

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 601 892**

51 Int. Cl.:

**A61P 25/28** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.04.2012 PCT/IL2012/050138**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.10.2012 WO12143924**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.04.2012 E 12774372 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.08.2016 EP 2699317**

54 Título: **Pentapolímero aleatorio para el tratamiento de enfermedades autoinmunes**

30 Prioridad:

**21.04.2011 US 201161477610 P**

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

**16.02.2017**

73 Titular/es:

**MAPI PHARMA LIMITED (100.0%)  
16 Einstein Street Weizmann Science Park, P.O.  
Box 4113  
74140 Ness Ziona, IL**

72 Inventor/es:

**MAROM, EHUD y  
RUBNOV, SHAI**

74 Agente/Representante:

**IZQUIERDO BLANCO, María Alicia**

**Observaciones :**

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques  
o Bemerkungen) en el folleto original publicado  
por la Oficina Europea de Patentes**

**ES 2 601 892 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).

**Pentapolímero aleatorio para el tratamiento de enfermedades autoinmunes****Descripción****5 CAMPO DE LA INVENCION**

La presente invención se refiere de manera general a un pentapolímero aleatorio lineal sintético que comprende alanina, ácido glutámico, lisina, tirosina y fenilalanina y el uso de las mismas para tratar enfermedades autoinmunes, en particular esclerosis múltiple.

10

**ANTECEDENTES DE LA INVENCION**

15

Un copolímero aleatorio básico sintético de alto peso molecular consistente de residuos de L-Alanina (L-Ala), ácido L-Glutámico (L-Glu), L-Lisina (L-Lys) y L-Tirosina (L-Tyr) en una proporción molar de alrededor de 6 partes de L-Ala a 2 partes de L-Glu a 4,5 partes de L-Lys a 1 parte de L-Tyr, y teniendo un peso molecular de 15000-25000, se describió primeramente en la Patente U.S. N° 3.849.550 como un agente para el tratamiento o prevención de encefalomiелitis alérgica experimental (EAE), una enfermedad parecida a la esclerosis múltiple (MS) que puede ser inducida en animales susceptibles. Los lotes de este copolímero de peso molecular medio de 23.000 Daltons (da), designado "Copolímero" 1 o "Cop" 1, demostraron ser altamente efectivos en proteger y suprimir la EAE en varias especies animales (Teitelbaum et al. 1971, Eur. J. Immunol. 1(4), 242-248; Teitelbaum et al. 1974, Clin. Immunol. Immunopathol. 3(2), 256-262; Teitelbaum et al. 1974, Israel J. Med. Sci. 13:1038).

20

25

Posteriormente, se descubrió que el Copolímero 1 reducía significativamente el número de recaídas en pacientes con la forma remitente exacerbada de la esclerosis múltiple (Bornstein et al. 1990, Handbook of Multiple Sclerosis, ed. Cook S.D. Marcel Dekker, Inc., p. 469; Sela et al. 1990, Bull. Inst. Pasteur (Paris) 88, 303-314; Johnson et al. 1994, MS. 11th Annual Meeting A.N.A.). El Copolímero 1, en la forma de sales de acetato de polipéptidos sintéticos que contienen L-Glu, L-Ala, L-Tyr y L-Lys con una fracción molar media de 0,141, 0,427, 0,095 y 0,338, respectivamente, es el ingrediente activo del COPAXONE®, un medicamento para el tratamiento de la esclerosis múltiple. COPAXONE® es el nombre comercial registrado para el acetato de glatiramer. Químicamente, el acetato de glatiramer o Copolímero 1 se designa polímero de L-Glu con L-Ala, L-Lys, y L-Tyr, sal de acetato, y su fórmula estructural es:

30



35



40

El efecto del Copolímero 1 en el tratamiento de la esclerosis múltiple está en el logro de la supresión o desactivación de la reactividad de las células T a antígenos de mielina en pacientes con esclerosis múltiple. Con este propósito, el Copolímero 1 se administra sin adyuvantes por inyección subcutánea diaria.

45

El Copolímero 1 se diseñó originalmente para imitar la proteína básica de la mielina (MBP) y para inducir la EAE, pero se descubrió que era no encefalitogénica e incluso suprimía la EAE inducida por MBP (Teitelbaum et al. 1971, Eur. J. Immunol. 1(4), 242-248), proteolipid protein (PLP) (Teitelbaum et al. 1996, J. Neuroimmunol. 64, 209-217), o la glicoproteína de oligodendrocitos (MOG) (Ben-Nun et al. 1996, J. Neurol. 243(4Supl), S14-22). Los mecanismos precisos por lo que el Copolímero 1 previene el desarrollo de la EAE y mejora la esclerosis múltiple (MS) no se conocen todavía. No obstante, han aparecido algunas propiedades inmunológicas importantes de este copolímero. Los estudios han demostrado reactividad cruzada parcial del Copolímero 1 con la MBP en tanto las células T (Webb et al. 1973, Immunol. Commun. 2(2), 185-192) como el nivel de anticuerpos (Teitelbaum et al. 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85(24), 9724-9728). El Copolímero 1 puede servir como un antagonista del receptor del antígeno de las células T para el epítipo inmunodominante de la MBP (Aharoni et al. 1988, J. Neuroimmunol. 91(1-2), 135-146). También puede enlazar con varias moléculas de clase II de MHC y prevenir que enlacen con las células T con propiedades de reconocimiento del antígeno específicas (Fridkis-Hareli et al. 1999, Int. Immunol. 11(5), 635-641).

50

55

Actualmente el COPAXONE® está aprobado para la reducción de la frecuencia de recaídas en pacientes con Esclerosis Múltiple con Recaída-Remisión (RRMS). La composición, su manera de fabricación y métodos de tratamiento usando la misma se describen en las Patentes U.S. N° 5.981.589; 6.054.430; 6.342.476; 6.362.161; 6.620.847; 6.939.539. Usos extensivos adicionales del Copolímero 1 y péptidos y polipéptidos relacionados así como células T tratadas con el mismo para terapia neuroprotectora se divulgan en numerosas publicaciones y patentes incluyendo la WO 01/93893, Patentes US N° 6.835.711 y 6.844.314, entre otras.

60

65

Recientemente, se ha descubierto que en modelos animales, el Copolímero 1 proporciona efectos beneficiosos en varios trastornos adicionales. Así, el Copolímero 1 suprime el rechazo inmune manifestado en la enfermedad injerto contra huésped (GVHD) en caso de trasplante de médula ósea (US 5.858.964), así como en el rechazo de injerto en el caso de trasplante de órganos sólidos (WO 00/27417).

La WO 01/52878 y la WO 01/93893 divulgan que el Copolímero 1 y los péptidos y polipéptidos relacionados así como las células T activadas por estos péptidos y polipéptidos protegen las células del sistema nervioso central (CNS) de la toxicidad del glutamato y evitan o inhiben la degeneración neuronal o promueven la regeneración nerviosa en el CNS y el sistema nervioso periférico (PNS). El Copolímero 1 también ha sido propuesto como un tratamiento para enfermedades neurodegenerativas como neuropatías ópticas y glaucoma. La WO 08/075365 divulga el uso de copolímeros aleatorios u ordenados incluyendo el Copolímero 1 para tratar, prevenir, retrasar o disminuir el deterioro relacionado con la edad de la función retinal.

El Copolímero 1 y los copolímeros y péptidos relacionados se han divulgado para tratar enfermedades autoinmunes distintas de la esclerosis múltiple en la WO 00/05250. La WO 00/27417 divulga composiciones y métodos para tratar y prevenir las respuestas inmunes huésped contra injerto y las enfermedades de injerto contra huésped que comprenden como un ingrediente activo el Copolímero 1 y heteropolímeros aleatorios relacionados con el Copolímero 1.

