plastificantes, humectantes, agentes tamponadores, y semejantes.

Los comprimidos pueden no estar recubiertos o pueden recubrirse por técnicas conocidas, opcionalmente para ralentizar la disgregación y absorción en el tracto gastrointestinal y proporcionar de esta manera una acción

sostenida durante un periodo mayor. El recubrimiento puede adaptarse para liberar la sustancia fármaco activo en patrón predeterminado (por ejemplo, con el fin de conseguir una formulación de liberación controlada) o puede adaptarse para no liberar la sustancia farmacéutica activa hasta después de pasar el estómago (recubrimiento entérico). El recubrimiento puede ser un recubrimiento de azúcar, un recubrimiento de película (por ejemplo, basado en hidroxipropil metilcelulosa, metilcelulosa, metil hidroxietilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, carboximetilcelulosa, copolímeros de acrilato, polietileno glicoles y/o polivinilpirrolidona), o un recubrimiento entérico (por ejemplo, basado en copolímero de ácido metacrílico, celulosa acetato ftalato, hidroxipropil metilcelulosa ftalato, hidroxipropil metilcelulosa acetato succinato, polivinil acetato ftalato, goma laca, y/o etilcelulosa). Puede emplearse un material para ralentizar el tiempo tal como, por ejemplo, gliceril monoestearato o gliceril diestearato.

Las composiciones en comprimidos sólidos pueden incluir un recubrimiento adaptado para proteger la composición frente a cambios químicos no deseados (por ejemplo, degradación química antes de la liberación de la sustancia farmacéutica activa). El recubrimiento puede aplicarse en la forma de dosificación sólida de una manera similar a la descrita en Encyclopaedia of Pharmaceutical Technology.

Los dos compuestos pueden mezclarse conjuntamente en el comprimido, o pueden dividirse. Por ejemplo, el primer compuesto está contenido en el interior del comprimido, y el segundo compuesto está en el exterior, de manera que una parte sustancial del segundo compuesto se libera antes de la liberación del primer compuesto.

Las formulaciones para uso oral también pueden presentarse como comprimidos masticables, o como cápsulas de gelatina dura en las que el ingrediente activo se mezcla con un diluyente sólido inerte (por ejemplo, almidón de patata, celulosa microcristalina, carbonato de calcio, fosfato de calcio o caolín), o como cápsulas de gelatina blanda en las que el ingrediente activo se mezcla con agua o un medio graso, por ejemplo, parafina líquida, o aceite de oliva. Los polvos y granulados pueden prepararse usando los ingredientes mencionados anteriormente en comprimidos y cápsulas de una manera convencional.

Las composiciones de liberación controlada para uso oral pueden construirse, por ejemplo, para liberar el fármaco activo controlando la disolución y/o la difusión de la sustancia farmacéutica activa,

La liberación controlada por disolución o difusión puede conseguirse mediante el recubrimiento apropiado de una formulación de comprimido, cápsula, gránulo, o granulado de fármacos, o mediante la incorporación del fármaco en una matriz apropiada. Un recubrimiento de liberación controlada puede incluir una o más de las sustancias de recubrimiento mencionadas anteriormente y/o, por ejemplo, goma laca, cera de abeja, glycowax, cera de castor, cera de carnauba, estearil alcohol, gliceril monoestearato, gliceril diestearato, glicerol palmitoestearato, etilcelulosa, resinas acrílicas, ácido dl-poliláctico, celulosa acetato butirato, cloruro de polivinilo, acetato de polivinilo, vinil pirrolidona, polietileno, polimetacrilato, metilmetacrilato, 2-hidroximetacrilato, hidrogeles de metacrilato, 1,3 butileno glicol, etileno glicol metacrilato, y/o polietileno glicoles. En una formulación de matriz de liberación controlada, el material de la matriz también puede incluir, por ejemplo, metilcelulosa hidratada, cera de carnauba y estearil alcohol, carbopol 934, silicona, gliceril triestearato, metil acrilato-metil metacrilato, cloruro de polivinilo, polietileno, y/o fluorocarbono halogenado.

Una composición de liberación controlada que contiene uno o más de los compuestos de las combinaciones reivindicadas también puede estar en la forma de un comprimido o cápsula flotante (es decir, un comprimido o cápsula que, después de la administración oral, flota en la parte superior del contenido gástrico durante un periodo de tiempo determinado). Una formulación de comprimido flotante del o de los fármacos puede prepararse granulando una mezcla del o de los fármacos con excipientes y 20-75% p/p de hidrocoloides, tales como hidroxietilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, o hidroxipropilmetilcelulosa. Los gránulos obtenidos pueden comprimirse en comprimidos. Cuando se pone en contacto con el jugo gástrico, el comprimido forma una barrera de gel sustancialmente impermeable al agua alrededor de su superficie. Esta barrera de gel interviene en el mantenimiento de una densidad de menos de uno, permitiendo de esta manera que el comprimido permanezca flotante en el jugo gástrico.

#### **Líquidos para administración oral**

Los polvos, polvos dispersables, o gránulos adecuados para la preparación de una suspensión acuosa por adición de agua son formas de dosificación convenientes para administración oral. La formulación como una suspensión proporciona el ingrediente activo en una mezcla con un agente dispersante o humectante, agente de suspensión, y uno o más conservantes. Los agentes de suspensión adecuados son, por ejemplo, carboximetilcelulosa de sodio, metilcelulosa, alginato de sodio, y semejantes.

#### **Composiciones parenterales**

La composición farmacéutica también puede administrarse parenteralmente por inyección, infusión o implante (intravenoso, intramuscular, subcutáneo, o semejantes) en formas de dosificación, formulaciones, mediante dispositivos de administración adecuados o implantes que contienen vehículos y adyuvantes convencionales, no tóxicos, farmacéuticamente aceptables. La formulación y preparación de dichas composiciones son muy conocidas para los expertos en la técnica de la formulación farmacéutica.

5 Las composiciones para uso parenteral pueden proporcionarse en formas de dosificación unitarias (por ejemplo, en ampollas de dosis única), o en viales que contienen varias dosis y a los que puede añadirse un conservante adecuado (véase más adelante). La composición puede estar en la forma de una disolución, una suspensión, una emulsión, un dispositivo de infusión, o un dispositivo de administración para el implante o puede presentarse como un polvo seco para reconstituirse con agua u otro vehículo adecuado antes del uso. Aparte del o de los fármacos activos, la composición puede incluir uno o más vehículos y/o excipientes adecuados parenteralmente aceptables. El o los fármacos activos pueden incorporarse en microesferas, microcápsulas, nanopartículas, liposomas, o semejantes para la liberación controlada. La composición puede incluir agentes de suspensión, solubilización, estabilización, ajuste de pH, y/o agentes dispersantes.

