

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 614 923**

51 Int. Cl.:

A61K 31/7048 (2006.01)
A61P 25/00 (2006.01)
A61K 31/435 (2006.01)
A61K 31/438 (2006.01)
A61K 31/498 (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01)
A61K 9/48 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.09.2012 PCT/IB2012/002252**
 87 Fecha y número de publicación internacional: **28.03.2013 WO2013041963**
 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.09.2012 E 12834382 (9)**
 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.11.2016 EP 2758061**

54 Título: **Combinación de antibióticos para tratar una enfermedad autoinmune**

30 Prioridad:

20.09.2011 US 201161536824 P
21.09.2011 US 201161537229 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
02.06.2017

73 Titular/es:

REDHILL BIOPHARMA LTD (100.0%)
21 Ha'arbaa Street
64739 Tel Aviv, IL

72 Inventor/es:

FATHI, REZA;
MCLEAN, PATRICK, LAUGHLIN y
LEIGHTON, HARRY, JEFFERSON

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 614 923 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

Combinación de antibióticos para tratar una enfermedad autoinmune

Campo de la descripción

5 La presente descripción se refiere al uso de una composición para el tratamiento de una enfermedad autoinmune. En forma más específica, la composición comprende una combinación de antibióticos que se pueden utilizar para tratar la esclerosis múltiple.

Antecedentes

10 La esclerosis múltiple (MS, por su sigla en inglés) es una enfermedad crónica autoinmune y desmielinizante que afecta principalmente al sistema nervioso central. La MS se caracteriza por la infiltración de células T CD4+ específicas de mielina que atacan la vaina de mielina axonal y otros elementos del sistema nervioso central (CNS, por su sigla en inglés), y destruyen la mielina y el axón basal.

Los presentes inventores han hallado que una combinación de antibióticos, utilizados previamente en el tratamiento de trastornos intestinales inflamatorios tiene un efecto sobre la respuesta inflamatoria de un sujeto que padece una enfermedad autoinmune que incluye MS y otras enfermedades autoinmunes.

15 Cualquier debate de documentos, acciones, materiales, dispositivos, artículos o similares que se ha incluido en la presente memoria descriptiva no se deben tomar como una admisión de que cualquiera o todas estas cuestiones forman parte de la base de la técnica anterior o fueron conocimientos generales comunes en el campo pertinente para la presente descripción como si existiese antes de la fecha de prioridad de cada reivindicación de la presente solicitud.

20 La Patente US2011/059136 describe composiciones que comprenden rifabutina, claritromicina, y clofazimina para su uso en el tratamiento de Enfermedades intestinales inflamatorias.

La Patente WO2011/011706 describe composiciones y métodos para tratar y/o prevenir una enfermedad autoinmune que comprende la administración a un sujeto en necesidad de los mismos de una cantidad eficaz de ciclofosfamida y/o un derivado de ciclofosfamida en combinación con un agente inmunomodulador adicional.

25 La Patente US2008/275063 describe nuevos compuestos inhibidores de CDK5, y su uso en el tratamiento del dolor, trastornos inflamatorios, enfermedades inmunológicas, enfermedades proliferativas, enfermedades infecciosas, enfermedades cardiovasculares y enfermedades neurodegenerativas.

La Patente US7488580 describe un método y un kit para la detección de *Mycobacterium avium* subespecie paratuberculosis (MAP, por su sigla en inglés) en la sangre y muestras derivadas de sangre.

30 Borody *et al.*, 2007, Digestive and Liver Disease (39:5, 438-444) describe informes sobre estudios de la formación de cicatrices únicas en pacientes con la enfermedad de Crohn tratados con terapia de *anti Mycobacterium avium ss paratuberculosis*.

Compendio de la descripción

35 La invención proporciona una combinación de tres antibióticos que comprenden claritromicina, rifabutina, y clofazimina para su uso en el tratamiento de la esclerosis múltiple, en especial la esclerosis múltiple remitente-recidivante. La combinación puede comprender además Vitamina D, un agente antiinflamatorio, un inhibidor de quinasa dependiente de ciclina, y/o un inhibidor de transcripción de células T activado.