Hay una necesidad médica no satisfecha para nuevas composiciones para el tratamiento de enfermedades autoinmunes y, en particular, la esclerosis múltiple, con el perfil farmacológico deseado y pocos efectos secundarios.

### SUMARIO DE LA INVENCIÓN

La presente invención proporciona un polipéptido sintético que es un pentapolímero aleatorio o una sal del mismo, que comprende alanina, ácido glutámico, lisina, tirosina y fenilalanina, útil para el tratamiento de enfermedades autoinmunes y, en particular esclerosis múltiple (MS). El pentapolímero es un copolímero de alanina, ácido glutámico, lisina, tirosina y fenilalanina, que se polimerizan aleatoriamente en un polipéptido, formando de este modo un copolímero aleatorio, o una sal del mismo.

La presente invención se basa en parte en el descubrimiento inesperado de que el nuevo pentapolímero muestra biodisponibilidad oral inesperada, un perfil de liberación ventajoso cuando se formula en un sistema de administración de fármacos de depósito y actividad sinérgica ventajosa en enfermedades autoinmunes cuando se combina con un agente terapéutico adicional.

De acuerdo con un primer aspecto, la presente invención proporciona un pentapolímero o una sal del mismo, que es un copolímero aleatorio lineal de alanina, ácido glutámico, lisina, tirosina y fenilalanina.

De acuerdo con otro aspecto, la presente invención proporciona un pentapolímero o una sal del mismo, que es un copolímero lineal de alanina, ácido glutámico, lisina, tirosina y fenilalanina, polimerizados aleatoriamente en un polipéptido.

De acuerdo con otro aspecto, la presente invención proporciona un pentapolímero o una sal del mismo, el pentapolímero consistiendo esencialmente de alanina, ácido glutámico, lisina, tirosina y fenilalanina, polimerizados aleatoriamente en un polipéptido.

En otra realización, la presente invención proporciona un pentapolímero o una sal del mismo, el pentapolímero consistiendo de alanina, ácido glutámico, lisina, tirosina y fenilalanina, polimerizados aleatoriamente en un polipéptido.

En algunas realizaciones, la proporción molar de los aminoácidos en el pentapolímero es la siguiente; de alrededor de 2,0 a alrededor de 3,2 de alanina; de alrededor de 1,4 a alrededor de 2,0 de ácido glutámico; de alrededor de 4,4 a alrededor de 4,6 de lisina, de alrededor de 0,9 a alrededor de 1,1 de tirosina y de alrededor de 0,8 a alrededor de 1,2 de fenilalanina.

En una realización, el pentapolímero comprende alanina, ácido glutámico, lisina, tirosina y fenilalanina, en el que la proporción molar de alanina a ácido glutámico a lisina a tirosina a fenilalanina es de alrededor de 2,5 : 1,9 : 4,5 : 1,0 : 0,9, respectivamente.

En varias realizaciones de la presente invención, el pentapolímero comprende de alrededor de 15 a alrededor de 120 aminoácidos, por ejemplo de alrededor de 40 a alrededor de 80 aminoácidos de longitud, o de alrededor de 60 a alrededor de 100 aminoácidos de longitud. Cada posibilidad representa una realización separada de la presente invención.

En ciertas realizaciones, el peso molecular medio del pentapolímero de la invención puede estar en el intervalo de alrededor de 2.000 a alrededor de 20.000 Da. En otras realizaciones, el peso molecular medio del pentapolímero de la invención es de alrededor de 5.000 - 15.000. Da. En otras realizaciones, el peso molecular medio del pentapolímero de la invención es de alrededor de 5.000 - 10.000 Da.

El pentapolímero de la presente invención puede estar compuesto de aminoácidos L- o D- o mezclas de los mismos. Como es conocido por los expertos en la técnica, los aminoácidos L- se producen en la mayoría de las proteínas naturales. Sin embargo, los aminoácidos D- están comercialmente disponibles y pueden sustituirse por algunos o todos los aminoácidos usados para hacer el pentapolímero de la presente invención. La presente invención contempla un pentapolímero que contiene tanto los aminoácidos D- como L-, así como pentapolímeros que tienen aminoácidos o L- o D-.

La presente invención proporciona además una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva del pentapolímero de la invención y un portador farmacéuticamente aceptable.

En realizaciones adicionales, la composición farmacéutica puede administrarse por cualquier vía conveniente incluyendo, pero no limitada a, la vía parenteral por inyección subcutánea (SC), intravenosa (IV), intramuscular (IM), intradérmica (ID) e intraperitoneal (IP). Cada posibilidad representa una realización separada de la presente invención.

En una realización, la composición farmacéutica de la presente invención puede formularse para la administración oral.

En algunas realizaciones, la presente invención proporciona una composición farmacéutica de actuación prolongada que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva del pentapolímero de la presente invención en una forma de depósito adecuada para la administración en una localización médicamente aceptable en un sujeto con necesidad de ello. De acuerdo con estas realizaciones, la composición farmacéutica comprende además un portador biodegradable o no biodegradable farmacéuticamente aceptable seleccionado de PLGA, PLA, PGA, policaprolactona, polihidroxibutirato, poliortoésteres, anhídridos polialquenos, gelatina, colágeno, celulosa oxidada, y polifosfaceno, o cualquier combinación de los mismos. Cada posibilidad representa una realización separada de la presente invención.

El pentapolímero de la presente invención o una composición farmacéutica que comprende el mismo es útil para tratar una enfermedad autoinmune. En realizaciones particulares, la enfermedad tratada es una enfermedad autoinmune del sistema nervioso central. De acuerdo con estas realizaciones, la presente invención proporciona un método para tratar una enfermedad autoinmune que comprende administrar a un sujeto con necesidad de ello una cantidad efectiva de una composición farmacéutica que comprende un pentapolímero de la presente invención como un ingrediente activo. En otra realización, la presente invención se refiere al uso de un pentapolímero de acuerdo con la presente invención para el tratamiento de una enfermedad autoinmune. En otra realización, la presente invención se refiere al uso de un pentapolímero de acuerdo con la presente invención para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad autoinmune. En algunas realizaciones, el pentapolímero se administra en una formulación farmacéutica de actuación prolongada como se describe en la presente.

Las enfermedades autoinmunes dentro del alcance de la presente invención incluyen, pero no están limitadas a, esclerosis múltiple (incluyendo la esclerosis múltiple con Recaída-Remisión (RRMS)), anemia hemolítica autoinmune, ovaritis autoinmune, tiroiditis autoinmune, uveorretinitis autoinmune, enfermedad de Crohn, púrpura trombocitopénica inmune crónica, colitis, enfermedad de sensibilidad de contacto, diabetes mellitus, enfermedad de Graves, síndrome de Guillain-Barre de síndrome, enfermedad de Hashimoto, mixedema idiopático, miastenia grave, psoriasis, pénfigo vulgaris, artritis reumatoide, y lupus eritematoso sistémico. Cada posibilidad representa una realización separada de la presente invención. En realizaciones particulares, el pentapolímero de la presente invención es útil para tratar la esclerosis múltiple (MS). En algunas realizaciones actualmente preferidas, el pentapolímero de la presente invención es útil para tratar la esclerosis múltiple con Recaída-Remisión (RRMS)). de acuerdo con varias realizaciones de la presente invención, el pentapolímero puede usarse en terapia de combinación con al menos otro agente activo, como se describe en la presente.

Realizaciones adicionales y el alcance completo de aplicabilidad de la presente invención serán aparentes de la descripción detallada dada en la presente a continuación. Sin embargo, debe entenderse que la descripción detallada y los ejemplos específicos, aunque indican las realizaciones preferidas de la invención, se dan a modo de ilustración solamente, ya que varios cambios y modificaciones dentro del espíritu y alcance de la invención serán aparentes para los expertos en la técnica a partir de esta descripción detallada.