10 Las composiciones farmacéuticas según la invención pueden estar en la forma adecuada para inyección estéril. Para preparar dicha composición, el o los fármacos activos adecuados se disuelven o suspenden en un vehículo líquido parenteralmente aceptable. Entre los vehículos y disolventes aceptables que pueden emplearse están agua, agua ajustada a un pH adecuado por la adición de una cantidad apropiada de ácido clorhídrico, hidróxido de sodio o un tampón adecuado, 1,3-butanodiol, disolución de Ringer, y disolución de cloruro de sodio isotónica. La formulación acuosa también puede contener uno o más conservantes (por ejemplo, p-hidroxibenzoato de metilo, etilo o n-propilo). En los casos en los que uno de los fármacos sólo es débilmente o ligeramente soluble en agua, puede añadirse un agente que potencie la disolución o solubilizante, o el disolvente puede incluir 10-60% p/p de propilenglicol o semejantes.

20 Las composiciones parenterales de liberación controlada pueden estar en la forma de suspensiones acuosas, microesferas, microcápsulas, microesferas magnéticas, disoluciones grasas, suspensiones grasas, o emulsiones. Alternativamente, el o los fármacos activos pueden incorporarse en vehículos, liposomas, nanopartículas, implantes o dispositivos de infusión biocompatibles. Los materiales para uso en la preparación de microesferas y/o microcápsulas son, por ejemplo, polímeros biodegradables/bioerosionables tales como poligalactina, poli-(isobutil cianoacrilato), poli(2-hidroxietil-L-glutamina). Los vehículos biocompatibles que pueden usarse cuando se formula una formulación parenteral de liberación controlada son carbohidratos (por ejemplo, dextranos), proteínas (por ejemplo, albúmina), lipoproteínas, o anticuerpos. Los materiales para uso en implantes pueden ser no biodegradables (por ejemplo, polidimetil siloxano) o biodegradables (por ejemplo, poli(caprolactona), poli(ácido glicólico) o poli(orto ésteres)

#### Composiciones rectales

30 Para la aplicación rectal, las formas de dosificación adecuadas para una composición incluyen supositorios (de tipo emulsión o suspensión), y cápsulas de gelatina rectales (disoluciones o suspensiones). En una formulación de supositorio típica, el o los fármacos activos se combinan con una base de supositorio apropiada farmacéuticamente aceptable tal como manteca de coco, ácidos grasos esterificados, gelatina glicerizada, y varias bases solubles o dispersables en agua como polietilenglicoles. Pueden incorporarse varios aditivos, potenciadores, o tensioactivos.

#### 35 Composiciones percutáneas y tópicas

40 Las composiciones farmacéuticas también pueden administrarse tópicamente en la piel para la absorción percutánea en formas de dosificación o formulaciones que contienen vehículos y excipientes convencionales no tóxicos farmacéuticamente aceptables incluyendo microesferas y liposomas. Las formulaciones incluyen cremas, pomadas, lociones, linimentos, geles, hidrogeles, disoluciones, suspensiones, barras, pulverizadores, pastas, apósitos, y otras clases de sistemas de administración de fármacos transdérmicos. Los vehículos o excipientes farmacéuticamente aceptables pueden incluir agentes emulsionantes, antioxidantes, agentes tamponadores, conservantes, humectantes, potenciadores de la penetración, agentes quelantes, agentes formadores de gel, bases de pomadas, perfumes, y agentes protectores de la piel.

#### *Los agentes emulsionantes pueden ser gomas naturales (por ejemplo, goma arábiga o goma de tragacanto)*

45 Los conservantes, humectantes, potenciadores de la penetración pueden ser parabenos, tales como p-hidroxibenzoato de metilo o propilo, y cloruro de benzalconio, glicerina, propilenglicol, urea, etc.

50 Las composiciones farmacéuticas descritas anteriormente para administración tópica en la piel también pueden usarse en conexión con administración tópica en o cerca de la parte del cuerpo que se va a tratar. Las composiciones pueden adaptarse para la aplicación directa o para la aplicación mediante dispositivos de administración de fármacos especiales tales como vendajes o alternativamente apósitos, almohadillas, esponjas, tiras, u otras formas de material flexible adecuado.

#### Dosificaciones y duración del tratamiento

55 Se apreciará que los fármacos de la combinación pueden administrarse concomitantemente, bien en la misma o en diferentes formulaciones farmacéuticas o secuencialmente. Si hay una administración secuencial, el retraso en la administración del segundo (o adicional) ingrediente activo no debe ser tal que se pierda el beneficio del efecto eficaz de la combinación de los ingredientes activos. Un requerimiento mínimo para una combinación según esta descripción es que la combinación debe pretenderse para uso combinado con el beneficio del efecto eficaz de la

combinación de los ingredientes activos. El uso pretendido de una combinación puede inferirse por facilidades, provisiones, adaptaciones y/o otros medios para ayudar en el uso de la combinación según la invención.

5 Las cantidades terapéuticamente eficaces de dos o más fármacos que son objeto de esta invención pueden usarse conjuntamente para la preparación de un medicamento útil para reducir la neuroinflamación una vez que ésta se manifiesta clínicamente o para prevenir esta afección para pacientes en riesgo.

Aunque los fármacos activos de la presente invención pueden administrarse en dosis divididas, por ejemplo dos o tres veces diariamente, se prefiere una única dosis diaria de cada fármaco en la combinación, siendo más preferida una única dosis diaria de todos los fármacos en una única composición farmacéutica (forma de dosificación unitaria).

10 La administración puede ser una a varias veces diariamente durante varios días a varios años, y puede ser incluso durante toda la vida del paciente. La administración a largo plazo crónica o al menos repetida periódicamente se indicará en la mayor parte de los casos.

15 El término "forma de dosificación unitaria" se refiere a unidades físicamente discretas (tales como cápsulas, comprimidos, o cilindros de jeringa cargados) adecuadas como dosificaciones unitarias para sujetos humanos, conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de material o materiales activos calculada para producir el efecto terapéutico deseado, en asociación con el vehículo farmacéutico requerido.

La cantidad de cada fármaco en la combinación preferida para una dosificación unitaria dependerá de varios factores incluyendo el método de administración, el peso corporal y la edad del paciente, la gravedad del proceso de neuroinflamación o el riesgo de efectos secundarios potenciales considerando el estado de salud general de la persona que se va a tratar.

20 Además, la información farmacogenómica (el efecto del genotipo en la farmacocinética, farmacodinámica o perfil de eficacia de un agente terapéutico) acerca de un paciente particular puede afectar la dosificación usada.

