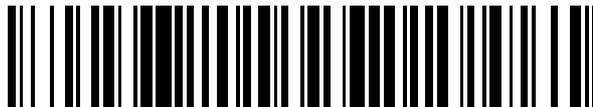


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 554 459**

51 Int. Cl.:

**A61K 31/341** (2006.01)

**A61P 25/00** (2006.01)

**A61K 38/21** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.12.2012 E 12859754 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.09.2015 EP 2670406**

54 Título: **Terapia combinada con interferón beta y andrografólidos para la esclerosis múltiple**

30 Prioridad:

**21.12.2011 US 201161578650 P**

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

**21.12.2015**

73 Titular/es:

**INNOBIOSCIENCE, LLC (100.0%)  
1303 Riverview Circle  
Bradenton, FL 34209, US**

72 Inventor/es:

**HANCKE OROZCO, JUAN, L. y  
BURGOS, RAFAEL**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

**ES 2 554 459 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

Terapia combinada con interferón beta y andrografólidos para la esclerosis múltiple

**Campo de la invención**

5 La presente invención se refiere a composiciones farmacéuticas para uso en el tratamiento de la esclerosis múltiple (EM) y/o otras enfermedades desmielinizantes, que comprenden interferón  $\beta$  (IFN- $\beta$ ), un compuesto de Fórmula I, y, opcionalmente, uno o más excipientes y/o vehículos farmacéuticamente aceptables. Otro objeto de la presente invención es proporcionar la composición farmacéutica reivindicada para uso en la reducción de la fatiga en un ser humano con una enfermedad desmielinizante.

**Antecedentes de la invención**

10 La esclerosis múltiple (EM) es una enfermedad crónica, inflamatoria, desmielinizante del sistema nervioso central (SNC). Se inicia normalmente entre los 20 y 40 años de edad, y prevalece en las mujeres. La EM es diagnosticada clínicamente de forma definida después de al menos dos eventos neurológicos, que muestran la desmielinización del SNC en diferentes áreas y en diferentes momentos (Jacobs *et al.* 2000, *The New England Journal of Medicine* 343(13): 898-904).

15 La causa de la EM se desconoce todavía, pero varias líneas de evidencia, derivadas de la encefalomiелitis autoinmune experimental, apoyan el origen autoinmune de la enfermedad (Inglese *et al.* 2010, *NMR Biomed.* 23(7): 865-872). La EM se caracteriza por áreas de placas desmielinizadas o islas diseminadas en todo el SNC con una predilección por los nervios ópticos, la médula espinal, sustancia blanca periventricular (WM), cuerpo calloso, y materia gris cortical y sub-cortical (GM). (Inglese *et al.* 2010, *NMR Biomed* 23(7): 865-872). Las lesiones de EM son muy heterogéneas, respecto a la presencia y extensión de la inflamación, desmielinización, daño axonal, gliosis y remielinización (Inglese *et al.* 2010, *NMR Biomed* 23(7): 865-872).

20 Las puntuaciones en las escalas de los Sistemas Funcionales (Functional Systems) (SFS) y Estatus de Discapacidad Expandida (Expanded Disability Status) (EDSS) constituyen uno de los instrumentos de evaluación más antiguos y más ampliamente utilizados en la EM (Kurtzke JF 1983, *Neurology*, 33:1444-1452). Sobre la base de un examen neurológico normal, se clasifican 7 sistemas funcionales. Estos valores se utilizan junto con las observaciones y la información relativa a la marcha y el uso de dispositivos de ayuda para evaluar la EDSS. Cada uno de los SFS es una escala de evaluación clínica ordinal que va de 0 a 5 o 6. EDSS es un escala de calificación clínica ordinal que va de 0 (examen normal neurológico) a 10 (la muerte debido a la EM) en incrementos de medio punto.

25 Las imágenes por resonancia magnética (IRM) del cerebro, pueden agregar certeza al diagnóstico, mediante la identificación de lesiones consistentes con la aparición de la desmielinización.

30 La incorporación de los IFNs al tratamiento de la EM ha abierto una nueva vía farmacéutica con respecto a la vía tradicional de fármacos inmunosupresores (Zaragozá *et al.* 2002, *Farmacia Hospitalaria* 26(5): 294-301).

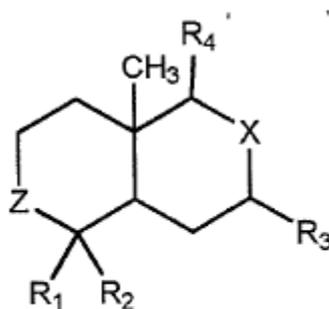
35 Los interferones son citoquinas con actividad antivírica, antiproliferativa, y antitumoral, aunque tienen diferentes características inmunomoduladoras. Por lo tanto, estas moléculas tienen un gran potencial terapéutico en las enfermedades neoplásicas y virales. Hay diferentes tipos de IFNs: el interferón alfa (IFN- $\alpha$ ), producido por los leucocitos, interferón-beta (IFN- $\beta$ ), producido por los fibroblastos y el interferón-gamma (ING- $\gamma$ ), producido por los linfocitos-T (Zaragozá *et al.* 2002, *Farmacia Hospitalaria* 26(5): 294-301).

40 En particular, varios datos han demostrado la eficiencia de IFN- $\beta$  en el tratamiento de la EM. Diferentes ensayos clínicos de doble ciego, aleatorios, controlados con placebo han demostrado un efecto beneficioso en una variedad de parámetros de la enfermedad, reduciendo la discapacidad, la frecuencia de las recaídas, la frecuencia de aparición de nuevas lesiones, y la mejora de la atrofia cerebral (Zaragozá *et al.* 2002, *Farmacia Hospitalaria* 26(5): 294-301).

45 A pesar de promover la utilización de IFN- $\beta$  para la EM, sin embargo, la técnica también reconoce que tal tratamiento es sólo moderadamente eficaz; IFN- $\beta$  en su mejor meramente retarda la progresión de la EM, no cura la EM. Además, el costo relativamente alto de IFN- $\beta$  le hace económicamente inaccesible para muchos pacientes que lo necesitan. La técnica de este modo tiene una necesidad largamente sentida de un tratamiento más eficaz para la EM.

**Compendio de la invención**

50 Nuestros resultados muestran que el tratamiento de EM y otras enfermedades desmielinizantes usando IFN beta sorprendentemente se mejora si el IFN se administra junto con un compuesto de Fórmula I:



(I)

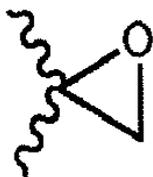
en donde

R<sub>1</sub> se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo o hidroxilo,

R<sub>2</sub> se selecciona del grupo que consiste en hidroxialquilo o alquil-O-L<sub>1</sub>, en donde L<sub>1</sub> es un resto de carbohidrato,

5 R<sub>3</sub> se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno o hidroxilo,

X se selecciona del grupo que consiste en C(=CH<sub>2</sub>), CH(OH), o un resto de espirooxirano-2 (es decir, un resto C(=CH<sub>2</sub>) epoxidado,



Z se selecciona entre el grupo que consiste en CH<sub>2</sub>, CH(OH) o C(=O), y

10 R<sub>4</sub> se selecciona entre el grupo que consiste en un L<sub>2</sub>-alquilo o L<sub>2</sub>-alquenoil opcionalmente sustituidos, en donde L<sub>2</sub> es un resto 3-furanoil o 3-fur-3-enilo opcionalmente sustituidos. El compuesto de Fórmula I se puede proporcionar como una sal, éster, o éter farmacéuticamente aceptables del mismo, y, opcionalmente, se puede formular en una forma de dosificación oral completa, utilizando uno o más excipientes y/o vehículos farmacéuticamente aceptables.

15 Hemos encontrado que esta combinación favorece tanto la remielinización como que reduce la inflamación y la fatiga, logrando así un efecto sinérgico. Hemos demostrado que la administración de un compuesto de Fórmula I en combinación con IFN-beta reduce significativamente los signos clínicos de EM; un efecto sinérgico de los dos ingredientes activos.

20 Hay ejemplos de combinación de interferón y otras sustancias para la preparación de composiciones para el tratamiento de diferentes enfermedades. El documento de patente de Estados Unidos US2009/0280087, por ejemplo, describe la combinación de interferón alfa y C-Ficocianina para una preparación farmacéutica para el tratamiento de la enfermedad autoinmune, alergia y cáncer. El documento de patente de Estados Unidos US6869600 describe el uso de la hormona del crecimiento (GH), junto con un interferón (IFN) para producir una composición farmacéutica para tratar la esclerosis múltiple y/o otras enfermedades desmielinizantes. La técnica anterior, sin embargo, no sugiere la combinación de interferón con cualquier compuesto de Fórmula I.

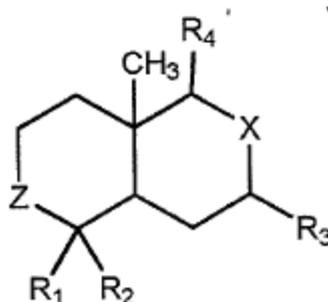
25 Por lo tanto, un objeto principal de la presente invención es proporcionar composiciones farmacéuticas para uso en el tratamiento de la esclerosis múltiple (EM) y/o otras enfermedades desmielinizantes, que comprende el interferón beta (IFN-β), un compuesto de Fórmula I, y, opcionalmente, uno o más excipientes y/o vehículos farmacéuticamente aceptables.

30 Otro objeto de la presente invención es, por lo tanto, proporcionar la composición farmacéutica según las reivindicaciones para uso en un método para tratar a un sujeto que sufre de EM y/o otra enfermedad desmielinizante, el método consiste en la administración de las composiciones farmacéuticas de la invención al sujeto en una cantidad eficaz y durante un tiempo suficiente para producir la remielinización y para reducir la inflamación.

También otro objeto de la invención es proporcionar la composición farmacéutica según las reivindicaciones para uso en un método para reducir la fatiga en un ser humano con una enfermedad desmielinizante, el método consiste en la administración de las composiciones farmacéuticas de la invención al sujeto en una cantidad eficaz y durante un tiempo suficiente.

5 **Descripción detallada de la invención**

La presente invención proporciona composiciones farmacéuticas y métodos para el tratamiento de la esclerosis múltiple (EM) y/o otras enfermedades desmielinizantes, lo que comprende la terapia de combinación con el interferón beta (IFN-β) y al menos un compuesto de la Fórmula (I):



(I)

10 en donde

R<sub>1</sub> se selecciona entre el grupo que consiste en hidrógeno, alquilo o hidroxilo,

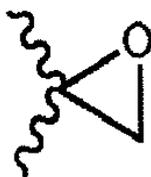
R<sub>2</sub> se selecciona del grupo que consiste en hidroxialquilo o alquil-O-L<sub>1</sub>, en donde L<sub>1</sub> es un resto de carbohidrato,

R<sub>3</sub> se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno o hidroxilo,

X se selecciona del grupo que consiste en C(=CH<sub>2</sub>), CH(OH), o un resto espirooxirano-2.