#### **DESCRIPCION DETALLADA DE LA INVENCION**

La presente invención se refiere a un pentapolímero o una sal de los mismos, que es un copolímero lineal de alanina, ácido glutámico, lisina, tirosina y fenilalanina. La presente invención se refiere además a composiciones farmacéuticas que comprenden el pentapolímero y el uso del mismo en el tratamiento de enfermedades autoinmunes y en particular en esclerosis múltiple (MS), por ejemplo MS con Recaída-Remisión (RRMS).

Como se usa en la presente, el término "pentapolímero" se refiere a un copolímero o polipéptido que está compuesto de los cinco aminoácidos alanina, ácido glutámico, lisina, tirosina y fenilalanina, en varias proporciones

como se describe en la presente.

Como se usan en la presente, los términos "copolímero aleatorio" o "polimerizado aleatoriamente en un polipéptido" se refieren a un copolímero o polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos aleatoria. Los copolímeros de la presente invención son copolímeros lineales.

En cualquiera de las realizaciones divulgadas, los pentapolímeros de la presente invención pueden estar en la forma de una sal farmacéuticamente aceptable, que puede ser una sal de adición de ácido en la que el ácido es un ácido orgánico o inorgánico. En una realización preferida, la sal es una sal de acetato. En otras realizaciones, las sales de adición de ácido incluyen, pero no están limitadas a, sales derivadas de ácidos clorhídrico, fluorhídrico, trifluoroacético, sulfúrico, fosfórico, succínico, cítrico, láctico, maleico, fumárico, palmítico, cólico, pamoico, mícico, D-glutámico, D-canfórico, glutárico, ftálico, tartárico, láurico, esteárico, salicílico, metanosulfónico, bencenosulfónico, sórbico, pícrico, benzoico, cinámico, y similares. Cada posibilidad representa una realización separada de la presente invención.

De acuerdo con los principios de la presente invención, el pentapolímero divulgado en la presente comprende de alrededor de 15 a alrededor de 120 aminoácidos. En una realización, el pentapolímero comprende de alrededor de 40 a alrededor de 80 aminoácidos de longitud. En otra realización, el pentapolímero comprende de alrededor de 60 a alrededor de 100 aminoácidos de longitud.

El pentapolímero es un copolímero aleatorio lineal de alanina, ácido glutámico, lisina, tirosina y fenilalanina. En otra realización, el copolímero es un copolímero lineal aleatorio que consiste esencialmente de alanina, ácido glutámico, lisina, tirosina y fenilalanina. En otra realización, el copolímero es un copolímero aleatorio lineal que consiste de alanina, ácido glutámico, lisina, tirosina y fenilalanina.

El peso molecular medio del pentapolímero de la invención es de alrededor de 2.000 - 20.000 Da. En algunas realizaciones, el peso molecular medio del pentapolímero es de alrededor de 5.000 -15.000 Da. En otras realizaciones, el peso molecular medio del pentapolímero es de alrededor de 5.000 - 10.000 Da. En otras realizaciones, el peso molecular medio del pentapolímero es de alrededor de 7.500 - 15.000 Da. En otras realizaciones, el peso molecular medio del pentapolímero es de alrededor de 7.500 - 10.000 Da.

El peso molecular del pentapolímero puede ajustarse durante la síntesis del polipéptido o después de que se ha preparado el pentapolímero. Para ajustar el peso molecular durante la síntesis del polipéptido, las condiciones sintéticas o las cantidades de aminoácidos se ajustan de tal manera que la síntesis para cuando el polipéptido alcanza la longitud aproximada deseada. Después de la síntesis, los polipéptidos con el peso molecular deseado pueden obtenerse por cualquier procedimiento de selección por tamaño disponible, como cromatografía de los polipéptidos en una columna o gel de dimensionamiento del peso molecular, y recolección de los intervalos de peso molecular deseados. El pentapolímero de la presente invención puede también hidrolizarse parcialmente para eliminar las especies con peso molecular alto, por ejemplo, por hidrólisis enzimática o de ácidos, y después purificarse para eliminar el ácido o enzimas. Alternativamente el tamaño deseado puede alcanzarse ajustando la cantidad de iniciador introducido.

El pentapolímero de la presente invención puede prepararse de acuerdo con métodos similares a los descritos en la bibliografía para la preparación del Copolímero 1 y péptidos relacionados, por ejemplo, U.S. 3.849.550, US 5.800.808, US 5.981.589, US 6.054.430, US 6.342.476, US 6.362.161, US 6.620.847, US 6.939.539 y EP 1799703.

Por ejemplo, el pentapolímero del peso molecular deseado puede prepararse polimerizando los N-carboxianhídridos de tirosina, alanina,  $\gamma$ -bencilglutamato, N-6-trifluoroacetilo lisina y fenilalanina a temperatura ambiente en un solvente y un iniciador para obtener un polipéptido protegido. Los iniciadores adecuados son nucleófilos como las aminas (preferiblemente aminas secundarias como dietilamina), alcoholes, agua, etc. El polipéptido protegido se hace reaccionar después con ácido bromhídrico que elimina el grupo protector de bencilo del 5-carboxilato del residuo de glutamato y escinde el polímero a polipéptidos más pequeños para formar un trifluoroacetil-polipéptido que tiene el perfil de peso molecular deseado. El tiempo necesario para obtener un polipéptido de un intervalo de peso molecular deseado dependerá típicamente de la temperatura de la reacción y el tamaño del polipéptido protegido. Así, en algunas realizaciones, la reacción se realiza durante un tiempo y una temperatura que se predetermina por una o más reacciones de prueba. Durante la reacción de prueba, el tiempo y la temperatura se varían y se determina el intervalo de peso molecular de un lote dado de los polipéptidos de prueba. Las condiciones de prueba que proporcionan el intervalo de peso molecular óptimo para el lote de polipéptidos se usan para el lote. Así, un trifluoroacetil-polipéptido que tiene el perfil de peso molecular deseado puede producirse por un proceso que incluye hacer reaccionar el polipéptido protegido con ácido bromhídrico durante un tiempo y a una temperatura predeterminada por la reacción de prueba. El trifluoroacetil-polipéptido con el perfil de peso molecular deseado se trata después adicionalmente con una solución de piperidina acuosa para formar un polipéptido desprotegido que tiene el peso molecular deseado.

La naturaleza del solvente usado para la reacción no es particularmente limitativo. Algunos ejemplos incluyen, pero no están limitados a hidrocarburos aromáticos como benceno, tolueno, y xileno; éteres como éter dietílico, MTBE, éter diisopropílico, tetrahidrofurano (THF), 1,4-dioxano, 1,2-dimetoxietano, y 1,2-dietoxietano; hidrocarburos halogenados como diclorometano, 1,2-dicloroetano, y cloroformo, N-dimetilformamida (DMF), N-metilpirrolidona (NMP), dimetil sulfóxido (DMSO), y cualquier mezcla de los mismos. Cada posibilidad representa una realización separada de la presente invención. El dioxano es un solvente actualmente preferido. En una realización preferida, una muestra de prueba de polipéptido protegido para un lote dado se hace reaccionar con ácido bromhídrico durante alrededor de 10-50 horas a una temperatura de alrededor de 20-28° C. Las mejores condiciones para ese lote se terminan ejecutando varias reacciones de prueba. Por ejemplo, en una realización, el polipéptido protegido se hace reaccionar con ácido bromhídrico durante alrededor de 17 horas a una temperatura de alrededor de 26° C.