25 Excepto cuando se responde a neuroinflamación especialmente incapacitante cuando pueden requerirse dosificaciones más altas, o cuando se trata a niños cuando deben elegirse dosificaciones más bajas, la dosificación preferida de cada fármaco en la combinación se encontrará habitualmente en el intervalo de dosis que no está por encima de la prescrita habitualmente para el tratamiento de mantenimiento a largo plazo o que se demuestra que es segura en los estudios clínicos grandes de fase 3.

30 Preferiblemente, se usan dosis ultra bajas de los compuestos activos en las combinaciones de fármacos según la invención, permitiendo de esta manera disminuir los efectos secundarios indeseables de cada fármaco. Más específicamente, estas dosis ultra bajas son dosis sub-terapéuticas, es decir, dosis que son más bajas que las dosis terapéuticas prescritas habitualmente, preferiblemente 1/2 de las dosis terapéuticas, más preferiblemente 1/3, 1/4, 1/5, o incluso más preferiblemente 1/10 de las dosis terapéuticas. En ejemplos particulares, se usan dosis tan bajas como 1/20, 1/30, 1/50, 1/100, o incluso más bajas, de las dosis terapéuticas. A dichas dosificaciones sub-terapéuticas, los compuestos solos serán sustancialmente inactivos, mientras la o las combinaciones según la invención son completamente efectivas.

35 Los ejemplos de dosificaciones preferidas para fármacos en las combinaciones de fármacos según la invención son:

- Irbesartán oralmente menos de 15 mg por día,
- Cilostazol oralmente menos de 10 mg por día,
- Clopidogrel oralmente menos de 7,5 mg por día,
- Mecamylamina oralmente menos de 0,25 mg por día.

40 Debe entenderse que la cantidad del fármaco administrada realmente será determinada por un médico, a la vista de las circunstancias relevantes incluyendo la afección o afecciones que se van a tratar, el régimen exacto que se va a administrar, la edad, peso, y respuesta del paciente individual, la gravedad de los síntomas del paciente, y la ruta de administración elegida. Por lo tanto, se pretende que los intervalos de dosificación anteriores proporcionen una guía y apoyo general para las enseñanzas de la presente memoria, pero no se pretende que limiten el alcance de la invención.

45 Los ejemplos siguientes se proporcionan para propósitos de ilustración y no como limitación.

### Ejemplos

#### Ejemplo 1: Protocolo para la inducción de EAE en ratones C57BL/6

50 Se usa un modelo en el que ratones inmunizados con glicoproteína miélica de oligodendrocitos (inmunizados con MOG) desarrollan EAE progresiva crónica para demostrar el efecto beneficioso de las composiciones de la invención en el tratamiento de la neuroinflamación.

I- Animales y compuestos químicos

Los ratones SJL y C57BL/6J se obtienen de Janvier (Francia). Los ratones C57BL/6, hembras de 6 a 9 semanas de edad (Óptimo: 7 semanas de edad); Adyuvante completo de Freund (CFA): mezcla de 20 mL IFA (Adyuvante incompleto de Freund, DIFCO 263910) con 100 mg M.tuberculosis H37 Ra (muerto y desecado, DIFCO 231141); 3mM de preparación madre de péptido MOG35-55 (MEVGWYRSPFSRVVHLYRNGK) disuelto en PBS.

II- Procedimiento

La encefalomiелitis experimental se induce por el procedimiento siguiente:

Día 0:

Preparar la emulsión que contiene preparación madre de MOG35-55, PBS y CFA. El volumen de preparación madre de MOG35-55 = [(El volumen de la emulsión) × (1,5 g/L)] / [(3×10<sup>-3</sup> moles/L) × (2.581,6 g/mol)]; el volumen de PBS = [(El volumen de la emulsión) / 2] - (El volumen de la preparación madre de MOG35-55); El volumen de CFA = (El volumen de la emulsión) / 2. La emulsión se prepara diluyendo la preparación madre de MOG35-55 con PBS y mezclando volúmenes iguales de este diluyente y CFA. La concentración final de MOG35-55 es 300 µg por 200 µL de emulsión para cada ratón. Deben evitarse las burbujas de aire y la jeringa debe mantenerse a 4°C hasta la inyección. Antes del uso, la estabilidad de la emulsión se ensaya añadiendo una gota a un vaso de precipitados de agua; si la gota permanece como un grumo sólido y se disipa lentamente, la emulsión es estable y puede inyectarse.

Los ratones se anestesian con 2% Pentobarbital de sodio (inyección i.p, 70-90 µL/ratón) y se mantienen calientes bajo una lámpara de infrarrojos. La inyección de 200ng de toxina Pertussis en 200 µL de PBS/ratón se realiza (i.v.; vena de la cola) usando una jeringa de 1-mL con una aguja de 0,4-mm. La emulsión descrita previamente se administra subcutáneamente con una jeringa de 1-mL con una aguja de 0,4-mm.

Día 2:

Los ratones se mantienen calientes bajo la lámpara de infrarrojos para realizar la inyección de 200 ng de toxina Pertussis en 200 µL de PBS mediante la ruta i.v. (vena de la cola), como se describe para la inyección de MOG35-55.

Días 0~70:

Los ratones se observan diariamente para síntomas clínicos.

III- Puntuación clínica

0.0: Sin signos de enfermedad

0.5: Parálisis parcial de la cola: flaccidez y ausencia de enrollamiento en la mitad distal de la cola cuando el ratón se levanta.

1.0: Cuando el ratón se levanta, se puede observar una parálisis completa de la cola asociada con flaccidez y ausencia de enrollamiento en la punta.

1.5: Debilidad de una pata posterior que no permite al ratón sujetarse por un pie posterior (el otro pie posterior es normal). Cuando se sujeta por la articulación de la extremidad posterior, no se cuenta en la puntuación.

2.0: Debilidad de ambas patas posteriores; el ratón no puede sujetarse por ninguno de sus pies posteriores. El ratón anda de forma inestable y tiene dificultad para subir su cuarto trasero completamente con las patas posteriores.

2.5: Parálisis de las patas posteriores:

Parálisis parcial de ambas patas posteriores que resulta en la dificultad de mover las patas.

Parálisis completa en una pata posterior que resulta en la imposibilidad de moverla. Cuando anda, esta pata se queda detrás del ratón.

Para permitir que el ratón se alimente, el agua y el alimento se proporcionan en el suelo de la jaula.

3.0: Parálisis completa de las patas posteriores aunque las patas anteriores no están afectadas por la patología. El ratón todavía puede sujetarse gracias a sus patas anteriores. Para permitir que el ratón se alimente, el agua y el alimento se proporcionan en el suelo de la jaula.

3.5: Parálisis parcial de las patas anteriores incluyendo una parálisis completa de una pata anterior o parálisis parcial de ambas.

4.0: Parálisis completa de las patas anteriores. Estado moribundo.

5.0: Muerte del animal o sacrificio por ética experimental.