La descripción proporciona una combinación de rifabutina, claritromicina, y clofazimina para el tratamiento de una enfermedad autoinmune.

40 La descripción, en un aspecto, proporciona una composición que incluye rifabutina, claritromicina, y clofazimina para el tratamiento de una enfermedad autoinmune.

La presente descripción también proporciona una composición que incluye rifabutina, claritromicina, y clofazimina para el tratamiento de la esclerosis múltiple.

45 En un aspecto adicional, se proporciona una composición que comprende rifabutina, claritromicina y clofazimina para el tratamiento de una enfermedad autoinmune.

En un aspecto adicional, se proporciona una composición que comprende rifabutina, claritromicina y clofazimina para el tratamiento de la esclerosis múltiple (MS).

En un aspecto adicional, se proporciona una composición que comprende una combinación de agentes antibióticos para el tratamiento de la esclerosis múltiple, dicha composición comprende rifabutina, claritromicina y clofazimina.

En un aspecto adicional, se proporciona una composición que comprende una combinación de dos o más agentes antibióticos para el tratamiento de una enfermedad autoinmune, dichos dos o más agentes antibióticos se seleccionan de rifabutina, clofazimina y por lo menos un macrólido.

5 En un aspecto adicional, se proporciona una composición que comprende una combinación de dos o más agentes antibióticos para el tratamiento de una enfermedad autoinmune, dichos dos o más agentes antibióticos se seleccionan de rifabutina, clofazimina y claritromicina.

En un aspecto adicional, se proporciona una composición que comprende una combinación de dos o más agentes antibióticos para el tratamiento de una enfermedad autoinmune, dichos dos o más agentes antibióticos se seleccionan de clofazimina, claritromicina y por lo menos un antibiótico que tiene actividad bactericida.

10 En otro aspecto, la presente descripción proporciona un método de tratar una enfermedad autoinmune en un paciente que comprende la administración de una composición que incluye rifabutina, claritromicina, y clofazimina a dicho paciente.

15 En un aspecto adicional existe un método de tratar un paciente que padece una enfermedad autoinmune, y que tiene, o es susceptible a, una infección por una *Micobacteria*, que comprende la administración al paciente de una composición que incluye rifabutina, claritromicina, y clofazimina.

En otro aspecto, existe un método de tratar un paciente que padece esclerosis múltiple, dicho paciente también da positivo por una infección por micobacterias que comprende la administración al paciente de una composición que incluye rifabutina, claritromicina, y clofazimina.

20 En otro aspecto, la presente descripción proporciona un método de tratar una enfermedad autoinmune en un paciente que comprende la administración de una composición que comprende una combinación de antibióticos seleccionados del grupo rifabutina, claritromicina, y clofazimina a dicho paciente.

En otro aspecto, la presente descripción proporciona un método de tratar esclerosis múltiple en un paciente que comprende la administración de una composición que comprende una combinación de antibióticos seleccionados del grupo rifabutina, claritromicina, y clofazimina a dicho paciente.

25 **Breve descripción de los dibujos**

La Figura 1 es un gráfico que muestra los efectos de la administración de RHB 104 sobre la concentración de citoquina IL-17 en un modelo de ratón;

La Figura 2 es un gráfico que muestra los efectos de la administración de RHB 104 sobre la concentración de citoquina TNF-alfa en un modelo de ratón;

30 La Figura 3 es un gráfico que muestra los efectos de la administración de RHB 104 sobre la concentración de citoquina IFN-gamma en un modelo de ratón;

La Figura 4 es un gráfico que muestra los efectos de la administración de RHB 104 sobre la concentración de citoquina IL-6 en un modelo de ratón;

35 La Figura 5 es un gráfico que muestra los efectos de la administración de RHB 104 sobre la concentración de citoquina IL-2 en un modelo de ratón;