El pentapolímero de la presente invención puede estar compuesto de aminoácidos L- o D- o una mezcla de aminoácidos L- y D-. Como es conocido por los expertos en la técnica, los aminoácidos L tienen lugar en la mayoría de las proteínas naturales. Sin embargo, los aminoácidos D- están disponibles comercialmente y pueden sustituirse por algunos o todos los aminoácidos usados para hacer los pentapolímeros de la presente invención. La presente invención contempla pentapolímeros que contienen tanto aminoácidos D- como L-, así como pentapolímeros que consisten esencialmente de aminoácidos L- o D-.

El pentapolímero de la presente invención comprende alanina, ácido glutámico, lisina, tirosina y fenilalanina en las proporciones molares de: de alrededor de 2,0 a alrededor de 3,2 de alanina; de alrededor de 1,4 a alrededor de 2,0 de ácido glutámico; de alrededor de 4,4 a alrededor de 4,6 de lisina; de alrededor de 0,9 a alrededor de 1,1 de tirosina y de alrededor de 0,8 a alrededor de 1,2 de fenilalanina. En una realización, el pentapolímero comprende alanina, ácido glutámico, lisina, tirosina y fenilalanina en las proporciones molares de alanina alrededor de 2,5 a ácido glutámico alrededor de 1,9 a lisina alrededor de 4,5 a tirosina alrededor de 1,0 a fenilalanina alrededor de 0,9.

En otra realización, el pentapolímero de la presente invención comprende alanina, ácido glutámico, lisina, tirosina y fenilalanina en las proporciones molares de: de alrededor de 3,0 a alrededor de 4,2 de alanina; de alrededor de 1,4 a alrededor de 1,6 de ácido glutámico; de alrededor de 3,4 a alrededor de 3,6 de lisina; de alrededor de 0,9 a alrededor de 1,1 de tirosina y de alrededor de 1,4 a alrededor de 1,6 de fenilalanina. En una realización, el pentapolímero comprende alanina, ácido glutámico, lisina, tirosina y fenilalanina en las proporciones molares de alanina alrededor de 3,5 a ácido glutámico alrededor de 1,5 a lisina alrededor de 3,5 a tirosina alrededor de 1,0 a fenilalanina alrededor de 1,5.

La presente invención proporciona además una composición farmacéutica que comprende el pentapolímero divulgado en la presente y un portador farmacéuticamente aceptable. Como se usa en la presente, "portador farmacéuticamente aceptable" incluye cualquiera o todos los solventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardantes de la absorción, edulcorantes y similares. Los portadores farmacéuticamente aceptables pueden prepararse a partir de una amplia variedad de materiales incluyendo, pero no limitados a diluyentes, aglutinantes y adhesivos, lubricantes, disgregantes, agentes colorantes, agentes de carga, agentes aromatizantes, agentes edulcorantes y materiales variados como tampones y absorbentes que pueden ser necesarios para preparar una composición terapéutica particular. El uso de dichos medios y agentes con sustancias farmacéuticamente activas es bien conocido en la técnica. Excepto en la medida que cualquier medio o agente convencional sea incompatible con el ingrediente activo, se contempla su uso en las composiciones terapéuticas.

Las composiciones farmacéuticas para su uso de acuerdo con la presente invención por lo tanto pueden formularse de manera convencional usando uno o más portadores fisiológicamente aceptables que comprende excipientes y auxiliares, que facilitan el procesamiento de los compuestos activos en preparaciones que pueden usarse farmacéuticamente. La formulación apropiada depende de la vía de administración elegida.

Para inyección, el pentapolímero de la invención puede formularse en soluciones acuosas, preferiblemente en tampones fisiológicamente compatibles como solución de Hank, solución de Ringer o tampón salino fisiológico. Para administración transmucosal, se usan en la formulación los penetrantes apropiados para la barrera a penetrar. Dichos penetrantes, por ejemplo DMSO o polietilenglicol se conocen generalmente en la técnica.

Para la administración oral, el pentapolímero puede formularse con portadores farmacéuticamente aceptables bien conocidos en la técnica como comprimidos, píldoras, grageas, cápsulas, líquidos, geles, jarabes, pastas, suspensiones, y similares, para la ingestión oral por un paciente. La preparación de las composiciones farmacéuticas pueden hacerse usando un excipiente sólido, opcionalmente moliendo la mezcla resultante, y procesando la mezcla de gránulos, después de añadir auxiliares adecuados si se desea, para obtener núcleos de comprimidos o grageas. Los excipientes adecuados son, en particular, materiales de relleno como azúcares, incluyendo lactosa, sacarosa, manitol o sorbitol; preparaciones de celulosa como, por ejemplo, almidón de maíz, almidón de trigo, almidón de arroz, almidón de patata, gelatina, goma de tragacanto, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, carbometilcelulosa de sodio; y/o polímeros fisiológicamente aceptables, como

polivinilpirrolidona (PVP). Si se desea se pueden añadir agentes disgregantes, como polivinilpirrolidona reticulada, agar, o ácido algínico o una sal de los mismos como alginato de sodio.

5 Las composiciones farmacéuticas, que pueden usarse oralmente, incluyen cápsulas de ajuste por presión hechas de gelatina así como cápsulas blandas, selladas hechas de gelatina y un plastificante, como glicerol o sorbitol. Las cápsulas de ajuste por presión pueden contener el ingrediente activo en una mezcla con el material de relleno como lactosa, aglutinantes como almidones, lubricantes como talco o estearato de magnesio y, opcionalmente, estabilizantes.

10 En las cápsulas blandas, el pentapolímero puede disolverse o suspenderse en líquidos adecuados, como aceites grasos, parafina líquida o polietilenglicoles líquidos. Además, se pueden añadir estabilizantes. Todas las formulaciones para la administración oral deberían estar en dosificaciones adecuadas para la vía de administración elegida.

15 Para la administración bucal, las composiciones pueden tomar la forma de comprimidos o pastillas formuladas de manera convencional.

20 Las composiciones farmacéuticas para administración parenteral incluyen soluciones acuosas del pentapolímero en forma soluble en agua así como suspensiones del pentapolímero. El término "parenteral" como se usa en la presente se refiere a vías seleccionadas de subcutánea (SC), intravenosa (IV), intramuscular (IM), intradérmica (ID), intraperitoneal (IP) y similares. Los solventes o vehículos lipófilos incluyen aceites grasos como aceite de sésamo, o ésteres de ácidos grasos sintéticos como oleato de etilo, triglicéridos o liposomas. Las suspensiones de inyección acuosas pueden contener sustancias, que aumentan la viscosidad de la suspensión como carboximetilcelulosa de sodio, sorbitol o dextrano. Opcionalmente, la suspensión pueden contener también estabilizantes o agentes adecuados, que aumentan la solubilidad de los compuestos, para permitir la preparación de soluciones altamente concentradas.

30 Otras vías de administración incluyen administración nasal e inhalación oral a los revestimientos de la mucosa de la traque y los bronquios.