Los animales se mantienen en una instalación convencional sin patógenos y todos los experimentos se llevan a cabo según las directrices prescritas por, y aprobadas por, el comité de bioética local permanente.

#### Estadística

- 5 El software de estadística (Statsoft Inc.) se utiliza en todo momento para el análisis estadístico. Se emplean análisis ANOVA y ensayo de la t de Student para analizar la puntuación clínica de la enfermedad.  $P < 0,05$  se considera significativo.

#### **Tratamiento agudo con el fármaco**

- 10 La inhibición de EAE de Inicio Agudo y EAE Crónica se evalúa por análisis de tejidos (detección de la presencia de infiltrado de linfocitos perivascular) así como por puntuación clínica y peso de la masa corporal.

El estudio de inicio agudo se realiza durante 28 días después de la inducción de EAE.

Las hembras se dividen en grupos de 12 ratones antes de la inducción de EAE. El tratamiento se administra durante 3 semanas antes de la inducción de EAE y adicionalmente a lo largo del experimento completo.

- 15 El clopidogrel y la mecamilamina se administran solos o en combinaciones oralmente (clopidogrel) y subcutáneamente (mecamilamina). La mecamilamina, a una de las dosis (0,04 mg/kg; 0,2 mg/kg; 1 mg/kg/día), y un control de placebo se administra mediante una minibomba osmótica subcutánea durante 6 semanas. Después de 6 semanas, los animales se anestesian, y se hace una pequeña incisión en la piel después de la preparación para cirugía aséptica. La bomba se reemplaza por una nueva bomba y el fármaco o placebo se administra durante un periodo de tiempo siguiente.

- 20 El clopidogrel (dosificado de 0,02 mg/kg/día a 1 mg/kg/día) se administra como comprimidos de clopidogrel disueltos en agua de bebida, Plavix, Bristol-Myers Squibb/Sanofi). La dosis superior se sabe que es efectiva y segura tomado como base los resultados de experimentos que ensayan la toxicidad del fármaco en ratas (Reist M. et al. 2000).

Todos los animales se examinan diariamente para ensayos de comportamiento. Las observaciones se realizan por un experimentador que no conoce la identidad de los tratamientos.

- 25 Al final del experimento, los ratones se perfunden intracardiamente con disolución salina. Los tejidos de la médula espinal y el cerebro se retiran y postfijan en formalina y se incluyen en parafina. Se recogen secciones de 2-4 micrómetros y se tiñen con Hematoxilina y Eosina para examinarse con microscopio óptico para la presencia de inflamación por infiltrado de linfocitos perivascular. Las puntuaciones se atribuyen como sin inflamación, leve, moderada y grave como se ha descrito (Mohamed, 2004).

#### **30 La interpretación de los resultados**

- 35 1. El examen histológico en el día 28 revela que la mayoría de los animales en el grupo tratado con la combinación de clopidogrel y mecamilamina no tienen inflamación (sin signos de engrosamiento perivascular), mostrando el resto de los animales sólo un engrosamiento perivascular leve en la sección espinal, mientras los animales del grupo placebo y de los grupos tratados con clopidogrel y mecamilamina solos se caracterizan por diferentes grados de inflamación perivascular.

Esta diferencia entre el grupo tratado con la combinación de dos fármacos y los grupos placebo control alcanza una significancia estadística (valor p menor de 0,05).

- 40 2. En comparación con los ratones que reciben vehículo, los ratones que reciben la combinación de clopidogrel y mecamilamina presentan una puntuación clínica media significativamente menor (valor p menor de 0,05) en el día 28 del experimento que los ratones de todos los demás grupos experimentales de animales inducidos para EAE. Estos resultados demuestran que esta combinación disminuye la gravedad de EAE, comparada con el grupo placebo control.

#### **Tratamiento crónico con el fármaco.**

Se lleva a cabo un estudio de fase crónica durante 70 días después de la inducción de EAE.

- 45 Todos los animales tratados reciben el tratamiento durante tres semanas antes de la inducción de EAE. El clopidogrel y mecamilamina combinados se administran solos o en combinaciones oralmente (clopidogrel) y subcutáneamente (mecamilamina). La mecamilamina, a una de tres dosis (0,05 mg/kg; 0,2 mg/kg, 1 mg/kg/día), y un control de placebo se administra mediante una minibomba osmótica subcutánea durante 6 semanas. Después de 6 semanas, los animales se anestesian, y se hace una pequeña incisión en la piel después de la preparación para cirugía aséptica. La bomba se reemplaza por una nueva bomba y el fármaco o placebo se administra durante un periodo de tiempo siguiente.
- 50

El clopidogrel (20 mg/kg/día) se administra como comprimidos de clopidogrel disueltos en agua de bebida, Plavix, Bristol-Myers Squibb/Sanofi).

Para el estudio, los animales hembra se dividen en grupos de 12 ratones cada uno y se someten a inducción de EAE.

- 5 Todos los animales se examinan para déficits comportamentales diariamente; los exámenes se hacen por un experimentador que es ciego para los tratamientos que reciben. Todos los animales control tratados con placebo son sintomáticos en 11-24 días.

### La interpretación de los resultados

10 En comparación con los ratones que reciben vehículo, los ratones que reciben la combinación de clopidogrel y mecamilamina presentan una puntuación clínica media significativamente menor (valor p menor de 0,05) en el día 70 del experimento que los ratones de todos los demás grupos experimentales de animales inducidos para EAE. Estos resultados demuestran que esta combinación disminuye la gravedad de EAE, comparado con el grupo placebo control.

15 Las diferencias en ganancia de peso se correlacionan con la gravedad de la enfermedad, es decir, una gravedad de la enfermedad mayor (puntuación clínica media superior) provoca una pérdida de peso mayor. Estas diferencias son estadísticamente significativas ( $p < 0,005$ , Manova). La comparación Post Hoc posterior demuestra que todos los grupos tratados con clopidogrel o mecamilamina son diferentes del grupo control tratado con placebo (vehículo) mientras los pesos medios iniciales de todos los grupos son iguales. En el día 14, tres días después del inicio de la enfermedad, un ratón enfermo pierde una media de 2 g de peso. El peso medio promediado de ratones tratados con la combinación de clopidogrel y mecamilamina se reduce sólo 0,4 g. En el día 28, el grupo control tiene el peso más bajo, 14,0 kg.

20 El grupo tratado con la combinación de clopidogrel y mecamilamina es comparable con el control positivo en el día 28 (estadísticamente no hay diferencia entre estos dos grupos) y significativamente diferente de los ratones enfermos tratados con el placebo en el día 70.