15 Z se selecciona del grupo que consiste en CH<sub>2</sub>, CH(OH) o C(=O), y

R<sub>4</sub> se selecciona del grupo que consiste en un L<sub>2</sub>-alquilo o L<sub>2</sub>-alquenilo opcionalmente sustituido, en donde L<sub>2</sub> es un resto 3-furanilo o 3-fur-3-enilo opcionalmente sustituido, o una sal, éster, éter o profármaco del mismo farmacéuticamente aceptable, y, opcionalmente, uno o más excipientes y/o vehículos farmacéuticamente aceptables. Por "resto espirooxirano-2" nos referimos a un resto C(=CH<sub>2</sub>) epoxidado:



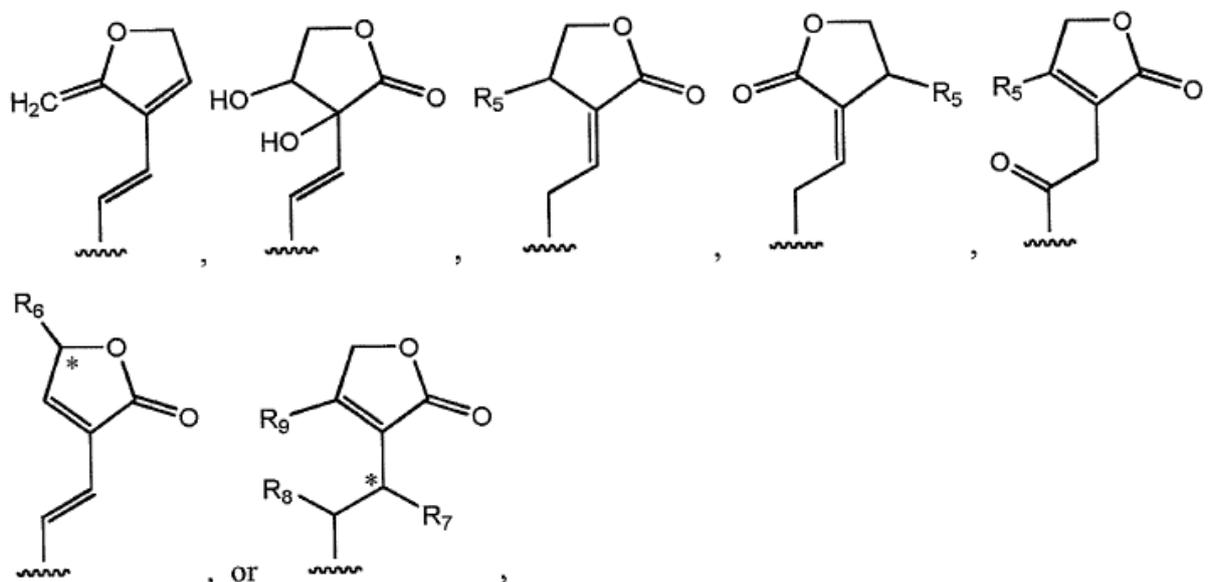
20

En una forma de realización, R<sub>1</sub> es metilo.

En otra forma de realización, R<sub>2</sub> es hidroximetilo o CH<sub>2</sub>-O-Glc, en donde Glc es un resto de glucosa que forma un glucósido.

25 En otra forma de realización, R<sub>4</sub> es un 3-(3-furanil)propilo, 3-(3-furanil)prop-1-enilo, 3-(3-furanil)prop-2-enilo, 3-(3-fur-3-enil)propilo o 3-(3-fur-3-enil)prop-1-enilo opcionalmente sustituidos en donde los restos 3-furanilo o 3-fur-3-enilo están adicionalmente opcionalmente sustituidos.

En una forma de realización, R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, X y Z son los descritos anteriormente, y R<sub>4</sub> se selecciona entre el grupo constituido por:



en donde:

R<sub>5</sub> se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno o hidroxilo,

- 5 R<sub>6</sub> y R<sub>7</sub> se seleccionan independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, hidroxilo o alquilo, o R<sub>6</sub> y R<sub>7</sub> se sustituyen de forma simultánea por un solo enlace directo entre los átomos de carbono denotados por \*, formando así un dímero de dos moléculas de monómero de fórmula (I), y R<sub>8</sub> y R<sub>9</sub> se seleccionan independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, hidroxilo o alquilo.

En una forma de realización, R<sub>6</sub>, R<sub>7</sub>, R<sub>8</sub> o R<sub>9</sub> pueden ser independientemente metoxi.

- 10 En formas de realización preferidas, los compuestos de Fórmula (I) se seleccionan del grupo que consiste en andrografólido, neoandrografólido, 14-desoxiandrografólido, 14-desoxi-11,12-didehidroandrografólido, andrografísido, andrograpanina, 14-desoxi-11-oxo-andrografólido, 14-desoxi-11-hidroxi-andrografólido, 14-desoxi-12-hidroxi-andrografólido, 3,14-didesoxiandrografólido, 3-oxo-14-desoxiandrografólido, 8,17-epoxi-14-desoxiandrografólido, 14-desoxi-17-beta-hidroxiandrografólido, 12-hidroxiandrografólido, bisandrografólido A, 3-oxo-14-desoxi-11,12-didehidroandrografólido, 7-hidroxi-14-desoxiandrografólido, 15-metoxi-3,19-dihidroxi-8(17)11,13-ent-labda-trien-16,15-ólido, andropanólido, 14-desoxi-12-metoxi-andrografólido, 14-epi-andrografólido, 19-hidroxi-ent-labda-8(17),13-dien-15,16-ólido, 3,13,14,19-tetrahidroxi-ent-labda-8(17),11- dien-16,15-ólido, 3,19-dihidroxi-15-metoxi-ent-labda-8(17),11,13-trien-16,15-ólido, y 3,19-dihidroxi-ent-labda-8(17),12-dien-16,15-ólido.

- 20 En una forma de realización más preferida, el compuesto de fórmula I comprende el andrografólido. El andrografólido, Registro CAS N° 5508-58-7, nombre sistemático 3-(2-(decahidro-6-hidroxi-5-(hidroximetil)-5,8a-dimetil-2-metilenonaftil)etilideno)dihidro-4-hidroxifuran-2(3H)-ona, es un compuesto de Fórmula I, en donde R<sub>1</sub> es alquilo, R<sub>2</sub> es hidroxialquilo, R<sub>3</sub> es H, X es C=CH<sub>2</sub>, Z es CH(OH) y R<sub>4</sub> es un resto (E)-4-hidroxi-3-propilidendihidrofuran-2(3H)-ona.

- 25 El andrografólido es un principio amargo, sustancia neutra cristalina incolora, es un diterpeno que contiene un anillo  $\gamma$ -lactona. La estructura cristalina del andrografólido se determinó por Smith *et al.* (1982) y Fujita *et al.* (1984). El andrografólido puede ser aislado de la parte aérea de la *Andrographis paniculata* por extracción con alcohol o con soluciones alcalinas. La hidrólisis del andrografólido bajo la escisión del anillo de lactona produce sales del ácido andrografólico que puede ser reconvertido en el andrografólido por acidificación (Tang y Eisenbrand 1992).

- 30 En otra forma de realización más preferida, el compuesto de Fórmula I comprende neoandrografólido. El neoandrografólido, Registro CAS N° 27215-14-1, nombre sistemático 3-(2-(5-((beta-D-glucopiranosiloxi)metil)decahidro-5,8a-dimetil-2-metileno-1-naftalenil)etil)-(1R(1alfa, 4abeta, 5alfa, 8aalfa))-2(5H)-furanona, fue descrito por primera vez por Kleipool (Kleipool, 1952).

La estructura del neoandrografólido fue descrita como un glucósido de diterpeno (Chan *et al.*, 1971).

- 35 En otra forma de realización más preferida, el compuesto de la Fórmula I comprende desoxi-didehidroandrografólido, desoxi-oxoandrografólido o desoxiandrografólido, cada uno estrechamente relacionado estructuralmente con el andrografólido. Véase Bailmain y Connolly (1973).

En otra forma de realización más preferida, el compuesto de Fórmula I comprende didesoxiandrografólido (también referido como andrograpanina, véase Fujita *et al.*, (1984)), y andrografísido o un 14-desoxi derivado del mismo (por ejemplo, 14-desoxiandrografísido). El didesoxiandrografólido es la aglicona del neoandrografólido.

5 Jantan y Waterman (1994) aislaron a partir de la parte aérea de un espécimen de Malasia otros diterpenos como constituyentes principales, lo que indica que la *A. paniculata* presenta una gran variación en la composición química dependiendo de la fuente de origen (Jantan *et al.*, 1994).

10 En otra forma de realización más preferida, el compuesto de Fórmula I comprende 3-O- $\beta$ -D-glucopiranosil-14,19-didesoxiandrografólido, 14-desoxi-17-hidroxiandrografólido, 19-O-[ $\beta$ -D-apiofuranosil(1f2)- $\beta$ -D-glucopiranosil]-3,14-didesoxiandrografólido, 3-O- $\beta$ -D-glucopiranosilandrografólido, 12S-hidroxiandrografólido y/o andrografatósido. Las estructuras de cada uno son reveladas por Shen *et al.* 2006.

En otra forma de realización más preferida, el compuesto de la Fórmula I comprende andropanólido o isoandrografólido. Las estructuras de cada uno son reveladas por Pramanick *et al.*, 2006.

15 La técnica anterior enseña que el andrografólido reduce la producción de interferón gamma. Véase Burgos *et al.*, 2005, Documento de Patente de Estados Unidos 8.084.495 (el andrografólido reduce la producción de interferón y en células T estimuladas con concanavalina A). Debido a que la técnica anterior enseñaba que el andrografólido reduce la producción de interferón, el experto en la materia habría predicho que el andrografólido (o compuestos similares de la Fórmula I) habría sido perjudicial si se administraba a un paciente que sufría de una condición (tal como la esclerosis múltiple) que se sabe se trata mediante la administración de interferón exógeno. Más bien, el técnico habría predicho que los compuestos de fórmula I serían ineficaces en el mejor de los casos, y en el peor reducirían activamente la eficacia del interferón exógeno.

20 Probando esta hipótesis en ratones de laboratorio, sin embargo, sorprendentemente encontramos lo contrario de lo que cabría esperar: se encontró que la administración concomitante de un compuesto de Fórmula I aumenta la eficacia del interferón, produciendo una mejora inesperada y sinérgica en el estado de salud.