De acuerdo con varias realizaciones de la presente invención, la cantidad terapéuticamente efectiva del pentapolímero varía de alrededor de 1 mg a alrededor de 500 mg/día. Alternativamente, dichas cantidades terapéuticamente efectivas son de alrededor de 20 mg a alrededor de 100 mg/día. Alternativamente, dichas cantidades terapéuticamente efectivas son de alrededor de 1 mg a alrededor de 100 mg/día. Alternativamente, dichas cantidades terapéuticamente efectivas son de alrededor de 100 mg a alrededor de 100 mg/día. En algunas realizaciones, la presente invención proporciona una composición farmacéutica parenteral de actuación prolongada en la forma de un depósito que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva del pentapolímero divulgado en la presente. El término "cantidad terapéuticamente efectiva" como se usa en la presente se pretende que califique la cantidad de pentapolímero que alcanzará el objetivo de alivio de los síntomas de la enfermedad autoinmune (por ejemplo, 20-750 mg). Sin embargo, se entiende que la cantidad del pentapolímero administrado se determinará por un médico, de acuerdo con varios parámetros que incluyen la vía de administración elegida, la edad, el peso y la severidad de los síntomas del paciente. El término "actuación prolongada" como se usa en la presente se refiere a una composición que proporciona liberación prolongada, sostenida o extendida del pentapolímero a la circulación sistémica general de un sujeto o a sitios locales de acción en un sujeto. Este término puede referirse adicionalmente a una composición que proporciona duración prolongada, sostenida o extendida de acción (farmacocinéticas) del pentapolímero en un sujeto. En particular, las composiciones farmacéuticas de actuación prolongada de la presente invención proporcionan un régimen de dosificación que varía de una vez a la semana a una vez cada 6 meses. De acuerdo con las realizaciones actualmente más preferidas, el régimen de dosificación varía de una vez a la semana, dos veces al mes (aproximadamente una vez cada 2 semanas) a una vez al mes. Dependiendo de la duración de la acción requerida, cada depósito o dispositivo implantado de la presente invención contendrá típicamente entre alrededor de 20 y 750 mg del ingrediente activo, diseñado para ser liberado durante un periodo que varía de varias semanas a varios meses.

55 En algunas realizaciones, las formulaciones de depósito de la presente invención incluyen, pero no están limitadas a, sistemas de depósito inyectables biodegradables como sistemas de depósito inyectables basados en PLGA; sistemas de depósito inyectables no basados en PLGA, y geles o dispersiones biodegradables inyectables. Cada posibilidad representa una realización separada de la invención. El término "biodegradable" como se usa en la presente se refiere a un componente que se erosiona o degrada en sus superficies con el tiempo debido, al menos en parte, para contactar con las sustancias encontradas en los fluidos del tejido colindante, o por acción celular. En particular, el componente biodegradable es un polímero como, pero no limitado a, polímeros basados en ácido láctico, tales como polilactidas, por ejemplo, poli (D, L-lactida), es decir PLA; polímeros a base de ácido glicólico como poliglicólidos (PGA), por ejemplo, Lactel® de Durect; poli(D,L-lactida-co-glicolida), es decir PLGA, (Resomer® RG-504, Resomer® RG-502, Resomer® RG-504H, Resomer® RG 502H, Resomer® RG-504s, Resomer® RG-502S, de Boehringer, Lactel® de Durect); policaprolactonas como poli(e-caprolactona), es decir PCL (Lactel® de Durect); polianhidridos; poli(ácido sebáico) SA; poli (ácido ricenólico) RA; poli (ácido fumárico), FA; poli(dímero de ácido

graso), FAD; poli(ácido tereftálico), TA; poli(ácido isoftálico), IAP; poli (p- {carboxifenoxi}metano), CPM; poli(p- {carboxifenoxi} propano), CPP; poli(p- {carboxifenoxi} hexano), CPH; poliaminas, poliuretanos, poliesteramidas, polioortoésteres {CHDM: cis/trans ciclohexil dimetanol}, HD: 1,6-hexanodiol. DETOU: (3,9-dietiliden-2,4,8,10-tetraoxaspiro undecano)); polidioxanonas; polihidroxibutiratos; polialquileno oxalatos; poliamidas; poliesteramidas; poliuretanos; poliacetales; policetales; policarbonatos; poliortocarbonatos; polisiloxanos; polifosfacenos; succinatos; ácido hialurónico; poli(ácido málico); poli(aminoácidos); polihidroxivaleratos; succinatos de polialquileno; polivinilpirrolidona; poliestireno; ésteres de celulosa sintéticos; ácidos poliacrílicos; ácido polibutírico; copolímeros de tres bloques (PLGA-PEG-PLGA), copolímeros de tres bloques (PEG-PLGA-PEG), poli (N-isopropilacrilamida) (PNIPAAm), poli (óxido de etileno) - poli (óxido de propileno) - poli (óxido de etileno) copolímeros de tres bloques (PEO-PPO-PEO), ácido poli valérico; polietilenglicol; polihidroxialquicelulosa; quitina; quitosano; polioortoésteres y copolímeros, terpolímeros; lípidos como colesterol, lecitina; poli(ácido glutámico-co-glutamato de etilo) y similares, o mezclas de los mismos. Cada posibilidad representa una realización separada de la presente invención.

En algunas realizaciones, las composiciones de la presente invención comprenden un polímero biodegradable seleccionado de, pero no limitado a, PLGA, PLA, PGA, policaprolactona, polihidroxibutirato, polioortoésteres, polialquilenanhídridos, gelatina, colágeno, celulosa oxidada, polifosfaceno y similares. Cada posibilidad representa una realización separada de la invención.

El polímero biodegradable actualmente preferido es un polímero basado en ácido láctico, más preferiblemente poliláctido, o poli (D, L-láctido-co-glicólido), es decir PLGA. Preferiblemente, el polímero biodegradable está presente en una cantidad de entre alrededor del 10% a alrededor del 98% p/p de la composición. El polímero basado en ácido láctico tiene una proporción de monómeros de ácido láctico a ácido glicólico en el intervalo de 100:0 a alrededor de 0:100, preferiblemente de 100:0 a alrededor de 10:90 y tiene un peso molecular medio de alrededor de 1.000 a alrededor de 200.000 Da. Sin embargo, se entiende que la cantidad de polímero biodegradable se determina por parámetros como la duración del uso y similares.

Los compuestos de actuación prolongada de la presente invención puede comprender además uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables seleccionados de, pero no limitados a, co-surfactantes, solventes/co-solventes, solventes inmiscibles en agua, agua, solventes miscibles en agua, componentes oleosos, solventes hidrófilos, emulsionantes, conservantes, antioxidantes, agentes antiespumantes, estabilizantes, agentes de tamponamiento, agentes de ajuste del pH, agentes formadores de canales, agentes de ajuste osmótico, o cualquier otro excipiente conocido en la técnica. Los co-surfactantes adecuados incluyen, pero no están limitados a, polietilenglicoles, copolímeros de bloque de polioxietileno-polioxipropileno conocidos como "poloxámero", ésteres de ácidos grasos de poliglicerina como decaglicerilo monolaurato y decaglicerilo monomiristato, éster de ácido graso de sorbitán, como monoestearato de sorbitán, éster de ácido graso de sorbitán de polioxietileno, como monooleato de sorbitán de polioxietileno (Tween), éster de ácidos grasos de polietilenglicol como monoestearato de polioxietileno, alquil éter de polioxietileno como polioxietileno lauril éter, aceite de ricino de polioxietileno y aceite de ricino endurecido como aceite de ricino endurecido de polioxietileno, o mezclas de los mismos. Cada posibilidad representa una realización separada de la invención. Los solventes/co-solventes adecuados incluyen, pero no están limitadas a, alcoholes, triacetina, dimetil isosorbida, glicofuro, carbonato de propileno, agua, dimetilacetamida y similares o mezclas de los mismos. Cada posibilidad representa una realización separada de la invención. Los agentes antiespumantes incluyen, pero no están limitados a emulsiones de silicio o sesquioleato de sorbitán. Los estabilizantes adecuados para prevenir o reducir el deterioro de los componentes en las composiciones de la presente invención incluyen, pero no están limitados a, antioxidantes como glicina,  $\alpha$ -tocoferol o ascorbato, hidroxianisol butilado (BHA), hidroxitolueno butilado (BHT), y similares o mezclas de los mismos. Cada posibilidad representa una realización separada de la invención. Los modificadores de la tonicidad adecuados incluyen, pero no están limitados a, manitol, cloruro de sodio y glucosa. Cada posibilidad representa una realización separada de la invención. Los agentes de tamponamiento adecuados incluyen, pero no están limitados a, acetatos, fosfatos y citratos con cationes adecuados. Cada posibilidad representa una realización separada de la invención.