### 25 Ejemplo 2

En un entorno experimental particular adaptado para la comparación correcta de los efectos terapéuticos de clopidogrel, mecamilamina y su combinación en el modelo de EAE en ratón, sólo se usa el régimen de tratamiento agudo con el fármaco (el tratamiento empieza el Día 14 después de la inmunización y dura hasta el Día 28). En este experimento, ambos fármacos se diluyen igualmente a dosis ultra bajas correspondientes a 1/60 de sus dosis terapéuticas habituales, y de forma importante, ambos se administran oralmente. Los protocolos para la inducción de EAE y los cálculos de la puntuación clínica en este experimento se modifican ligeramente y son como se describe con detalle a continuación:

#### I. Animales y compuestos químicos

35 Los ratones hembra C57L/6J (8 semanas de edad) se obtienen de Janvier (Francia); después de dos semanas de habituación, los ratones hembra (10 semanas de edad) desarrollan parálisis crónica después de inmunización con péptido MOG (Glicoproteína Mielínica de Oligodendrocitos). La encefalomiелitis experimental se induce mediante el Kit Hooke MOG<sub>35-55</sub>/CFA Emulsión PTX (toxina Pertussis) para la inducción de EAE (EK-0110, EK-0115; Hooke laboratories). El kit control es CK-0115 (Hooke laboratories).

#### II. Procedimiento experimental

40 La encefalomiелitis experimental se induce por el procedimiento siguiente:

El día 0, se realizan dos inyecciones subcutáneas de 0,1 ml cada una, una en la parte superior del lomo del ratón y una en la parte inferior del lomo. Cada inyección contiene 100 µg de péptido MOG<sub>35-55</sub> (MEVGWYRSPFSRVVHLYRNGK), 200 µg de *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra inactivado y se emulsiona en adyuvante completo de Freund (CFA) (Hooke laboratories). La emulsión proporciona el antígeno necesario para expandir y diferenciar las células T autoinmunes específicas de MOG.

45 Se realizan dos inyecciones intraperitoneales de 500 ng de toxina Pertussis en PBS (kit Hooke) 2 horas (Día 0) y 24 horas (Día 1) después de la inyección de MOG. La toxina Pertussis potencia el desarrollo de EAE proporcionando adyuvante adicional.

50 Los ratones desarrollan EAE 8-14 días después de la inmunización y permanecen crónicamente paralizados durante la duración del experimento. Después de la inmunización, los ratones se observan diariamente para síntomas clínicos en un procedimiento ciego. Los animales se mantienen en una instalación convencional sin patógenos y todos los experimentos se llevan a cabo según las directrices prescritas por, y aprobadas por, el comité de bioética local permanente.

Estadística

El software de estadística (Statsoft Inc.) se utiliza en todo momento para el análisis estadístico. Se emplean análisis ANOVA y ensayo de la t de Student para analizar la puntuación clínica de la enfermedad.  $P < 0,05$  se considera significativo.

5 III. Puntuaciones clínicas:

La puntuación clínica total está compuesta por la puntuación de la cola, la puntuación de las extremidades posteriores, la puntuación de las extremidades anteriores y la puntuación de la vejiga descritas como sigue:

Puntuación de la cola:

Puntuación= 0	Un ratón normal mantiene su cola erecta cuando se mueve.
Puntuación= 1	Si el extremo de la cola está flácido con una tendencia a caer.
Puntuación= 2	Si la cola está completamente flácida y se arrastra en la mesa

10 Puntuación de las extremidades anteriores:

Puntuación= 0	Un ratón normal tiene un paso enérgico y no arrastra sus patas
Puntuación= 1	Alguno de los ensayos siguientes es positivo:  A - Ensayo de volteo: mientras se coge la cola entre el dedo pulgar e índice, voltear al animal sobre su espalda y observar el tiempo que tarda en ponerse recto. Un ratón sano se volverá inmediatamente. Un retraso sugiere debilidad de las extremidades posteriores.  B- Poner el ratón en la parte superior de la jaula de alambre y observar cuando cruza de un lado al otro. Si una o ambas extremidades se resbala frecuentemente entre las barras consideramos que hay una parálisis parcial.
Puntuación= 2	Ambos ensayos previos son positivos.
Puntuación= 3	Una o ambas extremidades posteriores muestra signos de parálisis pero se conservan algunos movimientos; por ejemplo: el animal puede agarrarse y sujetarse en el envés de la parte superior de la jaula de alambre durante un momento corto antes de dejarse llevar.
Puntuación= 4	Cuando ambas patas posteriores están paralizadas y el ratón las arrastra cuando se mueve.

Puntuación de las extremidades anteriores:

Puntuación= 0	Un ratón normal usa sus patas frontales activamente para agarrarse y andar y mantiene su cabeza erecta.
Puntuación= 1	El paseo es posible pero difícil debido a una debilidad en una o ambas patas, por ejemplo, las patas frontales se consideran débiles cuando el ratón tiene dificultad para agarrarse al envés de la parte superior del alambre de la jaula. Otro signo de debilidad es que se le caiga la cabeza
Puntuación= 2	Cuando una extremidad anterior está paralizada (imposibilidad de agarrarse y el ratón gira alrededor de la extremidad paralizada). En este momento la cabeza también ha perdido gran parte de su tono muscular.
Puntuación= 3	El ratón no puede moverse, y el alimento y agua son inalcanzables.

Puntuación de la vejiga:

Puntuación= 0	Un ratón normal tiene un control completo de su vejiga.
Puntuación= 1	Un ratón se considera incontinente cuando la parte inferior de su cuerpo está empapada con orina.

La puntuación global para cada animal se determina por la adición de todas las categorías mencionadas anteriormente. La puntuación máxima para los animales vivos es 10.

Grupos experimentales y tratamiento con fármaco:

Tres grupos diferentes de 10 ratones hembra se homogeneizan por peso antes de la inmunización:

- 5 - Grupo control: inyección de vehículo en las mismas condiciones que los ratones EAE (del Día 14 al Día 28, se proporciona placebo diariamente)
- Grupo EAE: inyección de MOG (día 0) + inyecciones de toxina Pertussis (Día 0 y 1) - del Día 14 al Día 28, se proporciona placebo diariamente
- 10 - EAE + grupo de tratamiento: inyección de MOG (Día 0) + inyecciones de toxina Pertussis (Día 0 y 1). El tratamiento empieza el Día 14 después de la inmunización y dura hasta el Día 28.

Las puntuaciones clínicas se miden los Días 0-5-8-9-12-14-16-19-21-23-26-28.

Interpretación de los resultados

15 Como se esperaba, los primeros signos de parálisis aparecieron 14 días después de la inmunización (Día 0): en la figura 1, observamos un incremento en la puntuación clínica global (puntuaciones medias de cola, extremidad anterior, extremidad posterior y vejiga) del grupo EAE (línea de triángulos grises) comparado con los ratones control (línea de diamantes grises) desde este día hasta el final del experimento (Día 28). Desde el Día 16 al Día 28 después de la inmunización, se observa una tendencia del tratamiento combinatorio de clopidogrel y mecamilamina (líneas de círculos negros) de disminuir la puntuación clínica de los ratones EAE en comparación con los ratones EAE sin tratamiento. Sorprendentemente, no se obtuvieron efectos positivos de clopidogrel o mecamilamina, que se ensayan solos a las mismas concentraciones que en el tratamiento combinatorio, en este entorno experimental.