25 Sin pretender limitar el alcance jurídico de las reivindicaciones jurídicas de la presente patente, creemos que este efecto sinérgico puede explicarse por el siguiente mecanismo: nosotros (y otros) han descrito que el andrografólido puede interferir con la unión del factor nuclear kappaB (NF- $\kappa$ B) a ADN (Hidalgo *et al.*, 2005; Xia *et al.*, 2004b) (Documento de Patente de Estados Unidos 8.084.495). NF- $\kappa$ B es un factor de transcripción que se encuentra en una gran variedad de células inmunes, que participa en la regulación de genes implicados en procesos celulares y fisiológicos, tales como el crecimiento y la apoptosis, y tiene un papel importante en las respuestas inflamatorias e inmunes, mediante la inducción de la transcripción de genes pro-inflamatorios (Baeuerle *et al.*, 1996). Por ejemplo, los mediadores pro-inflamatorios tales como la molécula de adhesión intercelular 1, IFN $\gamma$ , iNOS, COX-2 e IL-8 son proteínas reguladas por NF- $\kappa$ B. Puesto que el andrografólido es capaz de modular en disminución ambas respuestas inmunes adaptativas, la humoral y la celular, sospechamos que esta evidencia puede apoyar un efecto inmuno-supresor.

35 Se ha demostrado *in vitro*, que esta molécula es capaz de interferir con la proliferación de células T y liberación de citoquinas en respuesta a la estimulación alogénica. La activación de las células T por las células dendríticas (DCs) fue completamente abolida mediante la exposición de las DCs a andrografólido durante pulsos de antígeno (Iruretagoyena *et al.*, 2005). El andrografólido es capaz de interferir con la maduración de las DCs y con su capacidad para presentar antígenos a las células T.

40 También se encontró que el andrografólido puede interferir con la producción de citoquinas en células Jurkat. Este efecto puede ser mediado por una reducción de la producción de IL-2 por medio de una reducción de las vías de transducción de señales y/o la interferencia con la activación de los factores de transcripción. Hemos propuesto que la inhibición de las citoquinas por el andrografólido, puede ser producida por una interferencia con ERK1/2, un MAPK involucrado en la producción de IFN $\gamma$  e IL-2 en las células T (Burgos *et al.*, 2005). Otros autores mostraron que el andrografólido en una forma dependiente de la dosis inhibió la migración de los macrófagos hacia C5a. La inhibición de la quimiotaxis se explica porque el andrografólido atenúa significativamente la fosforilación estimulada por C5a de ERK1/2, y de su activador corriente arriba, la MAP quinasa-ERK quinasa (MEK1/2), y la fosforilación de Akt, una proteína diana corriente abajo de PI3K (Tsai *et al.*, 2004). La interferencia de la fosforilación de ERK1/2 también explica el efecto inhibitorio de los andrografólidos sobre TNF-alfa, IL-12a e IL-12b a nivel de ARNm, y la producción de las proteínas TNF-alfa e IL-12p70 de una manera dependiente de la concentración en macrófagos murinos (Qin *et al.*, 2006). Recientemente se ha observado una interferencia de las vías de transducción de señales en las células T. Usando anti-CD3 o PMA/Iono demostramos que los andrografólidos pueden reducir la fosforilación de ERK1/2 y ERK5. Estas vías son responsables de la producción de citoquinas (Dumont *et al.*, 1998; Garaude *et al.*, 2005), sin embargo, un paso clave es la activación del factor nuclear en las células T activadas (NAFT), que es uno de los principales factores de transcripción que se unen a los promotores del gen IL-2.

55 Demostramos usando NFAT-luc que el andrografólido puede interferir con la activación de NFAT, probablemente por una reducción de la translocación al núcleo, lo que explica la disminución de la producción de IL-2. Además, la respuesta inmune *in vivo* tal como la respuesta de anticuerpos a un antígeno dependiente del timo y la

hipersensibilidad de tipo retardado se reduce drásticamente en ratones mediante tratamiento con un andrografólido. La inhibición del andrografólido de las células T se aplicó para interferir con la aparición de la encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE), una enfermedad desmielinizante inflamatoria del sistema nervioso central que está mediada principalmente por las células T CD4 (+), que sirve como un modelo animal para la esclerosis múltiple humana. El tratamiento con andrografólido fue capaz de reducir significativamente los síntomas de EAE en ratones mediante la inhibición de las células T y las respuestas de anticuerpos dirigidas contra los antígenos de mielina (Iruretagoyena *et al.*, 2005).

Usando un modelo de EAE inducida por MOG (mielina-oligodendrocito-glicoproteína) en ratones, encontramos que el tratamiento diario con 2 mg/kg subcutáneo de andrografólido produjo una importante mejora en las puntuaciones clínicas de los animales tratados con el andrografólido en comparación con los animales tratados con solución salina. Del mismo modo, en otro modelo de enfermedad autoinmune, la administración del andrografólido redujo la susceptibilidad, previno los síntomas y redujo los anticuerpos anti-nucleares y el daño renal del lupus eritematoso sistémico.

Se ha mostrado un efecto sinérgico del tratamiento de andrografólido e IFN- $\beta$  en el modelo del ratón de la EAE. El promedio de las puntuaciones clínicas de ratones inyectados con IFN- $\beta$  mostró una disminución leve en el promedio de las puntuaciones clínicas en comparación con los controles inyectados con solución salina. Sin embargo, cuando se combinó con el andrografólido, el tratamiento con IFN- $\beta$  mostró una reducción más significativa en el promedio de las puntuaciones clínicas. Nuestros resultados muestran un efecto beneficioso claro del andrografólido sobre el tratamiento de IFN- $\beta$ , cuando se administra durante la fase activa de la enfermedad (días 16-31), lo que reduce los signos clínicos de la EAE crónica en los ratones después de la inmunización con MOG. Los andrografólidos potencian el efecto del interferón beta y por lo tanto son una herramienta terapéutica en la EM y enfermedades desmielinizantes más fuerte que el interferón beta solo.

Debido a que el andrografólido puede modular varios factores de transcripción o vías de señalización, que implican procesos inflamatorios y la activación de las células T, el andrografólido junto con formulaciones de IFN- $\beta$  podría ser un tratamiento útil para la EM.

#### Definiciones

Una "cantidad eficaz" se refiere a una cantidad de los ingredientes activos que es suficiente para afectar el curso y la gravedad de la enfermedad, conduciendo a la reducción o remisión de dicha patología. La cantidad eficaz puede ser determinada fácilmente por un experto en la técnica y dependerá de la vía de administración, el peso, la edad y la condición del paciente, y el objetivo de la administración (objetivo terapéutico, profiláctico o de diagnóstico).

El término "interferón", como se usa en la presente solicitud de patente, pretende incluir cualquier molécula definida como tal en la bibliografía, que comprende, por ejemplo, cualquier tipo de IFNs mencionados en la sección anterior "Antecedentes de la invención". En particular, cualquier tipo de IFN-alfa, IFN-beta e IFN-gamma se incluye en la definición anterior. IFN-beta es el IFN según la presente invención.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden comprender IFN- $\beta$  de origen natural, nativo, mutante, sintético o recombinante.

El término "interferón-beta (IFN-beta)", como se usa en este documento, incluye interferón de fibroblastos humanos, tal como se obtiene por aislamiento a partir de muestras biológicas o como se obtiene mediante técnicas de ADN recombinante a partir de células huésped procariontas o eucariotas así como sus sales, derivados funcionales, variantes, análogos y fragmentos.

"Derivados" tal como se usa en este documento abarca derivados que pueden ser cualquier compuesto purificado, que comprende preferiblemente de 90 a 100% del compuesto puro, y cualquier compuesto de Fórmula I. Las composiciones estandarizadas obtenidas a partir de *A. paniculata*, que contienen altas concentraciones de un compuesto de Fórmula I también se pueden considerar como compuesto(s) de Fórmula I tal como se utiliza en la presente invención.

Los compuestos de Fórmula I se preparan preferiblemente como compuestos purificados, que comprenden preferiblemente al menos aproximadamente 90% del compuesto puro, más preferiblemente al menos aproximadamente 98% del compuesto puro. También se puede utilizar un diluyente adecuado, permitiendo la reconstitución del producto a la concentración deseada antes de la administración de la dosis. Los compuestos de Fórmula I pueden prepararse como formas de dosificación farmacéutica acabadas de cualquier forma conocida, tal como una jeringa precargada, etc.

Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden comprender compuestos de Fórmula I purificados y/o una mezcla de compuestos de Fórmula I. La mezcla antes mencionada del compuesto(s) de Fórmula I puede ser mezclada sintéticamente o ser de origen natural.

"Diluyentes, estabilizantes, tampones, conservantes, solubilizantes, adyuvantes emulsionantes y/o vehículos farmacéuticamente aceptables" como se usa en el presente documento, significa que esos compuestos no

interfieren con la actividad biológica de los ingredientes activos y no son tóxicos para el huésped al que se administran.

5 En una forma de realización preferida, la composición farmacéutica de la invención comprenden entre 6 y 12 MUI de IFN-beta, y entre 50 y 500 mg de compuesto de Fórmula I. En una forma de realización más preferida, una composición farmacéutica de la invención comprende entre 6 y 12 MIU de IFN-beta, y entre 100 y 200 mg de compuesto de Fórmula I.

10 La administración de las composiciones farmacéuticas de la presente invención puede ser por vía intravenosa, intramuscular, subcutánea, o vía oral, o cualquier otra ruta que pueda establecer los niveles sanguíneos deseados de los compuestos activos. Por ejemplo, para la administración parenteral, las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden formularse como forma de dosificación unitaria para inyección en vehículos tales como agua estéril, solución salina, solución de dextrosa, albúmina de suero y/o solución de Ringer.

Las composiciones farmacéuticas de la invención son adecuadas para el tratamiento de EM y/o otras enfermedades desmielinizantes.

15 Las composiciones farmacéuticas de la invención están diseñadas para el uso simultáneo, separado o secuencial de sus ingredientes activos para la terapia especificada anteriormente.

20 La presente invención proporciona la composición farmacéutica según las reivindicaciones para uso en un método para tratar a un sujeto que sufre de EM y/o otra enfermedad desmielinizante, el método consiste en la administración de una composición farmacéutica de la invención al sujeto en una cantidad eficaz, por vía intravenosa, intramuscular, subcutánea o por vía oral cada día o cada otro día y durante un tiempo suficiente para producir la remielinización y para reducir la inflamación. En una forma de realización preferida, la cantidad eficaz de la composición farmacéutica comprende entre 6 y 12 MUI de IFN-beta y entre 1 y 5 mg/kg de peso corporal del compuesto de Fórmula I. En una forma de realización más preferida, la cantidad eficaz de la composición farmacéutica comprende entre 6 y 12 MUI de IFN-beta y 2 mg/kg de peso corporal del compuesto de Fórmula I. En una forma de realización preferida, la administración de la composición farmacéutica es durante un tiempo ilimitado.

25 La presente invención también proporciona la composición farmacéutica según las reivindicaciones para uso en un método para reducir la fatiga en un sujeto humano con una enfermedad desmielinizante, el método consiste en la administración de las composiciones farmacéuticas de la invención al sujeto en una cantidad eficaz cada día o cada dos días. En una forma de realización preferida, la cantidad eficaz de la composición farmacéutica comprende entre 6 y 12 MUI de IFN-beta y entre 1 y 5 mg/kg de peso corporal del compuesto de Fórmula I. En una forma de realización más preferida, la cantidad eficaz de la composición farmacéutica comprende entre 6 y 12 MUI de IFN-beta y 2 mg/kg de peso corporal del compuesto de Fórmula I. En una forma de realización preferida, la administración de la composición farmacéutica es durante un tiempo ilimitado. La presente invención ha sido descrita con referencia a las realizaciones preferidas.