Las composiciones de actuación prolongada de la presente invención pueden prepararse por cualquier manera conocida en la técnica. Actualmente se prefiere la incorporación del pentapolímero en un sistema de administración coloidal, por ejemplo, micropartículas biodegradables, permitiendo así el retardo de la liberación por difusión a través de paredes poliméricas de la partícula y por la degradación del polímero en medio de agua o fluidos biológicos en el cuerpo. Las composiciones de la presente invención pueden prepararse en la forma de micropartículas inyectables por un proceso conocido como "emulsificación doble". Brevemente, la solución concentrada del pentapolímero soluble en agua se dispersa en una solución de polímero biodegradable o no biodegradable en solvente orgánico volátil inmiscible en agua (por ejemplo, cloruro de metileno, cloroformo y similares). La emulsión de "agua en aceite" (w/o) así obtenida se dispersa después en una fase de agua externa continua que contiene surfactante (por ejemplo alcohol de polivinilo - PVA, polisorbatos, copolímeros de bloque de óxido de polietileno- óxido de polipropileno, ésteres de celulosa y similares) para formar gotitas de "emulsión doble agua en aceite en agua (w/o/w). Después de la evaporación del solvente orgánico, las micropartículas se solidifican y se recogen por filtración o centrifugación. Las micropartículas (MPs) recogidas se lavan con agua purificada para eliminar la mayoría del surfactante y el péptido no enlazado y se centrifugan de nuevo. Las MPs lavadas se recogen y liofilizan son aditivos o con la adición de crioprotector (por ejemplo manitol) para facilitar su posterior reconstitución.



Los sistemas de depósito de la presente invención abarcan cualquier forma conocida por el experto en la técnica. Las formas adecuadas incluyen, pero no están limitadas a, microesferas biodegradables o no biodegradables, varillas implantables, cápsulas implantables y anillos implantables. Cada posibilidad representa una realización separada de la invención. Se contemplan además matrices erosionables y depósito de gel de liberación prolongada. Cada posibilidad representa una realización separada de la invención. Los sistemas implantables adecuados se describen por ejemplo en la US 2008/0063687, el contenido de la cual se incorpora en la presente en su totalidad. Las varillas implantables pueden prepararse como se conoce en la técnica usando micro-extrusores adecuados como los descritos por ejemplo en <http://www.randcastle.com/prodinfo.html>.

De acuerdo con los principios de la presente invención, las composiciones farmacéuticas de actuación prolongada de la presente invención proporcionan un perfil de liberación ventajoso inesperado del ingrediente activo proporcionando así eficacia terapéutica superior.

### 15 Usos Terapéuticos

El pentapolímero de la presente invención así como las composiciones farmacéuticas que los comprenden son útiles para el tratamiento de enfermedades autoinmunes. Las enfermedades autoinmunes dentro del alcance de la presente invención incluyen, pero no están limitadas a, esclerosis múltiple, anemia hemolítica autoinmune, ovaritis autoinmune, tiroiditis autoinmune, uveorretinitis autoinmune, enfermedad de Crohn, púrpura trombocitopénica inmune crónica, colitis, enfermedad de sensibilidad de contacto, diabetes mellitus, enfermedad de Graves, síndrome de Guillain-Barre, enfermedad de Hashimoto, mixedema idiopático, miastenia gravis, psoriasis, pénfigo vulgaris, artritis reumatoide y el lupus eritematoso sistémico. Cada posibilidad representa una realización separada de la presente invención.

Actualmente preferido es el tratamiento de la esclerosis múltiple (MS), incluyendo la esclerosis múltiple con Recaída-Remisión (RRMS). El término "esclerosis múltiple" como se usa en la presente se refiere a una enfermedad autoinmune del sistema nervioso central que está acompañada por uno o más de los síntomas siguientes: visión reducida o pérdida de visión, marcha desigual y tropiezos, dificultad para hablar, así como frecuencia urinaria e incontinencia. Los síntomas adicionales incluyen cambios de humor y depresión, espasmos musculares y parálisis severa. El término "tratar" como se usa en la presente se refiere a la supresión o mejora de cualquiera de los síntomas descritos.

En algunas realizaciones, el pentapolímero de la presente invención se usa para reducir la frecuencia de las recaídas en pacientes con Esclerosis Múltiple con Recaída-Remisión.

Abarcada por la presente invención está una terapia de combinación del pentapolímero divulgado en la presente con al menos otro agente activo. Los agentes activos dentro del alcance de la presente invención incluyen, pero no están limitados a interferones, por ejemplo,  $\alpha$ -interferones pegilados o no pegilados, o  $\beta$ -interferones, por ejemplo, interferón  $\beta$ -1a o interferón  $\beta$ -1b, o  $\gamma$ -interferones; inmunosupresores opcionalmente con actividad antiproliferativa/antineoplásica, por ejemplo mitoxantrona, metotrexato, azatioprina, ciclofosfamida, o esteroides, por ejemplo, metilprednisolona, prednisona o dexametasona, o agentes secretores de esteroides, por ejemplo, ACTH; inhibidores de la adenosina desaminasa, por ejemplo, cladribina; IV inmunoglobulina G (por ejemplo como se divulga en Neurology, 1998, May 50(5):1273-81) anticuerpos monoclonales para varios marcadores de superficie de células T; por ejemplo natalizumab (ANTEGREN®) o alemtuzumab; citoquinas promotoras de TH2, por ejemplo IL-4, IL-10, o compuestos que inhiben la expresión de citoquinas promotoras de TH1, por ejemplo inhibidores de la fosfodiesterasa, por ejemplo, pentoxifilina; agentes antiespásticos incluyendo baclofeno, diazepam, piracetam, dantroleno, lamotrigina, rifluzole, tizanidina, clonidina, beta bloqueantes, ciproheptadina, orfenadrina o cannabinoides; antagonistas del receptor de glutamato AMPA, por ejemplo 2,3-dihidroxi-6-nitro-7-sulfamoiibenzo(f)quinoxalina,[1,2,3,4, tetrahidro-7-morfolin-il-2,3-dioxo-6-(trifluorometil)quinoxalin-i il]metilfosfonato, 1-(4-aminofenil)-4-metil-7,8- metilen-dioxi-5H-2,3-benzodiazepina, o (-)-1-(4-aminofenil)-4-metil-7,8-metilen-dioxi-4,5-dihidro-3-metilcarbamoil-2,3-benzodiazepina; inhibidores de la expresión de VCAM-1 o antagonistas de su ligando, por ejemplo antagonistas de VLA-4 de  $\alpha$ 4 $\beta$ 1 integrina y/o  $\alpha$ -4-beta-7 integrinas; factor inhibidor de migración anti-macrófago (Anti-MIF); xii) inhibidores de la Catepsina S; xiii) inhibidores de mTor. Cada posibilidad representa una realización separada de la invención. El otro agente activo actualmente preferido es FTY720 (2-amino-2-[2-(4-octilfenil)etil]propano-1,3-diol; fingolimod) o sus sales farmacéuticamente aceptables que pertenecen a la clase de los inmunosupresores.

Los siguientes ejemplos se presentan para ilustrar más completamente ciertas realizaciones de la invención. No debe entenderse de ninguna manera, sin embargo, que limitan el amplio alcance de la invención. Alguien experto en la técnica puede idear fácilmente muchas variaciones y modificaciones de los principios divulgados en la presente sin salirse del alcance de la invención.