La Figura 6 es un gráfico que muestra la gravedad de EAE en diversos grupos de tratamiento en un modelo de ratón de MS reconocido;

La Figura 7 es un gráfico que muestra el cambio en el peso corporal en diversos grupos de tratamiento en un modelo de ratón de MS reconocido;

40 La Figura 8 es un gráfico que muestra el número promedio de focos inflamatorios detectados histológicamente (en las secciones H y E) en tanto un grupo control como de tratamiento en un modelo de ratón de MS reconocido;

La Figura 9 es un gráfico 9 que muestra la puntuación media de desmielinización de un análisis histológico (de las secciones de color azul rápido Luxol) en tanto un grupo control como de tratamiento en un modelo de ratón de MS reconocido;

45 La Figura 10 es un gráfico que muestra la puntuación media de desmielinización determinada histológicamente (a partir de las secciones H y E) en tanto un grupo control como de tratamiento en un modelo de ratón de MS reconocido;

La Figura 11 es un gráfico que muestra el número promedio de células apoptóticas detectadas histológicamente (en las secciones H y E) en tanto un grupo control como de tratamiento en un modelo de ratón de MS reconocido; y

50 La Figura 12 es un gráfico que muestra la gravedad de la enfermedad recidivante en diversos grupos de tratamiento

de un modelo de ratón reconocido.

Descripción de las realizaciones representativas de la descripción

Por el término "esclerosis múltiple", también se incorporan las variantes de esclerosis múltiple tales como Neuromielitis óptica (Enfermedad de Devic), Esclerosis difusa, Esclerosis transicional, Encefalomiелitis aguda diseminada, y Neuritis óptica.

El uso del término "sujeto" incluye tanto seres humanos como animales no humanos.

Por "tratamiento" se entiende que por lo menos se logra una mejora de los síntomas asociados con la condición (por ej., MS) que afecta al sujeto, en donde mejora se utiliza en un sentido amplio para referirse a por lo menos una reducción en la magnitud de un parámetro, por ej., un síntoma, asociado con la condición que se está tratando. Como tal, el tratamiento también incluye situaciones en las que la condición, o por lo menos los síntomas asociados con la misma, están completamente inhibidos, por ej., impedidos de producirse o detenidos, por ej., terminados, de manera tal que el sujeto ya no padezca la condición, o por lo menos los síntomas que caracterizan la condición. "Tratamiento" también incluye la prevención de un episodio de recaída en un sujeto o si se produce el episodio de recaída entonces el término "tratamiento" es de acuerdo con lo anterior.

Una variedad de temas es tratable de acuerdo con los métodos del sujeto. En muchas realizaciones los sujetos son "mamíferos", en los que estos términos se utilizan ampliamente para describir los organismos que se encuentran dentro de la clase de los mamíferos, que incluye las órdenes carnívoras (por ej., perros y gatos), roedores (por ej., ratones, conejillos de Indias, y ratas), y primates (por ej., seres humanos, chimpancés, y monos). En muchas realizaciones, los sujetos son seres humanos. Si bien la presente invención se puede utilizar para el tratamiento de un sujeto humano, se debe comprender que los métodos del sujeto también se pueden llevar a cabo en otros sujetos animales tales como, pero sin limitarse a, ratones, ratas, perros, gatos, ganado y caballos, etc. En consecuencia, se debe comprender que cualquier sujeto en necesidad de tratarse de acuerdo con la presente invención es adecuado.

Además, los sujetos adecuados de esta invención incluyen aquéllos que tienen y aquéllos que no han estado previamente afligidos con una afección, aquéllos que previamente se ha determinado que están en riesgo de padecer una condición, y aquellos que inicialmente han sido diagnosticados o identificados como afligidos o que experimentan una condición una condición.