### Breve descripción de los dibujos

35 Figura 1: Efecto de IFN- $\beta$  en la gravedad de la enfermedad en ratones con EAE. Los ratones fueron tratados diariamente con IFN- $\beta$  (1  $\mu$ g de IFN- $\beta$  en 200  $\mu$ l de PBS, administración intraperitoneal), al comienzo de la fase crónica (día 15 después de la inmunización) hasta 30 días después de la inmunización. Como control, los ratones C57BL/6J inmunizados con MOG fueron inyectados con PBS (vehículo).

40 Figura 2: Efecto de la terapia combinada en la gravedad de la enfermedad en ratones con EAE. Esta figura muestra dos grupos de ratones C57BL/6J inmunizados con MOG (150  $\mu$ g de péptido MOG; 500  $\mu$ g de MT; 200 ng de PT) tratados diariamente, o cada dos días con la terapia combinada (4 mg/kg de andrografólido y 1  $\mu$ g de IFN- $\beta$  al comienzo de la fase crónica (día 15 después de la inmunización) hasta el día 30 después de la inmunización. Como control, los ratones C57BL/6J inmunizados con MOG fueron inyectados con PBS (vehículo).

45 Figura 3: El infiltrado inflamatorio se reduce en la médula espinal en ratones con EAE tratados con la terapia combinada. Los ratones no inmunizados (NI) (panel izquierdo), y los ratones inmunizados con MOG con EAE tratados con o PBS (panel central) o terapia combinada (CT) (panel derecho) fueron perfundidos y fijados con p-formaldehído al 4%. Las médulas espinales se diseccionaron y se analizaron para infiltrado inflamatorio por tinción con hematoxilina-eosina. Los recuadros muestran un aumento mayor (10X). La fracción de área mononuclear se cuantificó en la médula espinal torácica usando 4 diferentes secciones separadas por 250  $\mu$ m. Los resultados se muestran como el promedio  $\pm$  SEM.

55 Figura 4: El infiltrado inflamatorio y la desmielinización se reducen en la médula espinal en ratones con EAE tratados con la terapia combinada. Los ratones no inmunizados (NI) (panel izquierdo), y los ratones inmunizados con MOG con EAE tratados o con PBS (panel central) o con la terapia combinada (CT) (panel derecho) fueron perfundidos y fijados con p-formaldehído al 4%. Las médulas espinales se diseccionaron y se analizaron para infiltrado inflamatorio por tinción con hematoxilina-eosina (H&E) y se evaluó la desmielinización con tinción de azul rápido de luxol (LFB). Los recuadros muestran un mayor aumento (10X). A: secciones de la médula espinal torácica representativas. B: aumentos de células infiltrantes y desmielinización.

Figura 5: Las células microgliales de los ratones con EAE tratados con la terapia combinada (CT) muestran un fenotipo de descanso. A: médulas espinales de ratones no inmunizados (NI) (panel izquierdo), ratones inmunizados con MOG con EAE tratados o con PBS (panel central) o con la terapia combinada (CT) (panel derecho) que se diseccionaron y analizaron para los macrófagos/microglia por inmunofluorescencia utilizando un anticuerpo anti-CD11b seguido de incubación con un anticuerpo secundario conjugado con Alexa-flúor 488 (verde). B: recuadros con aumento mayor (20X).

Figura 6:

Figura 7: Resultados del tratamiento con mono-terapia de andrografólido. El protocolo fue exactamente el mismo que para el modelo de EAE de EM como se describe para la mono-terapia con interferón (Figura 1) y para la terapia de combinación con andrografólido + interferón (Figuras 2 a 5). Se inyectó andrografólido 4 mg/día (sin acompañamiento de interferón) (intraperitonealmente) diariamente durante los días 16-31.

## Ejemplos

Los siguientes ejemplos ilustran la invención en detalle.

Ejemplo 1: Ratones con encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE) inducida, administrados con la terapia combinada de andrografólido e interferón.

### Animales

Ratones C57BL/6 fueron adquiridos de laboratorios de ratones Jax® y alojados en el estabulario de la Universidad Católica Pontificia. El cuidado de los animales y el uso se realizó de acuerdo con los protocolos y directrices de uso de animales aprobados por el comité institucional para uso y cuidado de animales.

### Inducción de encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE) y tratamientos

Se indujo EAE por inmunización con glicoproteína del oligodendrocito de mielina (MOG) de péptido 35-55 (MEVGWYRSPFSRVVHLYR) o proteína proteolipídica (PLP) 139-151 (HSLGKWLGHDPKF; CPC Scientific, Sunnyvale, CA, Estados Unidos) emulsionada en 1,5 mg/ml de PBS con una cantidad igual de adyuvante de Freund incompleto (IFA; DIFCO, MI, Estados Unidos) suplementada con 2,5 mg/ml de Mycobacterium tuberculosis cepa H37Ra (Difco, Detroit, MI). Los ratones fueron inmunizados por vía subcutánea con 200 µl de emulsión. Se inyectó Toxina Pertussis (LIST BIOLOGICAL LABS, CA, Estados Unidos), 200 ng en 200 µl de PBS, por vía intraperitoneal el día 0 y 2 después de la inmunización inicial.

Los animales fueron puntuados en cuanto a los síntomas clínicos de la siguiente manera: 0 = no hay signos de enfermedad; 1 = pérdida de tono de la cola; 2 = cola flácida; 3 = parálisis parcial de las extremidades posteriores; 4 = parálisis completa de las extremidades posteriores; 5 = animal moribundo se requiere sacrificar el animal; 6 = muerte.

Para los ensayos de IFN-beta, se administró intraperitonealmente a ratones C57BL/6 1 µg de IFN-β (IFN-β Reβif 88 µg/ml SORONO MERCK) en 200 µl de PBS. Los ratones de control fueron inyectados con 200 µl de PBS.

IFN-β se administró desde el día 15 al 30 después de la inmunización, todos los días.

Para los ensayos de terapia combinada (CT), se administró por vía intraperitoneal a ratones C57BL/6, 4 mg/kg de andrografólido y 1 µg de IFN-β en 200 µl de PBS. Los ratones de control fueron inyectados con 200 µl de PBS.

La terapia combinada (CT) se administró desde el día 15 al 30 después de la inmunización, ya sea diariamente o cada dos días. Al día 36 se sacrificaron todos los animales. La puntuación clínica fue registrada, y la médula espinal se recogió para su análisis histológico.

### Preparación histológica

Los ratones fueron profundamente anestesiados con isoflurano y perfundidos a través del músculo cardiaco con 1 x PBS (25 ml) enfriado con hielo, seguido por 4% de p-formaldehído. Las médulas espinales se diseccionaron y se fijaron posteriormente en 4% PFA durante la noche a 4° C. El tejido se crioprotegió en 30% (p/v) de sacarosa a 4° C durante la noche, fue embebido en compuesto de OCT, congelado y seccionado con un criostato a un espesor de 20 µm.

### Infiltrado inflamatorio de médula espinal

Para evaluar el infiltrado inflamatorio, se llevó a cabo la tinción con eosina hematoxilina (H & E). Las secciones de la médula espinal torácica se tiñeron con una solución de hematoxilina modificada por Gill (SIGMA, Estados Unidos), y con eosina Y (SIGMA, Estados Unidos). La infiltración de células mononucleares se determinó como el área ocupada por núcleos positivos en la periferia de la médula espinal de 4 secciones diferentes.

Tinción de mielina de la médula espinal

5 Para evaluar la desmielinización en la médula espinal de EAE, se llevó a cabo la tinción con azul rápido de luxol (LFB). Las secciones de médula espinal torácica fueron teñidas con LFB (SIGMA, Estados Unidos), y los núcleos de neuronas fueron teñidos con violeta de cresilo. La desmielinización se evaluó como el área libre de tinción LFB en la materia blanca de la médula espinal.

Inmunohistoquímica

10 Secciones de la médula espinal (20 mm) fueron tratadas con una solución de permeabilización/bloqueo que contenía 10% de FCS, 1% de glicina y 0,05% de Triton X-100 (Sigma-Aldrich). El anticuerpo primario de rata anti CD11b (1: 200; BD, Estados Unidos) en solución de bloqueo se aplicó O.N. en una cámara de humidificación a 4° C. El anticuerpo secundario de carnero anti rata conjugado con fluoresceína (Millipore, Estados Unidos) se aplicó durante 1 hora a temperatura ambiente.

Gravedad de la enfermedad en ratones con EAE tratados con IFN-β (Figura 1) y terapia combinada (CT) (Figura 2)

15 Tres grupos de ratones C57BL/6J inmunizados con MOG (150 µg de péptido de MOG; 500 µg MT; 200 ng PT) fueron tratados diariamente con IFN-β (1 µg de IFN-β (IFN β Rebif 88 µg/ml MERCK SORONO) en 200 µl de PBS, vía intraperitoneal), diariamente o en días alternos con terapia combinada (CT) (4 mg/kg andrografólido más IFN-β 1 µg) en el comienzo de la fase crónica (día 15 después de la inmunización) hasta el día 30 después de la inmunización. Como controles ratones C57BL/6J inmunizados con MOG fueron inyectados con PBS (vehículo). En el día 36 después de la inyección todos los ratones fueron sacrificados (puntuaciones: PBS = 2,4; CT diaria = 0,17; CT días alternos = 0,75) y se procesaron para análisis histológico.

20 La terapia combinada disminuye significativamente los síntomas clínicos en el modelo en ratón de la EAE crónica. La comparación de las Figuras 1 y 2, demostró que la adición de un compuesto de Fórmula I provoca un efecto sinérgico con el interferón.

El infiltrado inflamatorio se reduce en la médula espinal con la terapia combinada en ratones con EAE tratados (Figura 3)

25 Ratones no inmunizados (NI) (panel izquierdo), ratones inmunizados con MOG tratados o con PBS (panel central) o tratados con terapia combinada (CT) (panel derecho) fueron perfundidos y fijados con p-formaldehído al 4%. Las médulas espinales fueron diseccionadas y analizadas por infiltrado inflamatorio por tinción con hematoxilina-eosina. Los recuadros muestran un aumento mayor (10X). La fracción de área mononuclear se cuantificó en la médula espinal torácica usando 4 secciones diferentes separadas por 250 µm. Los resultados se muestran como media ± SEM.

30 Resultado: la terapia combinada disminuye la infiltración de células de la médula espinal en el modelo de EAE crónica de ratón.

El infiltrado inflamatorio y la desmielinización se reducen en la médula espinal con la terapia combinada en los ratones con EAE tratados (Figura 4).