### 65 **Ejemplo 1: Preparación del pentapolímero**

El pentapolímero se preparó siguiendo el método descrito en la US 5.800.808 (Ejemplos 3 y 4; el contenido de la cual se incorpora en la presente en su totalidad), usando las siguientes proporciones molares de los N-carboxianhídridos (NCA) de tirosina (1 mol), alanina (2,5 mol),  $\gamma$ -bencil-glutamato (1,9 mol), trifluoroacetilo-lisina (4,5 mol) y fenilalanina (1 mol) protegidos.

5

Datos de caracterización analítica del producto:

10

pH = 7.17 (20mg/ml);  
 MW Medio = 6, 591;  
 Pureza = 85%;  
 distribución de MW = 88,1% > 2,500 Da; 90,7% < 21,000 Da.

**Ejemplo 2: Preparación de una formulación de acción prolongada del pentapolímero**

15

20

Se prepararon partículas de depósito inyectables basadas en PLGA por el método de extracción/evaporación del solvente (emulsión simple). Se vertió lentamente una solución de 50:50, diclorometano/etanol que contenía 250 mg de PLGA y 200 mg del pentapolímero de la presente invención en una solución acuosa (200 ml) que contenía un 2% de PVA y se emulsificó usando un agitador mecánico (300 rpm) a 25° C. El solvente orgánico se evaporó usando agitación (100 rpm) durante 2 horas. Las micropartículas así formadas se recogieron por centrifugación y se lavaron con agua destilada para eliminar el emulsionante en exceso. La suspensión final se liofilizó después para obtener un polvo fino.

**Ejemplo 3: Modelo de encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE)**

25

30

La encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE) es una enfermedad desmielinizante autoinmune inflamatoria que puede inducirse en animales de laboratorio por inyección de proteína básica de mielina. Esta enfermedad se ha convertido en el modelo de laboratorio estándar para estudiar enfermedades autoinmunes clínicas y experimentales. De hecho, numerosos artículos (por ejemplo, Abramsky et. al., 1982, J Neuroimmunol 2, 1 y Bolton et al., 1982, J Neurol Sci. 56, 147) indican que las similitudes de EAE recidivante crónica en animales con la esclerosis múltiple en humanos implica especialmente el valor de la EAE para el estudio de enfermedades desmielinizantes autoinmunes como la esclerosis múltiple. Como tal, el modelo de prueba de EAE se emplea para establecer la actividad del pentapolímero de la presente invención contra la esclerosis múltiple. Dicha prueba se realiza de acuerdo con el procedimiento siguiente.

35

40

Se inyectan ratas Lewis hembra en sus almohadillas de las patas con 12,5  $\mu$ g de proteína básica de mielina (MBP) (preparada de médula espinal de cobaya) en adyuvante completo de Freund. El pentapolímero de la presente invención se da por inyección cada día a varias dosificaciones a los animales de prueba. Se de régimen Gold standard de acetato de glatiramer (por ejemplo, PNAS, 2005, vol. 102, núm. 52, 19045 hasta 19050) a ciertos otros animales de prueba como control. Los animales se pesan y puntúan después diariamente para síntomas de EAE de acuerdo con una escala de 0 a 3 (0= sin cambio; 1 = cola flácida; 2 = discapacidad en las extremidades traseras y 3 = parálisis de los cuartos traseros/moribundos). Los animales se sacrifican después si se alcanza una puntuación de 3.

**Ejemplo 4: Estudios in vivo usando el modelo EAE**

45

50

Para determinar el efecto del pentapolímero de la presente invención en el modelo murino de MS, se realiza encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE). La EAE se induce por inyección de emulsión de MOG (glicoproteína de oligodendrocitos de mielina) subcutáneamente en la espalda afeitada del ratón ( se usan ratones C57BL/6) en tres sitios, seguido por la inyección intraperitoneal de toxina de Bordetella pertussis en solución salina tamponada con fosfato en el Día 0 y 48 horas tras la inmunización de MOG. La EAE se evalúa por puntuación clínica de los ratones diariamente desde el Día 0 a los días indicados tras la inmunización, como se describe a continuación. Se determina la incidencia de la enfermedad y la puntuación media del grupo y los grupos de tratamiento se comparan con el control sin tratamiento.

55

Se usan los siguientes artículos de prueba:

60

- (a) Una formulación de pentapolímero de acuerdo con la presente invención (PP);
- (b) Una formulación inyectable de acetato de glatiramer convencional (GA); y
- (c) una formulación de depósito que contiene acetato de glatiramer (GA-depósito) como se describe en la WO 2011/080733, el contenido de la cual se incorpora en la presente por referencia en su totalidad.

Preparación de los artículos de prueba:

65

Las formulaciones de PP y GA se disuelven en agua-para-inyección (WFI). El depósito de GA se suspende en WFI, se agita por vórtex y si es necesario se sonica hasta 10 minutos sin calentamiento, hasta que se obtiene una

suspensión blanca homogénea, capaz de ser extraída e inyectada a través de una aguja adecuada.

Formación de vehículos:

- 5 Vehículo 1: solución salina, 0,9% de NaCL en agua estéril  
 Vehículo 2: agua para inyección (WFI)

Reactivos:

- 10 MOG 35-55: (GL BiochemCo. Ltd; Shanghái, P.R. China). MOG 35-55. El MOG 35-55 se disuelve en solución salina a una concentración de 2 mg/ml.

- 15 Adyuvante Completo de Freund (CFA) (Cat: F5881; Sigma-Aldrich; St. Louis, MO, USA). Se añade la cepa *Mycobacterium tuberculosis* H37RA matada por calor (Cat: 231141; Difco; Detroit, MI, USA) al adyuvante completo de Freund a una concentración final de 4 mg/ml.

Toxina de Bordetella pertussis (PTX): (Cat: P7208; Sigma-Aldrich; St. Louis, MO, USA).

- 20 Usando un homogeneizador de alta velocidad, la solución MOG anterior se emulsifica con volumen igual del CFA modificado en hielo para 30.000 rpm durante 1,5 horas.

Animales:

- 25 Ratones C57BL/6, hembra, 7 - 9 semanas, 17 - 20 g.  
 Adaptación: no menos de 7 días.  
 Ambiente: ambiente Libre de Patógenos Específicos (SPF)  
 Temperatura ambiente: 20 - 26C  
 Humedad relativa ambiente: 40 - 70%  
 30 Ciclo de luz: luz fluorescente durante 12 horas de luz (08:00 - 20:00) y 12 horas de oscuridad.  
 Alojamiento de animales: 3-4 ratones/caja por grupo de tratamiento  
 Alimentación: acceso libre a comida (irradiada, Shanghai SLAC Laboratory Animal Co. Ltd., China).  
 Agua: acceso libre a agua (agua del grifo filtrada por Mol Ultrapure Water System).

Asignación a grupos de tratamiento:

- 35 Los animales se asignaron a los grupos de tratamiento por aleatorización en software Biobook para lograr peso medio de grupo similar, que proporciona control del error sistemático.