El tratamiento se puede evaluar por medio de uno o más de un número de criterios. La evaluación de dicho tratamiento puede ser tanto cuantitativa como cualitativa. La evaluación del tratamiento se puede realizar sobre la base de una escala clínica de la gravedad de una enfermedad. En los sujetos que reciben tratamiento para una enfermedad autoinmune tal como MS, el tratamiento se puede evaluar por medio de un número de escalas tales como el Estado de discapacidad ampliada (EDSS, por su sigla en inglés), el Índice de ambulación (AI, por su sigla en inglés) o la Escala de Clasificación Neurológica Scripps (SNRS, por su sigla en inglés).

La evaluación del tratamiento puede incluir la evaluación de uno o más síntomas asociados con una enfermedad particular. En el ejemplo de MS, los síntomas incluyen: debilidad y/o entumecimiento en una o más extremidades; el hormigueo de las extremidades y sensaciones similares a bandas apretadas alrededor del torso o extremidades; el arrastre o control deficiente de la una o ambas piernas a parálisis espástica o atáxica; reflejos tendinosos hiperactivos; la desaparición de los reflejos abdominales; signo de Lhermitte; neuritis retrobulbar u óptica; inestabilidad al caminar; síntomas del tronco encefálico (diplopía, vértigo, vómitos); trastornos de la micción; hemiplejía; neuralgia trigeminal; otros síndromes de dolor; nistagmo y ataxia; ataxia cerebelosa; tríada de Charcot; diplopía; oftalmoplejía internuclear bilateral; miocimia o parálisis de los músculos faciales; sordera; tinnitus; alucinaciones auditivas no formadas; vértigo y vómitos; anestesia facial transitoria o de neuralgia trigeminal; disfunción vesical; euforia; depresión; demencia, desgano, dolor molesto en la parte baja de la espalda; dolores ardientes, agudos, mal localizados en una extremidad o ambas piernas y dolores en la cintura; ataques abruptos de déficit neurológico; disartria y ataxia; dolor paroxístico y disestesia en una extremidad; luces intermitentes; picazón paroxística; y/o convulsiones tónicas, que toman la forma de espasmo de flexión (distónica) de la mano, la muñeca y el codo con extensión de la extremidad inferior.

En la MS, la mejora de los síntomas de la enfermedad incluyen además la reducción del número de episodios inflamatorios ("episodio" incluye cualquiera o una combinación de por lo menos las manifestaciones clínicas anteriores), la ralentización de la progresión de la enfermedad, o la reducción/disminución de la aparición de lesiones cerebrales (identificadas por resonancia magnética). La recurrencia de enfermedades que incluyen MS se puede mejorar por medio de la disminución de la gravedad de los síntomas (por ej., los síntomas descritos con anterioridad) asociados con un episodio de MS, o por medio del alargamiento del periodo de tiempo entre la ocurrencia de episodios.

En la MS y enfermedades asociadas, el análisis cuantitativo también se puede utilizar para evaluar el tratamiento. Los ejemplos de las técnicas de análisis cuantitativo incluyen la identificación de marcadores biológicos. Los ejemplos incluyen pero no se limitan a biomarcadores que reflejan la alteración del sistema inmune; biomarcadores de la alteración de la barrera hematoencefálica, de desmielinización, de estados oxidativos y excitotoxicidad, de gliosis o de remielinización y reparación. Se puede medir un panel de varios marcadores para reflejar diversas

etapas de la enfermedad que incluye diversas etapas de inflamación, desmielinización, degeneración axonal y remielinización.

5 Se debe apreciar que la evaluación del tratamiento puede resultar de una serie de técnicas y puede basarse tanto en la manifestación clínica como en el análisis de diversos marcadores no clínicos tales como biomarcadores. En enfermedades tales como MS que es una enfermedad compleja con varios mecanismos fisiopatológicos que no son uniformes en los subgrupos de pacientes con MS, hay una necesidad de evaluar el tratamientos sobre la base de diversos y diferentes criterios y marcadores y se debe comprender que los ejemplos anteriores proporcionados para la evaluación del tratamiento no son una lista exhaustiva sino que simplemente proporcionan un ejemplo de los medios por los cuales se puede evaluar el tratamiento.