35 Ratones no inmunizados (NI) (panel izquierdo), y ratones inmunizados con MOG tratados o con PBS (panel central), o con la terapia combinada (CT) (panel derecho) fueron perfundidos y fijados con p-formaldehído al 4%. Las médulas espinales se diseccionaron y se analizaron por infiltrado inflamatorio con tinción de hematoxilina-eosina (H&E) y la desmielinización fue evaluada por tinción de azul rápido de luxol (LFB). Los recuadros muestran una magnificación mayor (10X). A muestra las secciones de la médula espinal torácica representativas. B muestra aumentos de células infiltrantes y desmielinización.

40 Resultado: la terapia combinada disminuye la infiltración de células de la médula espinal y la desmielinización en el modelo en ratón de EAE crónica.

Las células microgliales de ratones de terapia combinada (CT) mostraron un fenotipo de descanso (Figura 5).

45 El panel A muestra las médulas espinales de ratones no inmunizados (NI) (panel izquierdo), y las de ratones inmunizados con MOG tratados con PBS (panel central) o con la terapia combinada (CT) (panel derecho) que se diseccionaron y se analizaron para macrófagos/microglia por inmunofluorescencia utilizando un anticuerpo anti-CD11b seguido de incubación con Alexa Fluóor 488-anticuerpo secundario conjugado(verde). El panel B muestra recuadros con un aumento mayor (20X).

50 Resultado: las células CD11b+ mostraron procesos largos en comparación con las células microgliales de control que exhiben procesos cortos y ramificados. La terapia combinada podría estar previniendo la infiltración de macrófagos, la activación de la micro glía o ambos.

Ejemplo 2: Pacientes de esclerosis múltiple (EM) humana

Pacientes de EM que reciben andrografólido solamente

Materiales y métodos

Sujetos - Pacientes

- 5 Ocho pacientes con EM que no estaban recibiendo ningún tratamiento farmacológico ordinaria previo, algunos debido a razones clínicas o restricciones económicas (por ejemplo, la falta de acceso financiero a los medicamentos de interferón disponibles en el mercado) y otras, o ambas cosas.

Producto andrografólido

- 10 El andrografólido se obtuvo como un extracto estandarizado de *Andrographis paniculata*, purificado, estandarizado para la pureza y seco, comercialmente disponible de HP Ingredients, Inc., Bradenton, Florida, Estados Unidos, conforme a una especificación de pureza de  $\geq 35,0\%$  (p/p) de andrografólido. El material utilizado en el ensayo descrito en este documento tenía un ensayo de identidad actual de un contenido por HPLC de 47,2% (p/p) de andrografólido, 2,1% (p/p) de neoandrografólido y 3,0% (p/p) de 14-deoxiandrografólido. (Todas las medidas de masa se refieren al producto seco sin disolvente.)

- 15 Régimen de tratamiento

Todos los ocho pacientes fueron colocados en un régimen de tratamiento no ciego de 42-meses de ingesta diaria (per os) a una dosis de 2 mg de andrografólido por kilogramo de peso corporal, 0,15 mg de neoandrografólido por kilogramo de peso corporal y 0,2 mg de deoxiandrografólido por kilogramo de peso corporal.

Resultados:

- 20 Seguridad y tolerabilidad

Después de 42 meses de tratamiento, ninguna intolerancia, interacciones adversas o reacciones al producto de prueba se han reportado u observado por ninguno de los pacientes ni los médicos a cargo. A diferencia de lo que normalmente se espera durante el tratamiento con interferón beta, ninguno de los pacientes tratados con andrografólido reportaron efectos secundarios similares a la gripe.

- 25 Ningún paciente mostró una recaída de la esclerosis múltiple durante los 42 meses de tratamiento, tal como se mide por los controles clínicos y de neuro imagen.

Todos los pacientes mostraron una cierta recuperación funcional parcial de la sensibilidad y neuromotricidad. En varios pacientes, la magnitud de esta recuperación fue clínicamente significativa.

Resultados clínicos

- 30 1. Todos los pacientes informaron de algún grado de control sintomático del dolor, fatiga, espasticidad y la mejora del estado de ánimo, ya apreciable a los cuatro meses de terapia, pero el efecto fue significativamente menor que el grupo que recibió la terapia combinada (andrografólido combinado con interferón)

- 35 2. Dos pacientes con enfermedad activa previamente muy larga (21 y 17 años desde el inicio, respectivamente) presentaron un episodio temprano de recaída (dentro de las primeras sesenta semanas después de iniciado el tratamiento), pero los síntomas han sido muy breves y leves, y no han requerido tratamiento inmunosupresor adicional como había sucedido antes.

3. Un paciente en remisión clínica completa, libre de síntomas o nuevas lesiones de neuro imagen tras más de tres años, continúa solamente con la monoterapia.

- 40 4. Parcial mejora de la funcionalidad focal en 2 de los ocho pacientes, tales como problemas del habla (disartria) y la visión en el mes 6; deglución (disfagia neurológica) y motricidad fina (recuperando la escritura, autoalimentación e higiene) entre 12-14 meses.

5. Uno de los ocho pacientes mejoró en la funcionalidad dispersa tal como la fatiga, fuerza de las piernas, coordinación y equilibrio caminando al mes seis, con un progreso sostenido hasta ahora.

- 45 6. Dos pacientes, quienes previo al tratamiento no eran capaces de ponerse en pie o subir las escaleras, han comenzado el desplazamiento antigraedad en el mes 30, empezando la percepción de la recuperación inicial de este deterioro entre los cuatro y seis meses de monoterapia.

7. Ningún cambio en el número y tamaño de las lesiones desmielinizantes en el cerebro total, medido por resonancia magnética de imagen (RMI)

8. Cierta grado de reducción de la actividad inflamatoria de lesiones desmielinizantes en comparación con el tiempo 0 tal como se mide por captación del medio de contraste de gadolinio por resonancia magnética de imagen y la de 42 meses aún está pendiente).

Pacientes de EM que recibieron interferón beta solamente

5 Materiales y Métodos:

Sujetos - Pacientes

Diez pacientes con EM diagnosticados con el tipo remitente recurrente de la enfermedad.

Resultados:

Seguridad y tolerabilidad

10 1 - Completa seguridad y tolerabilidad en todos los pacientes después de 12 meses (en curso) de un interferón beta en monoterapia (o Interferón beta-1a (IFN $\beta$ -1a) Avonex(r) 30  $\mu$ g/semana (im), Interferón beta-1a (IFN $\beta$ -1a) Rebif(r) 22  $\mu$ g o 44  $\mu$ g/3 veces a la semana (sc))

Interferón beta-1b (IFN $\beta$ -1b) Betaferon(r)/Betaseron(r) siguiendo las instrucciones del médico. Cierta grado de reacciones adversas al producto de prueba se han reportado u observado por estos pacientes o médicos.

15 2. No ha habido recaídas durante los 12 meses de tratamiento, tal como se mide por controles clínicos y de neuro imagen.

3. Aparición de síntomas parecidos a la gripe, tales como dolores, fiebre, escalofríos, sudoración o dolor de cabeza en 6 de 8 pacientes algunos de las cuales requirieron el uso de aspirina o ibuprofeno.

4. Dos pacientes informaron de depresión leve en el cuarto mes durante el tratamiento.

20 Resultados clínicos

1. Todos los pacientes informaron de ningún grado de control sintomático de la fatiga y mejora del estado de ánimo, como se vio en el grupo con ANG o que reciben la terapia combinada (ANF+INF).

2. Ningún paciente presentó episodios de recaída (dentro del primer año de tratamiento).

25 3. Ningún paciente mostró signos clínicos de bienestar subjetivo, a pesar de la aparición de nuevas lesiones de neuro imagen.

4. No hubo ninguna mejoría en el deterioro del discurso (disartria) y de visión ni de deglución (disfagia neurológica) y de motricidad fina.

5. No hubo ningún efecto sobre el desplazamiento antigraedad.

30 6. No hubo ningún cambio en el número total y tamaño de las lesiones desmielinizantes en el cerebro, medido por resonancia magnética de imagen (RMI)

7. Hubo cierta grado de reducción de la actividad inflamatoria de las lesiones desmielinizantes en comparación con el tiempo 0, como se mide por la captación del medio de contraste gadolinio en RMI y el tiempo de 12 meses está aún pendiente.

Terapia combinada (andrografólido e interferón).

35 Materiales y Métodos:

Pacientes que ya recibían tratamiento de primera línea utilizando interferón beta (IFN- $\beta$ ) fueron reclutados para recibir terapia de combinación adicional de comprimidos orales que contenían 55 mg de andrografólido, dos veces al día durante 60 meses. De los pacientes reclutados, tres han hasta la fecha completado el periodo de 60 meses de tratamiento.

40 Resultados:

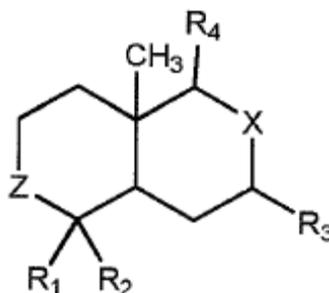
1. Completa seguridad y tolerabilidad en todos los pacientes después de 60 meses de la ingesta oral diaria de 2 mg/kg de andrografólidos, asociado con interferón en terapia combinada

2. No ha habido recaídas durante los 60 meses, según lo observado por el seguimiento clínico y de neuro imagen.

3. Efecto sinérgico sintomático temprano de la CT sobre la fatiga, fuerza y equilibrio cuando los comprimidos de andrografólido se administran junto con interferón, como se observa entre 2-3 meses de la administración de un compuesto de Fórmula 1.
- 5 4. Recuperación parcial, pero en algunos casos recuperación funcional significativa de la sensibilidad y neuromotricidad, observada entre los 24 y 30 meses con la terapia combinada (CT)
5. Regresión significativa de las lesiones neurológicas, medidas por control de neuroimágenes entre los 14 y 24 meses con terapia combinada (CT)
6. Todos los pacientes reportaron control sintomático total del dolor, fatiga, espasticidad y mejora del estado de ánimo, ya apreciable a los cuatro meses de la terapia CT.
- 10 7. Pacientes, que recibieron comprimidos de andrografólido más interferón (terapia combinada), respondieron con un efecto más temprano y mayor en la mejora de la fatiga y la motricidad
8. Mejora en la funcionalidad focal, tal como problemas del discurso (disartria) y la visión, deglución (disfagia neurológica grave) y motricidad fina (recuperación de la escritura, comer por si mismo y auto higiene) entre 12-14 meses de la CT.
- 15 9. Mejora de la funcionalidad dispersa como la fatiga, fuerza de las piernas, coordinación y equilibrio caminando con la CT.
10. Desplazamiento antigraedad en el mes 30, a partir de la percepción de la recuperación inicial de este deterioro entre cuatro y seis meses con TC.
- 20 11. Reducción significativa del tamaño y número de lesiones desmielinizantes en la materia blanca del cerebro con la CT.
12. Reducción de la actividad inflamatoria de las lesiones desmielinizantes, medida por la captación del medio de contraste de gadolinio de RMI con la TC.
- 25 Dada nuestra divulgación en este documento, el técnico en la materia puede derivar fácilmente variaciones de la misma. Por ejemplo, puede aumentar la dosis de andrografólido, o sustituir un compuesto de la Fórmula 1 por otro, para lograr un efecto similar. Nosotros intentamos así que la cobertura legal de nuestra patente sea definida no por nuestros ejemplos específicos mostrados en este documento, sino por nuestras reivindicaciones legales anexadas.