**Tabla 1 - Grupo y régimen de dosificación**

Grupo	Artículo de Prueba	N	Vía	Conc.	Dosificación		Régimen	Dosis en (días)	
				mg/ml	ml/ratones	mg/ratone			
45	1	PP <sup>b</sup>	10	s.c.	10	0.2	2	q.d.	DO-9
	2	GA <sup>b</sup>	10	i.m.	25	0.2	5	q.d.	D0, 1, 14, 15, 28,29
	3	GA <sup>b</sup>	10	i.m.	25	0.2	5	q.d.	D0, 14, 28
50	4	GA <sup>b</sup>	10	i.m.	25	0.2	5	q.d.	D0, 7, 14,21, 28
	5	GA-depósito <sup>b</sup>	10	i.m.	312	0.2	62.5*	q.d.	D0, 1, 14, 15, 28,29
	6	GA- depósito <sup>b</sup>	10	i.m.	312	0.2	62.5*	q.d.	D0, 14, 28
55	7	GA- depósito <sup>b</sup>	10	i.m.	312	0.2	62.5*	q.d.	D0, 7, 14,21, 28
	8	GA <sup>b</sup>	10	s.c.	10	0.2	2	q.d.	DO-9
60	9	Veh <sup>a</sup>	10	s.c.	N/A	0.2	N	q.d.	DO-9

a: Vehículo en solución salina  
 b: Vehículo es WFI  
 \* contenido de Ga es 80 mg/g de producto formulado "GA-depósito", es decir 5 mg/ratones/día de GA.

65

Después de la anestesia por isoflurano (2 - 3%, inhalación), la EAE se induce inyectando 100 µl de emulsión subcutáneamente en las espaldas afeitadas de los ratones. La toxina Bordetella pertussis (200 ng en 200 µl de PBS) se administra i.p. en el día de la inmunización (Día 0) y 48 horas después de eso.

5 Los ratones se tratan con el pentapolímero de la presente invención que se administra por inyección una vez al día a varias dosificaciones. Los grupos de control se tratan o con placebo o con régimen Gold standard de acetato de glatiramer (GA) (e.g. PNAS, 2005, vol. 102, no. 52, 19045-19050), o con una formulación de depósito que contiene acetato de glatiramer (depósito de GA).

10 El artículo o vehículo de prueba se administra a cada grupo de acuerdo con los regímenes de tratamiento y dosificación descritos en la Tabla 1.

**Grupo 1:** PP, 2mg/ratones s.c. durante 10 días (día 0 a día 9). seguido durante 30 días.

15 **Grupo 2:** GA, administración i.m., 5 mg/ratones en día 0 y día 1, día 14 y día 15, día 28, día 29. Seguido durante 45 días.

**Grupo 3:** GA, administración i.m., 5 mg/ratones en día 0, día 14, día 28. Seguido durante 45 días.

**Grupo 4:** GA, administración i.m., 5 mg/ratones en día 0, día 7, día 14, día 21, día 28. Seguido durante 45 días.

20 **Grupo 5:** GA (depósito) administración i.m. Las cantidades son en base al material activo. El contenido del GA activo es 80 mg/g de formulación. 5 mg/ratones en día 0 y día 1, día 14 y día 15, día 28, día 29. Seguido durante 45 días.

**Grupo 6:** GA (depósito) administración i.m., 5 mg/ratones en día 0, día 14, día 28. Seguido durante 45 días.

**Grupo 7:** GA (depósito) administración i.m., 5 mg/ratones en día 0, día 7, día 14, día 21, día 28. Seguido durante 45 días.

25 **Grupo 8:** GA, 2 mg/ratones s.c. durante 10 días (día 0 a día 9) Seguido durante 30 días.

**Grupo 9:** grupo del control del vehículo (solución salina).

30 Los pesos corporales de todos los ratones se registran diariamente comenzando desde el Día 0 hasta el Día 30 para el Grupo 1, Grupo 8 y Grupo 9. Otros Grupos se registran desde el Día 0 al Día 45. Los ratones se examinan diariamente para señales clínicas de EAE utilizando el siguiente sistema de puntuación: 0= ratón normal; 1= cola flácida o debilidad de las extremidades posteriores; 2= cola flácida y debilidad de las extremidades posteriores; 3= parálisis de las extremidades posteriores parcial; 4= parálisis de las extremidades posteriores completa; y 5= estado moribundo. Se determinan la incidencia, mortalidad y puntuación media del grupo y los grupos de tratamiento se comparan con el control sin tratamiento.

35 El peso corporal medio entre los grupos se compara por ANOVA seguido por prueba post-Hoc de Dunnett. Las comparaciones de la puntuación clínica media entre dos grupos se hace por la prueba de Mann-Whitney. Las incidencias de la enfermedad entre dos grupos se comparan entre los grupos por prueba de Chi-cuadrado de Pearson.  $P < 0,05$  se consideran estadísticamente significativos.

40

45

50

55

60

65

**Reivindicaciones**

- 5 1. Un pentapolímero o una sal del mismo, que es un copolímero lineal de alanina, ácido glutámico, lisina, tirosina y fenilalanina.
- 10 2. El pentapolímero de acuerdo con la reivindicación 1, que contiene de alrededor de 15 a alrededor de 120 aminoácidos; en el que el pentapolímero preferiblemente tiene un peso molecular medio de alrededor de 2.000 a alrededor de 20.000 Da, más preferiblemente un peso molecular medio de alrededor de 5.000 a alrededor de 15.000 Da.
- 15 3. El pentapolímero de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, que comprende aminoácidos L-, aminoácidos D- o una mezcla de aminoácidos L- y D-
- 20 4. El pentapolímero de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que los aminoácidos están en una proporción molar de: de alrededor de 2,0 a alrededor de 3,2 de alanina; de alrededor de 1,4 a alrededor de 2,0 de ácido glutámico; de alrededor de 4,4 a alrededor de 4,6 de lisina; de alrededor de 0,9 a alrededor de 1,1 de tirosina; y de alrededor de 0,8 a alrededor de 1,2 de fenilalanina, preferiblemente en el que la proporción molar de alanina a ácido glutámico a lisina a tirosina a fenilalanina es de alrededor de 2,5: 1,9: 4,5: 1,0: 0,9, respectivamente.
- 25 5. El pentapolímero de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 para su uso en el tratamiento de esclerosis múltiple.
- 30 6. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva del pentapolímero de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 y un portador farmacéuticamente aceptable, en el que la composición farmacéutica es preferiblemente adecuada para la administración parenteral por inyección subcutánea (SC), intravenosa (IV), intramuscular (IM), intradérmica (ID) o intraperitoneal (IP).
- 35 7. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 6 para su uso en el tratamiento de esclerosis múltiple.
- 40 8. Una composición farmacéutica de actuación prolongada que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva del pentapolímero de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 en una forma de depósito adecuada para la administración en una localización médicamente aceptable en un sujeto con necesidad de ello.
- 45 9. La composición farmacéutica de actuación prolongada de acuerdo con la reivindicación 8, que comprende además un portador biodegradable o no biodegradable farmacéuticamente aceptable seleccionado de PLGA, PLA, PGA, policaprolactona, polihidroxibutirato, polioroésteres, polialcanoanhídridos, gelatina, colágeno, celulosa oxidada, y polifosfaceno.
- 50 10. La composición farmacéutica de actuación prolongada de acuerdo con la reivindicación 8 ó 9, para su uso en el tratamiento de esclerosis múltiple.
- 55 11. El pentapolímero de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, o la composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 6, 8 ó 9, para su uso en el tratamiento de esclerosis múltiple.
- 60 12. El pentapolímero o composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 11, en el que el pentapolímero se administra para reducir la frecuencia de recaídas en pacientes con Esclerosis Múltiple con Recaída-Remisión (RRMS).
- 65 13. El pentapolímero o composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 11 ó 12, en el que el pentapolímero se incorpora en una composición de larga duración en una forma de depósito adecuada para la administración en una localización médicamente aceptable en un sujeto con necesidad de ello.
14. El pentapolímero o composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 11 a 13, en el que el pentapolímero se usa en combinación con al menos un agente activo adicional.
15. El uso del pentapolímero de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, o la composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 6, 8 ó 9, para la fabricación de un medicamento para tratar la esclerosis múltiple.