10 A lo largo de esta memoria descriptiva por la palabra "comprenden", o variaciones tales como "comprende" o "que comprende", se entenderá que implica la inclusión de un elemento, número entero o paso indicado, o un grupo de elementos, números enteros o pasos, pero no la exclusión de cualquier otro elemento, número entero o paso, o un grupo de elementos, números enteros o pasos.

15 La composición de la presente descripción puede comprender además por lo menos un antibiótico activo contra las bacterias Gram positivas "antibiótico Gram positivo". El antibiótico Gram positivo se puede seleccionar de uno o más del grupo que comprende daptomicina, clindamicina, rifampicina, eritromicina, oleandomicina, roxitromicina, azitromicina, kanamicina, gentamicina, tobramicina, estreptomycin, neomicina, paromomicina, etambutol, isoniazida, minociclina, tetraciclina.

20 El término "uno o más" agentes antibióticos incluye pero no se limita a uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, etc. agentes antibióticos. Se debe comprender que el experto en la técnica es capaz de determinar de manera empírica el número específico de agentes antibióticos necesarios para su uso de acuerdo con las realizaciones proporcionadas en la presente memoria y de acuerdo con lo conocido en la técnica.

25 Las presentes composiciones se pueden utilizar para tratar a un paciente que padece una enfermedad autoinmune en donde dicho paciente también pruebas positivas para la infección con la bacteria *Mycobacterium avium paratuberculosis* (MAP).

La enfermedad autoinmune puede ser esclerosis múltiple.

Aún más, la enfermedad autoinmune puede ser Tiroiditis de Hashimoto, síndrome de Melkersson-Rosenthal, Sarcoidosis u otras enfermedades similares.

30 En otra realización, el término enfermedad autoinmune incluye cualquiera de un gran grupo de enfermedades caracterizadas por un funcionamiento anormal del sistema inmunológico lo que da lugar a anticuerpos contra el tejido normal.

Los antibióticos o composiciones actualmente descritos se pueden administrar por vía oral. En forma alternativa, los antibióticos se pueden administrar por vía intravenosa.

Se contemplan otras vías de administración que incluyen, pero sin limitarse a, vías intramusculares e intraósea.

35 Cada antibiótico se puede administrar por separado. En forma alternativa, dos o más los antibióticos se pueden administrar de manera conjunta.

40 En una realización, las composiciones proporcionadas en la presente memoria comprenden por lo menos dos agentes antibióticos que se coformulan en una forma de dosificación única. En otra realización, la composición proporcionada en la presente memoria comprende por lo menos tres antibióticos que se coformulan en una forma de dosificación única.

En una realización, se coformulan cada uno de rifabutina, claritromicina, y clofazimina en una forma de dosificación única.

45 En forma alternativa, cada agente antibiótico se puede formular en una forma de dosificación por separado para los otros agentes antibióticos. En esta realización, se prevé que las formas de dosificación separadas se empaquetarían juntas en un kit para asegurar que cada una sea tomada por lo general al mismo tiempo por un paciente. En otra realización, dos de los agentes antibióticos se pueden formular en una primera forma de dosificación única y los agentes antibióticos restantes se pueden formular por separado en una segunda forma de dosificación que deben tomarse con la primera forma de dosificación.

50 En una realización, los presentes antibióticos y composiciones pueden estar disponibles en forma de una tableta que contiene por lo menos uno de rifabutina, claritromicina, y clofazimina en forma de polvo. En algunos casos dos de o los tres de rifabutina, claritromicina, y clofazimina se encuentran en forma de polvo. En forma alternativa, las presentes composiciones pueden estar en forma de una tableta o cápsula que contiene por lo menos uno de rifabutina, claritromicina, y clofazimina en una forma microencapsulada. En una realización, dos o todos de rifabutina, claritromicina, y clofazimina se encuentran en una forma microencapsulada.