## REIVINDICACIONES

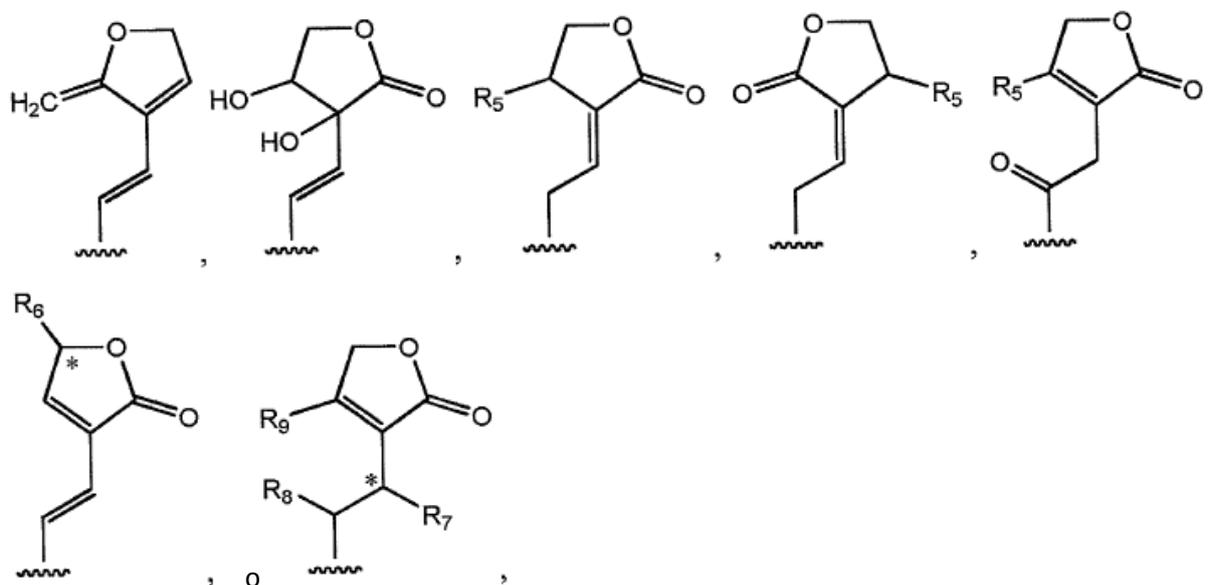
1. Un compuesto de la Fórmula I:



(I)

en donde

- 5 R<sub>1</sub> se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo o hidroxilo,  
 R<sub>2</sub> se selecciona del grupo que consiste en hidroxialquilo o alquil-O-L<sub>1</sub>, en donde L<sub>1</sub> es un resto de carbohidrato,  
 R<sub>3</sub> se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno o hidroxilo,  
 X se selecciona del grupo que consiste en C(=CH<sub>2</sub>), CH(OH), o un resto de espirooxirano-2.  
 Z se selecciona del grupo que consiste en CH<sub>2</sub>, CH(OH) o C(=O), y
- 10 R<sub>4</sub> se selecciona del grupo que consiste en un L<sub>2</sub>-alquilo o L<sub>2</sub>-alquenilo opcionalmente sustituidos, en donde L<sub>2</sub> es un resto 3-furanilo opcionalmente sustituido o un resto 3-fur-3-enil opcionalmente sustituido,  
 o una sal, éster, éter o profármaco farmacéuticamente aceptable del mismo, para uso en el tratamiento de una enfermedad desmielinizante en un paciente humano en donde dicha enfermedad desmielinizante comprende la esclerosis múltiple y donde dicho paciente humano es tratado con interferón beta.
- 15 2. El compuesto para uso según la reivindicación 1, en donde R<sub>1</sub> es metilo.  
 3. El compuesto para uso según la reivindicación 1, en donde R<sub>2</sub> se selecciona del grupo que consiste en: hidroximetilo y CH<sub>2</sub>-O-Glc; en donde Glc es un resto de glucosa que forma un glicósido.  
 4. El compuesto para uso según la reivindicación 1, en donde R<sub>4</sub> se selecciona del grupo que consiste en: 3-(3-furanil)-propilo, 3-(3-furanil)-prop-1-enilo, 3-(3-furanil)-prop-2-enilo, 3-(3-fur-3-enil)-propilo o 3-(3-fur-3-enil)-prop-1-enilo; dichos restos 3-furanilo o 3-fur-3-enilo opcionalmente adicionalmente sustituidos.  
 20 5. El compuesto para uso según la reivindicación 1, en el que R<sub>4</sub> se selecciona del grupo que consiste en:



en donde,

R<sub>5</sub> se selecciona del grupo que consiste en: hidrógeno e hidroxilo;

5 R<sub>6</sub> y R<sub>7</sub> se seleccionan independientemente del grupo que consiste en: hidrógeno, hidroxilo y alquiloxi; o R<sub>6</sub> y R<sub>7</sub> se reemplazan simultáneamente por un único enlace directo entre los átomos de carbono denotados por \*, formando así un dímero de dos moléculas de monómero de fórmula (I), y

R<sub>8</sub> y R<sub>9</sub> se seleccionan independientemente del grupo que consiste en: hidrógeno, hidroxilo y alquiloxi.

6 El compuesto para uso según la reivindicación 5, en donde R<sub>6</sub>, R<sub>7</sub>, R<sub>8</sub>, o R<sub>9</sub> pueden ser independientemente metoxi.

10 7 El compuesto para uso según la reivindicación 1, en donde el compuesto de fórmula (I) se selecciona del grupo constituido por: andrografólido, neoandrografólido, 14-desoxiandrografólido, 14-desoxi-11,12-didehidroandrografólido, andrografísido, andrograpanina, 14-desoxi-11-oxo-andrografólido, 14-desoxi-11-hidroxi-andrografólido, 14-desoxi-12-hidroxi-andrografólido, 3,14-dideoxiandrografólido, 3-oxo-14-desoxiandrografólido, 8, 17-epoxi-14-desoxiandrografólido, 14-desoxi-17-beta-hidroxiandrografólido, 12-hidroxiandrografólido, 15

15 bisandrografólido A, 3-oxo-14-desoxi-11,12-didehidroandrografólido, 7-hidroxi-14-desoxiandrografólido, 15-metoxi-3, 19-dihidroxi-8(17),11,ent-labda-trien-16,15-ólido, andropanólido, 14-desoxi-12-metoxi-andrografólido, 14-epi-andrografólido, 19-hidroxi-ent-labda-8(17),13-dien-15,16-ólido, 3,13,14,19-tetrahidroxi-ent-Labda-8(17),11-dien-16,15-ólido, 3,19-dihidroxi-15-metoxi-ent-Labda-8(17),11,13-trien-16,15-ólido, y 3,19-dihidroxi-ent-Labda-8 (17),12-dien-16,15-ólido.

20 8 El compuesto para uso según la reivindicación 1, en donde el interferón se proporciona en una cantidad de al menos aproximadamente 6 MUI por mes y en donde el compuesto de Fórmula I se proporciona en una cantidad de al menos aproximadamente 50 mg por día.

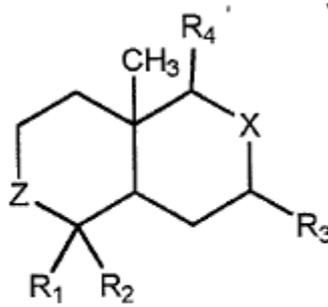
25 9 El compuesto para uso según la reivindicación 8, en donde el interferón se proporciona en una cantidad de aproximadamente 6 MUI a aproximadamente 12 MUI por mes y en donde el compuesto de Fórmula 1 se proporciona en una cantidad de aproximadamente 50 mg a aproximadamente 500 mg por día.

10 El compuesto para uso según la reivindicación 1, en donde el interferón y el compuesto de Fórmula 1 se proporcionan en una cantidad y durante un tiempo suficiente para producir la remielinización y para reducir la inflamación en dicho paciente humano.

30 11 El compuesto para uso según la reivindicación 8, en donde el compuesto de Fórmula 1 se proporciona en una cantidad de entre aproximadamente 1 mg a aproximadamente 5 mg por kilogramo de peso corporal de dicho paciente humano.

12 Un compuesto para uso para reducir la fatiga en un sujeto humano con enfermedad desmielinizante, el compuesto consiste en:

Un compuesto de fórmula I:



(I)

en donde

R<sub>1</sub> se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo o hidroxilo,

5 R<sub>2</sub> se selecciona del grupo que consiste en hidroxialquilo o alquil-O-L<sub>1</sub>, en donde L<sub>1</sub> es un resto de carbohidrato,

R<sub>3</sub> se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno o hidroxilo,

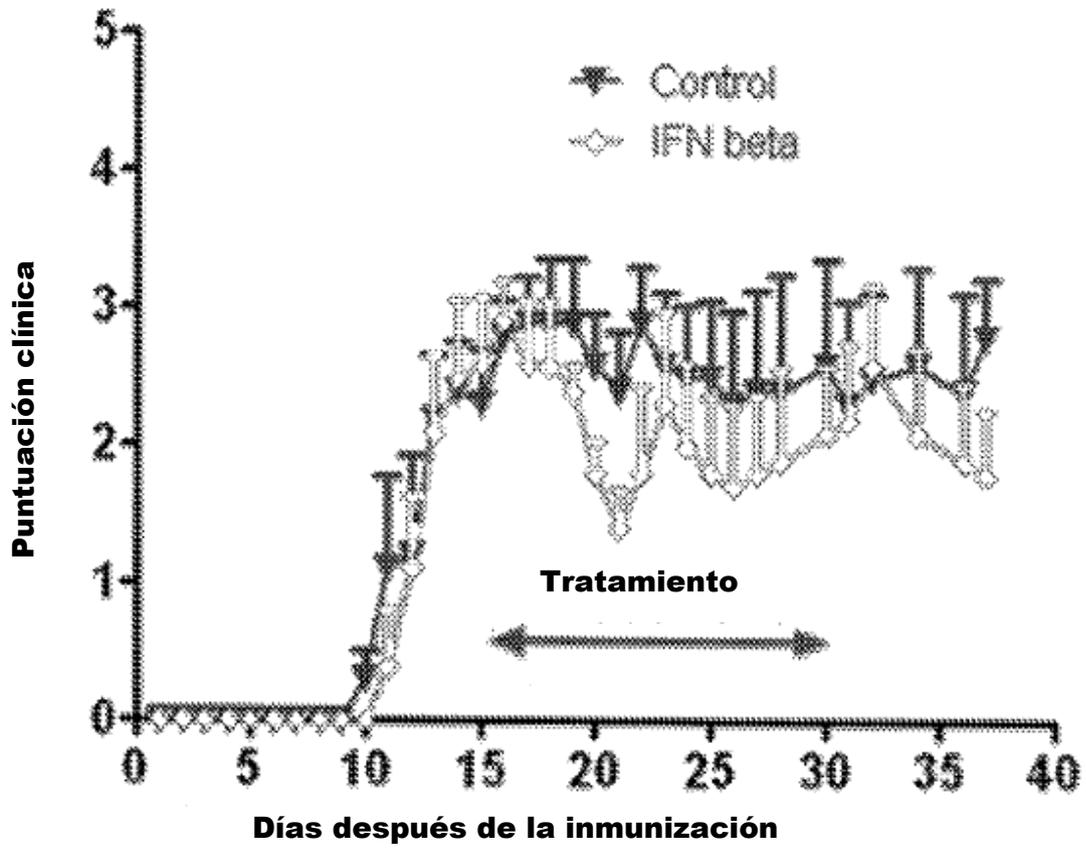
X se selecciona del grupo que consiste en C(=CH<sub>2</sub>), CH(OH), o un resto de espirooxirano-2.