20 Estos experimentos demuestran que la combinación terapéutica de clopidogrel y mecamilamina, modificando dos procesos funcionales diferentes implicados en la cascada de extravasación - agregación plaquetaria y tensión de cizalla en el endotelio, es más efectiva para suprimir el fenotipo MS que los fármacos individuales, administrados separadamente. En este entorno experimental particular, se usan clopidogrel y mecamilamina a dosis correspondientes a 1/60 de las dosis prescritas rutinariamente para estas medicaciones.

25 El clopidogrel nunca se ha ensayado como un compuesto terapéutico potencial para tratar la esclerosis múltiple; en afecciones inflamatorias no relacionadas, por ejemplo, como lesión renal crónica o isquemia retiniana diabética, en las que este fármaco tuvo algún efecto beneficioso, se administró a dosis 30-60 veces mayores que en nuestros experimentos (De La Cruz et al., 2003; Tu et al., 2008).

30 También se obtienen resultados positivos con otras combinaciones de fármacos listadas en la Tabla 1.

**Tabla 1:** Otras combinaciones de fármacos que proporcionan resultados positivos

Combinaciones de fármacos	Resultados*
Idraparinux-Irbesartán	+
Idraparinux-Otamixabán	+
Idraparinux-SR4896	+
Idraparinux-Mecamilamina	+
Idraparinux-Clopidogrel	+
Irbesartán-Otamixabán	+
Irbesartán-SR4896	+
Irbesartán-Mecamilamina	+
Otamixabán-SR4896	+
Otamixabán-Mecamilamina	+
Otamixabán-Clopidogrel	+
SR4896-Mecamilamina	+

<b>Combinaciones de fármacos</b>	<b>Resultados*</b>
SR4896-Clopidogrel	+
Cilostazol-Idraparinux	+
Cilostazol-Irbesartán	+
Cilostazol-Otamixabán	+
Cilostazol-Mecamilamina	+
Cilostazol-SR4896	+
Mecamilamina-Clopidogrel-Irbesartán	+
Mecamilamina-Clopidogrel-Idraparinux	+
Mecamilamina-Clopidogrel-Otamixabán	+
Mecamilamina-Clopidogrel-SR48692	+
Mecamilamina-Cilostazol-Irbesartán	+
Mecamilamina-Cilostazol-Idraparinux	+
Mecamilamina-Cilostazol-Otamixabán	+
Mecamilamina-Cilostazol-SR48692	+

\*+ (resultados positivos) designa una disminución de la puntuación clínica global (compuesta por la puntuación de la cola, la puntuación de las extremidades posteriores, la puntuación de las extremidades anteriores y la puntuación de la vejiga) en comparación con sujetos sin tratamiento.

## REFERENCIAS

- Adair-Kirk TL *et al.* A site on laminin  $\alpha_5$ , AQARSAASKVKVSMKF, induces inflammatory cell production of matrix metalloproteinase-9 and chemotaxis. *J. Immunol.* 2003; 171: 398–406.
- Agrawal SM & Yong VW. Immunopathogenesis of multiple sclerosis. *Int Rev Neurobiol.* 2007; 79: 99-126.
- Alonso A & Hernan MA. Temporal trends in the incidence of multiple sclerosis: a systematic review. *Neurology.* 2008; 71: 129-35.
- Bjartmar C *et al.* Neurological disability correlates with spinal cord axonal loss and reduced N-acetyl aspartate in chronic multiple sclerosis patients. *Ann Neurol.* 2000; 48: 893-901.
- Block ML & Hong JS. Microglia and inflammation-mediated neurodegeneration: multiple triggers with a common mechanism. *Prog Neurobiol.* 2005; 76: 77-98.
- Campbell, J.J *et al.* Chemokines and the arrest of lymphocytes rolling under flow conditions. *Science* 1998; 279: 381–384.
- Cardona AE *et al.* Chemokines in and out of the central nervous system: much more than chemotaxis and inflammation. *J Leukoc Biol.* 2008; 84: 587-94.
- Carvey PM *et al.* 6-Hydroxydopamine-induced alterations in blood-brain barrier permeability. *Eur J Neurosci.* 2005; 22: 1158-68.
- Cree BA *et al.* Neuromyelitis optica. *Semin Neurol.* 2002; 22: 105-22.
- De La Cruz *et al.* Effects of clopidogrel and ticlopidine on experimental diabetic ischemic retinopathy in rats. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2003; 367: 204–210.
- DeLuca GC *et al.* Axonal loss in multiple sclerosis: a pathological survey of the corticospinal and sensory tracts. *Brain.* 2004; 127: 1009-18.
- Ferguson B *et al.* Axonal damage in acute multiple sclerosis lesions. *Brain.* 1997; 120 (Pt 3): 393-9.
- Ganter P *et al.* Spinal cord axonal loss in multiple sclerosis: a post-mortem study. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 1999; 25: 459-67.
- Ghezzi A *et al.* Clinical characteristics, course and prognosis of relapsing Devic's Neuromyelitis Optica. *J Neurol.* 2004; 251: 47-52.

Ghosh N *et al.* Evidence of axonal damage in human acute demyelinating diseases. *J Neurol Sci.* 2004; 222: 29-34.

Gonzalez-Scarano F & Baltuch G. Microglia as mediators of inflammatory and degenerative diseases. *Annu Rev Neurosci.* 1999; 22: 219-40.

Haines JL *et al.* Linkage of the MHC to familial multiple sclerosis suggests genetic heterogeneity. The Multiple Sclerosis Genetics Group. *Hum Mol Genet.* 1998; 7: 1229-34.

Hochmeister S *et al.* Dysferlin is a new marker for leaky brain blood vessels in multiple sclerosis. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2006; 65: 855-65.

Ishii T & Haga S. Immuno-electron microscopic localization of immunoglobulins in amyloid fibrils of senile plaques. *Acta Neuropathol.* 1976; 36: 243-9.

Itagaki S *et al.* Presence of T-cytotoxic suppressor and leucocyte common antigen positive cells in Alzheimer's disease brain tissue. *Neurosci Lett.* 1988; 91: 259-64.

Jordan, SP & Sessa, PWC Evolving functions of endothelial cells in inflammation. *Nature Reviews Immunology* 2007; 7:803-815.

Keegan M *et al.* Plasma exchange for severe attacks of CNS demyelination: predictors of response. *Neurology.* 2002; 58: 143-6.