- En una realización adicional, las presentes composiciones pueden estar en forma de una tableta o cápsula que contiene por lo menos uno de rifabutina, claritromicina, y clofazimina en forma de polvo, y los agentes restantes presentes en una forma microencapsulada. Como una posibilidad adicional, las presentes composiciones pueden estar en forma de una tableta o cápsula que contiene uno o más de rifabutina, claritromicina, y clofazimina presentes en una forma microgranulada. En las realizaciones adicionales, las presentes composiciones pueden estar en forma de una tableta que contiene uno o más de rifabutina, claritromicina, y clofazimina dentro de una cápsula, una cápsula que contiene uno o más de rifabutina, claritromicina, y clofazimina dentro de una tableta, una cápsula que contiene uno o más de rifabutina, claritromicina, y clofazimina dentro de una cápsula externa que contiene los otros agentes, o cualquier combinación de lo anterior.
- En una realización adicional, las presentes composiciones comprenden una cápsula interna que contiene rifabutina, dentro de una cápsula externa que contiene claritromicina y clofazimina, en donde la claritromicina y clofazimina pueden estar presentes en polvo, formas microencapsuladas o microgranuladas. Aún más, las presentes composiciones pueden comprender formas encapsuladas en liposoma, no encapsuladas o encapsuladas en liposomas recubiertas en polímero.
- Los presentes métodos se pueden llevar a cabo por medio de la administración de uno o más tabletas/cápsulas que contienen rifabutina, claritromicina, y clofazimina de acuerdo con lo descrito con anterioridad, o a través de la administración de cada una de éstas por separado. En las realizaciones preferidas, se administran en forma simultánea rifabutina, claritromicina, y clofazimina en una dosis.
- Las presentes composiciones se pueden preparar por medios conocidos en la técnica para la preparación de composiciones farmacéuticas que incluyen mezcla, molienda, homogeneización, suspensión, disolución, emulsión, dispersión, y, cuando sea apropiado, la mezcla de rifabutina, claritromicina, y clofazimina junto con excipientes, diluyentes, portadores y adyuvantes seleccionados.
- Para la administración oral, las presentes composiciones pueden estar en forma de tabletas, pastillas para chupar, píldoras, trociscos, cápsulas, elixires, polvos, que incluyen polvos liofilizados, soluciones, gránulos, suspensiones, emulsiones, jarabes y tinturas. Las presentes composiciones pueden comprender formas de liberación lenta o de liberación retardada por ejemplo en forma de partículas recubiertas, tabletas multicapa o microgránulos.
- Las formas sólidas de las presentes composiciones para la administración oral pueden contener agentes ligantes, edulcorantes, agentes desintegrantes, diluyentes, aromatizantes, agentes de recubrimiento, conservantes, lubricantes, y/o agentes de retardo de tiempo aceptables para uso farmacéutico. Los agentes ligantes incluyen goma arábiga, gelatina, almidón de maíz, goma tragacanto, alginato de sodio, carboximetilcelulosa o polietilenglicol (PEG, por su sigla en inglés).
- Los edulcorantes adecuados incluyen sacarosa, lactosa, glucosa, aspartamo o sacarina. Los agentes desintegrantes adecuados incluyen almidón de maíz, metilcelulosa, polivinilpirrolidona, goma de xantano, bentonita, ácido algínico o agar. Los diluyentes adecuados incluyen lactosa, sorbitol, manitol, dextrosa, caolín, celulosa, carbonato de calcio, silicato de calcio o fosfato dicálcico. Los agentes aromatizantes adecuados incluyen aceite de menta, aceite de gaulteria, aromatizante de cereza, naranja o frambuesa. Los agentes de recubrimiento adecuados incluyen polímeros o copolímeros de ácido acrílico y/o ácido metacrílico y/o sus ésteres, ceras, alcoholes grasos, zein, goma laca o gluten. Los conservantes adecuados incluyen benzoato de sodio, vitamina E, alfa-tocoferol, ácido ascórbico, metil parabeno, propilparabeno o bisulfito de sodio. Los lubricantes adecuados incluyen estearato de magnesio, ácido esteárico, oleato de sodio, cloruro de sodio o talco. Los agentes de retardo de tiempo adecuados incluyen monoestearato de glicerilo o diestearato de glicerilo.
- Las formas líquidas de las presentes composiciones para la administración oral pueden contener, además de los agentes anteriores, un portador líquido. Los portadores líquidos adecuados incluyen agua, aceites, tales como aceite de oliva, aceite de maní, aceite de sésamo, aceite de girasol, aceite de cártamo, aceite de cacahuete, aceite de coco, parafina líquida, etilenglicol, propilenglicol, polietilenglicol, etanol, propanol, isopropanol, glicerol, alcoholes grasos, triglicéridos, o mezclas de los mismos.
- Las suspensiones de las presentes composiciones para la administración oral pueden incluir además agentes dispersantes y/o agentes de suspensión. Los agentes de suspensión adecuados incluyen carboximetilcelulosa de sodio, metilcelulosa, hidroxipropilmetil-celulosa, polivinilpirrolidona, alginato de sodio o alcohol cerílico. Los agentes dispersantes adecuados incluyen lecitina, ésteres de polioxietileno de ácidos grasos tales como ácido esteárico, estearato o laurato, mono o dioleato de polioxietileno sorbitol, estearato o laurato, mono o dioleato de polioxietilensorbitano, y similares.
- Las emulsiones de las presentes composiciones para la administración oral pueden incluir además uno o más agentes emulsionantes. Los agentes emulsionantes adecuados incluyen agentes dispersantes de acuerdo con lo ejemplificado con anterioridad o gomas naturales tales como goma arábiga o goma tragacanto.
- Cada antibiótico se puede administrar diariamente. En forma alternativa, cada antibiótico se puede administrar dos veces al día. En otra realización, cada antibiótico se puede administrar tres veces al día. En una realización adicional, cada antibiótico se puede administrar a partir de lo siguiente: cada 3 horas, cada 4 horas, cada 5 horas,