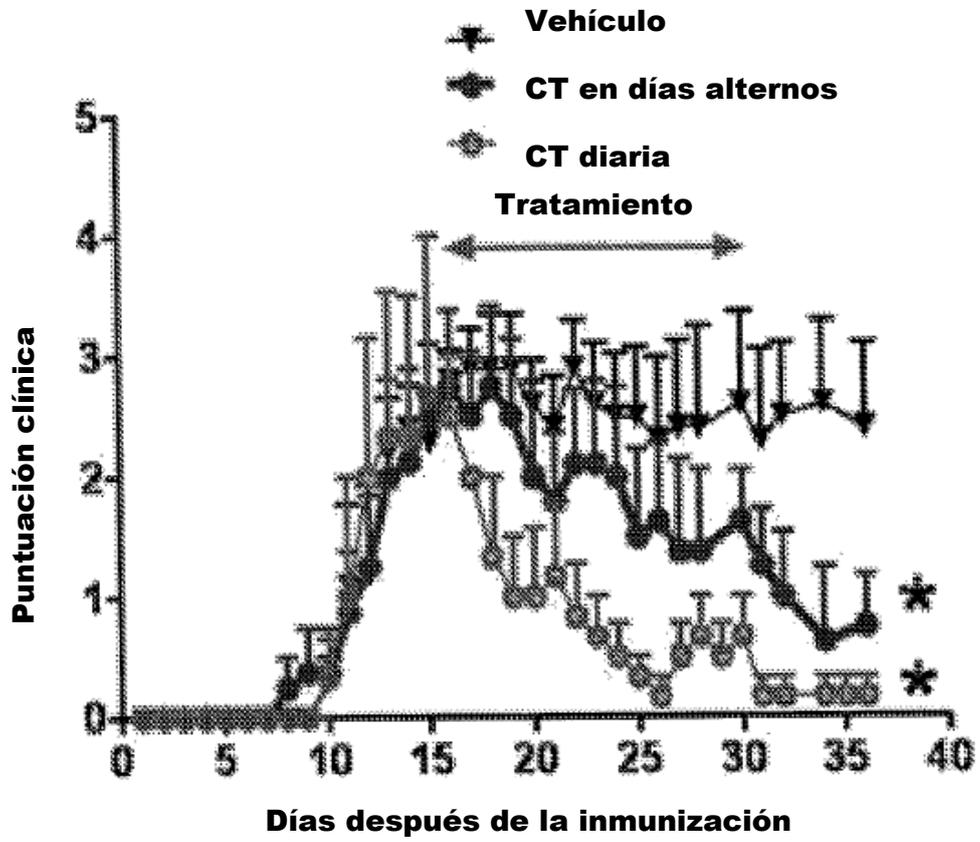
Z se selecciona del grupo que consiste en CH<sub>2</sub>, CH(OH) o C(=O), y

10 R<sub>4</sub> se selecciona del grupo que consiste en un L<sub>2</sub>-alquilo o L<sub>2</sub>-alquenilo opcionalmente sustituidos, en donde L<sub>2</sub> es un resto 3-furanilo o un resto 3-fur-3-enilo, opcionalmente sustituido,

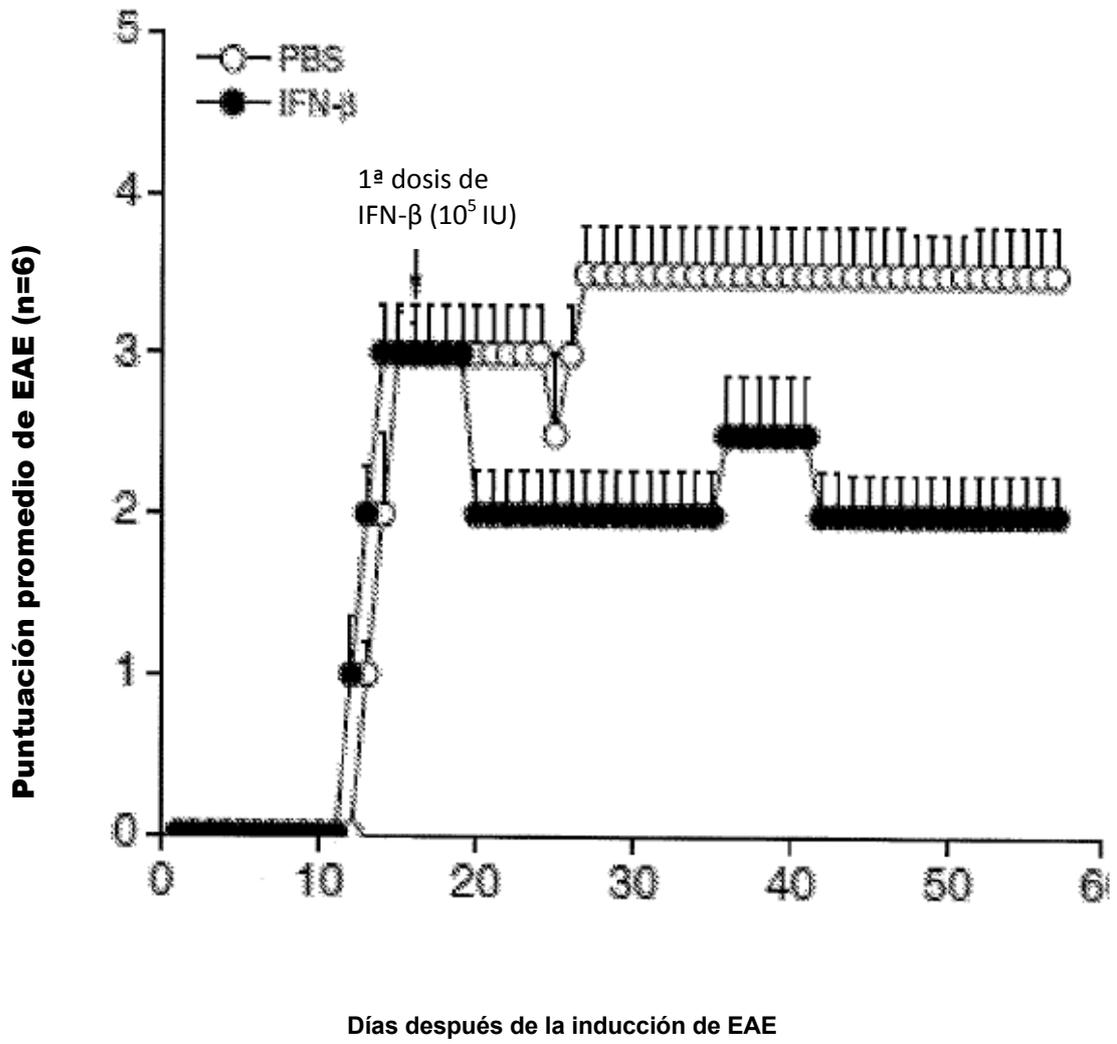
o una sal, éster o éter del mismo farmacéuticamente aceptable, dicho compuesto de Fórmula I se administra con interferón beta en una cantidad eficaz para reducir la fatiga, en donde la cantidad eficaz de interferón es de aproximadamente 6 MUI a aproximadamente 12 MUI de IFN-beta, y en donde la cantidad eficaz del compuesto de Fórmula I está entre aproximadamente 1 mg y aproximadamente 5 mg por kilogramo de peso corporal de dicho sujeto humano.

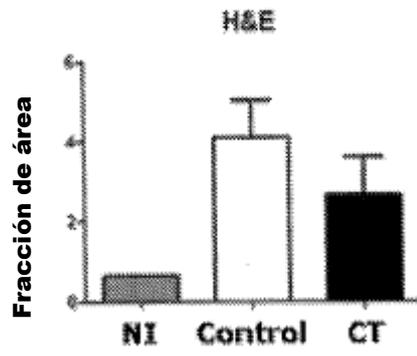
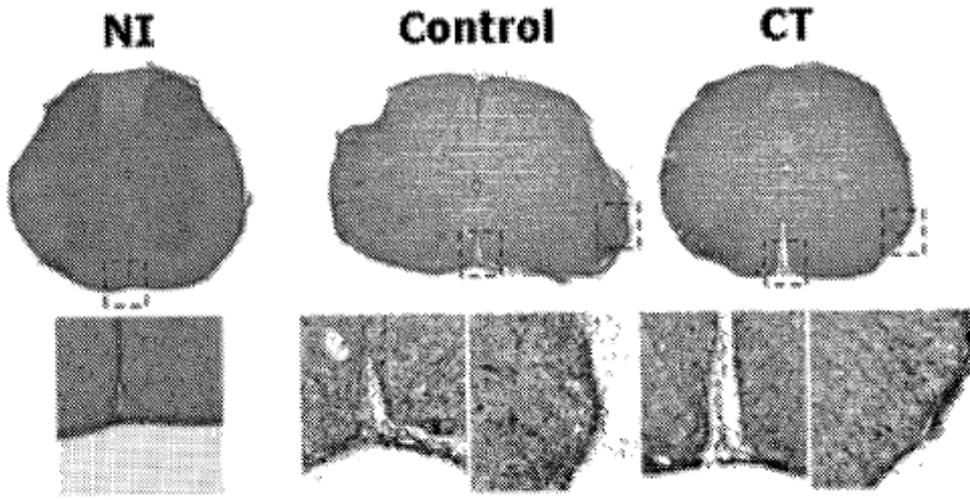
15