Kim SU & de Vellis. Microglia in health and disease. *J Neurosci Res.* 2005; 81: 302-13.

Kirk J *et al.* Tight junctional abnormality in multiple sclerosis white matter affects all calibres of vessel and is associated with blood-brain barrier leakage and active demyelination. *J Pathol.* 2003; 201: 319-27.

Konstantinopoulos PA *et al.* Selective modulation of the erythropoietic and tissue-protective effects of erythropoietin: time to reach the full therapeutic potential of erythropoietin. *Biochim Biophys Acta.* 2007; 1776: 1-9.

Kortekaas R *et al.* Blood-brain barrier dysfunction in parkinsonian midbrain in vivo. *Ann Neurol.* 2005; 57: 176-9.

Kreutzberg GW Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends Neurosci.* 1996; 19: 312-8.

Lassmann H *et al.* The immunopathology of multiple sclerosis: an overview. *Brain Pathol.* 2007; 17: 210-8.

Lassmann H. Models of multiple sclerosis: new insights into pathophysiology and repair. *Curr Opin Neurol.* 2008; 21: 242-7.

Lehmann HC *et al.* Plasma exchange in neuroimmunological disorders: Parte 1: Rationale and treatment of inflammatory central nervous system disorders. *Arch Neurol.* 2006; 63: 930-5.

Licandro A *et al.* Alzheimer's disease and senile brains: an immunofluorescence study. *Riv Patol Nerv Ment.* 1983; 104: 75-87.

Lossinsky AS & Shivers RR. Structural pathways for macromolecular and cellular transport across the blood-brain barrier during inflammatory conditions. Review. *Histol Histopathol.* 2004; 19: 535-64.

Lovas G *et al.* Axonal changes in chronic demyelinated cervical spinal cord plaques. *Brain.* 2000; 123 ( Pt 2): 308-17.

Lucchinetti CF *et al.* A role for humoral mechanisms in the pathogenesis of Devic's neuromyelitis optica. *Brain.* 2002; 125: 1450-61.

Man S *et al.* Inflammatory cell migration into the central nervous system: a few new twists on an old tale. *Brain Pathol.* 2007; 17: 243-50.

Mandler RN *et al.* Devic's neuromyelitis optica: a prospective study of seven patients treated with prednisone and azathioprine. *Neurology.* 1998; 51: 1219-20.

Mann DM *et al.* Immunohistochemical staining of senile plaques. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 1982; 8: 55-61.

Marchioni E *et al.* Postinfectious inflammatory disorders: subgroups based on prospective follow-up. *Neurology.* 2005; 65: 1057-65.

Mattiace LA *et al.* Detection of HLA-DR on microglia in the human brain is a function of both clinical and technical factors. *Am J Pathol.* 1990; 136: 1101-14.

McGeer PL *et al.* Immune system response in Alzheimer's disease. *Can J Neurol Sci.* 1989; 16: 516-27.

Menge T *et al.* Acute disseminated encephalomyelitis: an acute hit against the brain. *Curr Opin Neurol.* 2007; 20: 247-54.

Miller DH *et al.* Measurement of atrophy in multiple sclerosis: pathological basis, methodological aspects and clinical relevance. *Brain.* 2002; 125: 1676-95.

Mohamed A *et al.* The use of digital technology to assess the severity of the Experimental Allergic Encephalomyelitis (EAE) spinal cord lesion. *Biomed Sci Instrum.* 2004; 40:419-23.

Neuhaus O *et al.* Mechanisms of action of glatiramer acetate in multiple sclerosis. *Neurology.* 2001; 56: 702-8.

Neuhaus O *et al.* Putative mechanisms of action of statins in multiple sclerosis--comparison to interferon-beta and glatiramer acetate. *J Neurol Sci.* 2005; 233: 173-7.

Neumann H. Control of glial immune function by neurons. *Glia.* 2001; 36: 191-9.

Neumann H & Wekerle H. Neuronal control of the immune response in the central nervous system: linking brain immunity to neurodegeneration. *J Neuropathol Exp Neurol.* 1998; 57: 1-9.

O'Connor PW *et al.* Randomized multicenter trial of natalizumab in acute MS relapses: clinical and MRI effects. *Neurology.* 2004; 62: 2038-43.

Olsson T & Hillert J. The genetics of multiple sclerosis and its experimental models. *Curr Opin Neurol.* 2008; 21: 255-60.

Perlmutter LS *et al.* MHC class II-positive microglia in human brain: association with Alzheimer lesions. *J Neurosci Res.* 1992; 33: 549-58.

Pittock SJ *et al.* Brain abnormalities in neuromyelitis optica. *Arch Neurol.* 2006; 63: 390-6.

Polman CH *et al.* A randomized, placebo-controlled trial of natalizumab for relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med.* 2006; 354: 899-910.

Poser CM. Multiple sclerosis and recurrent disseminated encephalomyelitis are different diseases. *Arch Neurol.* 2008; 65: 674; author reply 674-5.

Prat A *et al.* Glial cell influence on the human blood-brain barrier. *Glia.* 2001; 36: 145-55.

Prineas JW *et al.* Immunopathology of secondary-progressive multiple sclerosis. *Ann Neurol.* 2001; 50: 646-57.

Reist M, *et al.* Very slow chiral inversion of clopidogrel in rats: a pharmacokinetic and mechanistic investigation. *Drug Metab Dispos.* 2000; 28: 1405-1410.

Rogers J *et al.* Expression of immune system-associated antigens by cells of the human central nervous system: relationship to the pathology of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging.* 1988; 9: 339-49.

Rubin LL & Staddon JM. The cell biology of the blood-brain barrier. *Annu Rev Neurosci.* 1999; 22: 11-28.

Rust RS. Multiple sclerosis, acute disseminated encephalomyelitis, and related conditions. *Semin Pediatr Neurol.* 2000; 7: 66-90.

Singh VK. Neuroautoimmunity: pathogenic implications for Alzheimer's disease. *Gerontology.* 1997; 43: 79-94.

Skaper SD. The brain as a target for inflammatory processes and neuroprotective strategies. *Ann N Y Acad Sci.* 2007; 1122: 23-34.

Stadelmann C *et al.* Cortical pathology in multiple sclerosis. *Curr Opin Neurol.* 2008; 21: 229-34.

Stoll G & Jander S. The role of microglia and macrophages in the pathophysiology of the CNS. *Prog Neurobiol.* 1999; 58: 233-47.

Szpak GM *et al.* Neurones and microglia in central nervous system immune response to degenerative processes. Parte 1: Alzheimer's disease and Lewy body variant of Alzheimer's disease. Quantitative study. *Folia Neuropathol.* 2001; 39: 181-92.