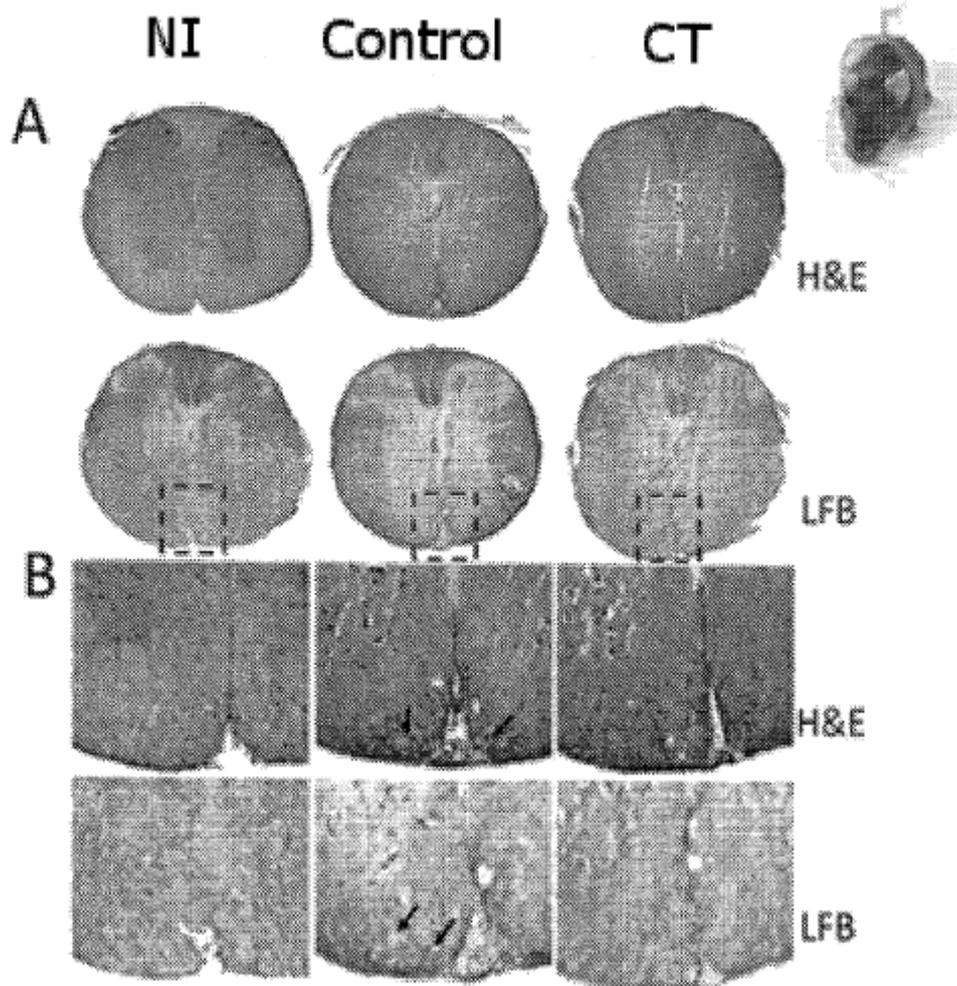


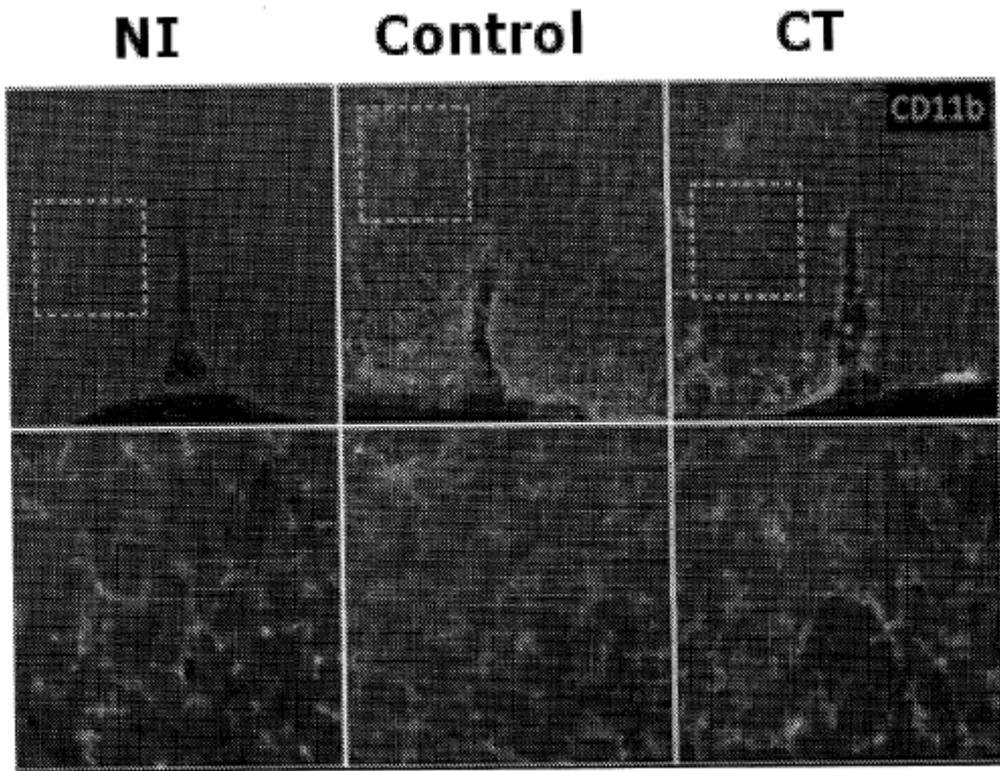


**C**

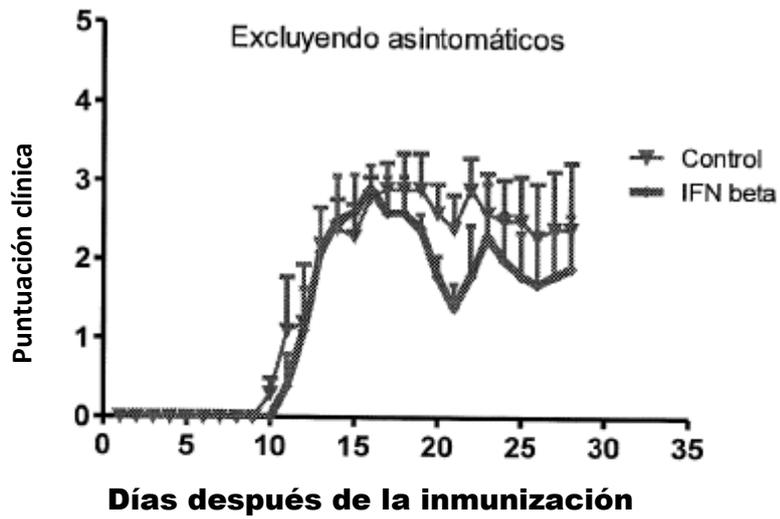




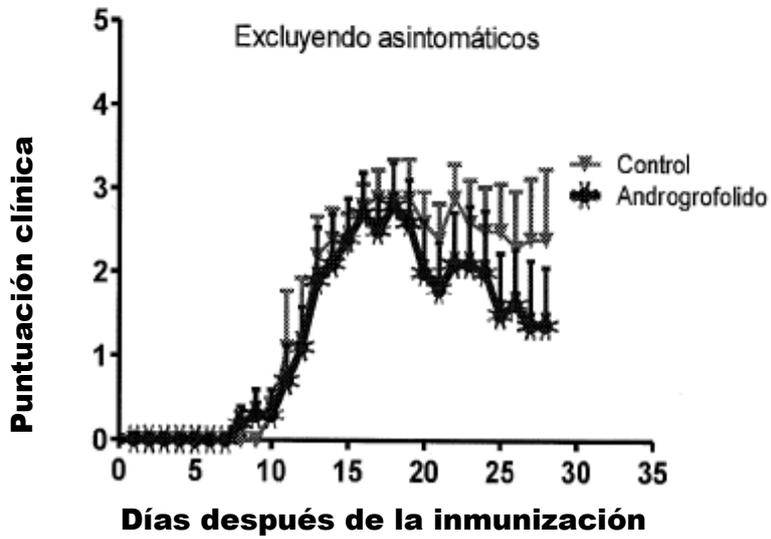




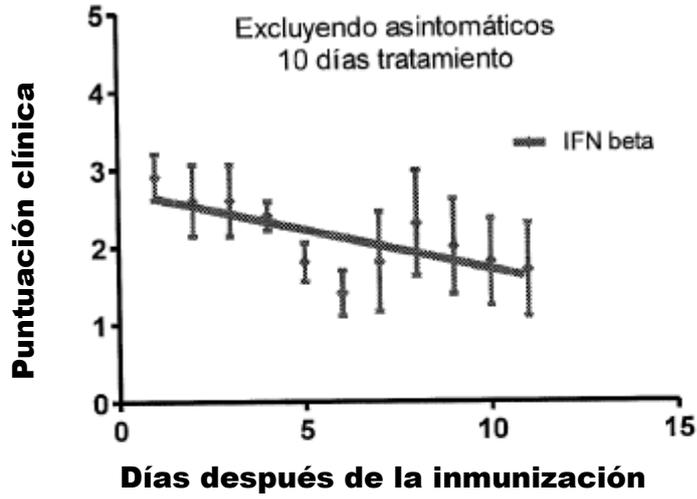
**Progresión de la enfermedad Tratamiento IFNbeta**



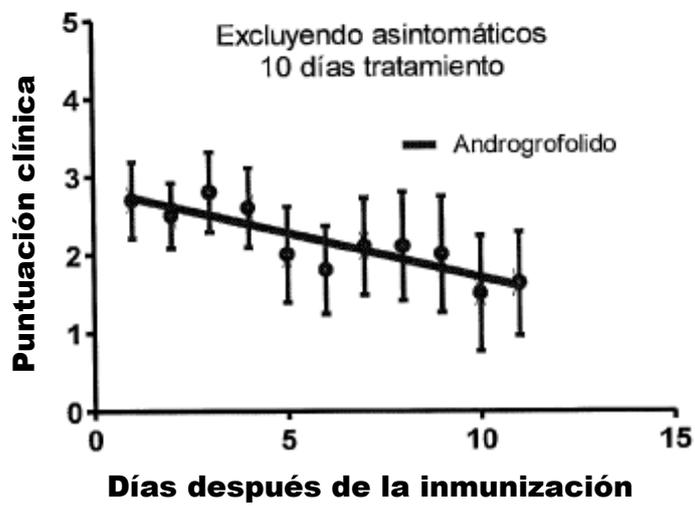
**Progresión de la enfermedad Tratamiento IFNbeta**



**Progresión de la enfermedad**



**Progreso de la enfermedad**



PBS	6	4
Andrografólido 4mg/kg		
IFN beta 1ug/dosis	5	

	Control	IFN beta	AG
n	5	5	4 a 5
X día 26	2,3	1,7	1,625
15-26 X	2,6	2,119	2,157
Mediana X	2,6	2	2,1
SUMA	29,3	23,31	23,73
Pendiente	-0,05091	-0,1022	-0,1141
Dvst	±0,041	±0,044	±0,054