Tenembaum S *et al.* Acute disseminated encephalomyelitis: a long-term follow-up study of 84 pediatric patients. *Neurology.* 2002; 59(8): 1224-31.

Tenembaum S *et al.* Acute disseminated encephalomyelitis. *Neurology.* 2007; 68: S23-36.

Tilleux S & Hermans E. Neuroinflammation and regulation of glial glutamate uptake in neurological disorders. *J Neurosci Res.* 2007; 85: 2059-70.

Trapp BD *et al.* Axonal transection in the lesions of multiple sclerosis. *N Engl J Med.* 1998; 338: 278-85.

Trapp BD & Nave KA. Multiple sclerosis: an immune or neurodegenerative disorder? *Annu Rev Neurosci.* 2008; 31: 247-69.

Trapp BD *et al.* Neurodegeneration in multiple sclerosis: relationship to neurological disability. *Neuroscientist.* 1999; 5: 48-57.

Tu X *et al.* Anti-inflammatory renoprotective effect of clopidogrel and irbesartan in chronic renal injury. *J Am Soc Nephrol.* 2008; 19(1):77-83.

Vestweber, D. Adhesion and signaling molecules controlling the transmigration of leukocytes through endothelium. *Immunological Reviews* 2007; 218:178-196.

Walker DG & Lue LF. Investigations with cultured human microglia on pathogenic mechanisms of Alzheimer's disease and other neurodegenerative diseases. *J Neurosci Res.* 2005; 81: 412-25.

Wekerle H *et al.* Cellular immune reactivity within the CNS. *Trends Neurosci.* 1986; 9: 271-277.

Wingerchuk DM & Weinshenker BG. Neuromyelitis Optica. *Curr Treat Options Neurol.* 2005; 7: 173-182.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> PHARNEXT

<120> Neuroinflamación 1

<130> B859EPPC

<140> PCT/EP2010/054068

<141> 2010-03-29

<160> 1

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

<211> 21

<212> PRT

<213> Ratón

<400> 1

Met Glu Val Gly Trp Tyr Arg Ser Pro Phe Ser Arg Val Val His Leu  
1 5 10 15

Tyr Arg Asn Gly Lys  
20

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Una composición que comprende una combinación de al menos dos compuestos seleccionados de un modulador de la permeabilidad del endotelio y un modulador de la formación de la matriz extracelular, en la que el modulador de la permeabilidad del endotelio se selecciona de irbesartán, bosentán, fondaparinux, pentazocina, nifuroxazida, tiludronato, gliclazida y loperamida, y el modulador de la formación de la matriz extracelular se selecciona de idraparinux, otamixabán, argatrobán, lisinopril, quinapril, ramipril, enoxaparina, disulfiram y espironolactona, o sales o profármacos o derivados o formulaciones de liberación sostenida de éstos, para uso en el tratamiento de la neuroinflamación.
- 10 2. La composición para uso de la reivindicación 1, en la que el modulador de la permeabilidad del endotelio es irbesartán, o una sal, profármaco, derivado, o formulación de liberación sostenida de éste.
3. La composición para uso de la reivindicación 1 ó 2, en la que el modulador de la formación de la matriz extracelular es idraparinux y/o otamixabán, o una sal, profármaco, derivado, o formulación de liberación sostenida de éste.
- 15 4. La composición para uso de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que dicha composición comprende al menos una de las combinaciones de compuestos siguientes:
- idraparinux e irbesartán,
  - idraparinux y otamixabán,
  - irbesartán y otamixabán,
- 20 5. La composición según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores para uso en el tratamiento de la neuroinflamación en un sujeto que tiene un trastorno neurodegenerativo, autoinmune, infeccioso, tóxico o traumático.
6. La composición según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores para uso en el tratamiento de la neuroinflamación en un sujeto que tiene esclerosis múltiple (MS).
- 25 7. La composición para uso de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que dichos compuestos se administran simultáneamente, separadamente o secuencialmente a un mismo sujeto.
8. La composición según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que dichos compuestos se formulan en formas de dosificación sólidas o líquidas, con uno o varios excipientes farmacéuticamente aceptables, para administración única o repetida a un paciente.

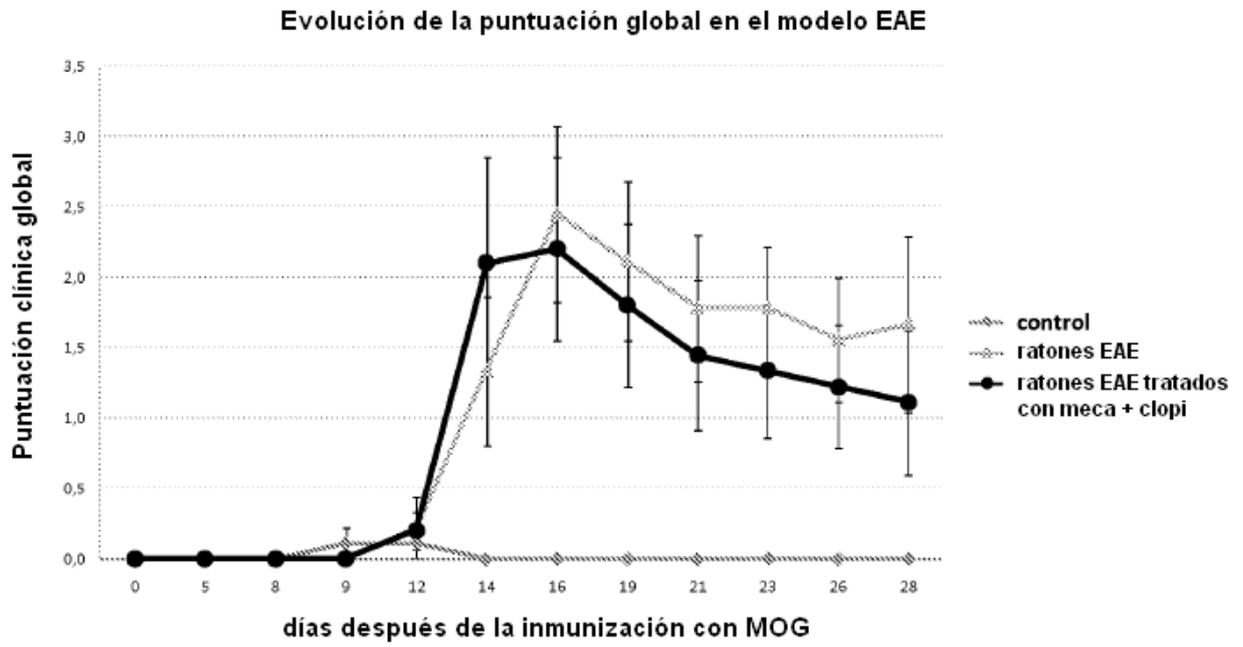


Figura 1