5 cada 6 horas, cada 7 horas, cada 8 horas, cada 9 horas, cada 10 horas, cada 11 horas o cada 12 horas. La administración de dichos antibióticos puede ser durante un periodo de 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, 5 semanas, 6 semanas, 7 semanas, 8 semanas o mayor. Se debe apreciar que el periodo de tratamiento puede continuar durante 3 meses, 4, meses, 5 meses, 6 meses, 7 meses, 8 meses, 9 meses, 10 meses, 11 meses o 1 año o más.

10 La dosificación de claritromicina puede ser de 250 mg a 1,5g por día, en forma más típica aproximadamente 950 mg por día. Dichos 950 mg se pueden administrar en 95 mg cápsulas, lo que requiere diez cápsulas por día. La dosificación típica de rifabutina es de 150 mg a 750 mg por día, en forma más típica aproximadamente 450 mg por día. La dosificación típica de clofazimina es de 50 a 500 mg por día. En forma típica la dosificación de clofazimina es aproximadamente 100 mg/día. Dichos 100 mg se pueden administrar en 10 mg cápsulas, diez veces por día. La dosificación de clofazimina además se puede calcular por peso y puede ser de aproximadamente 1mg/kg a aproximadamente 6mg/kg, en forma más típica aproximadamente 2mg/kg.

En niños, se prevén las siguientes dosis (en mg/día):

Peso del niño (kg)	15-30	30-45
Claritromicina	225-550	450-675
Clofazimina	50	75
Rifabutina	258	180

15 En una realización adicional, se puede seguir la dosificación de refuerzo en niños.

Por ejemplo:

Antibiótico	Número de cápsulas									
Claritromicina	95	190	285	380	475	570	665	760	855	950
Clofazimina	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
Rifabutina	45	90	135	180	225	270	315	360	405	450

Peso del niño 15-29,9 kg

- 20 **Semanas 1, 2 y 3= 1 cápsula al día**
- Semanas 4 y 5 = 1 cápsula dos veces al día (BID)**
- Semanas 6 y 7 = 3 cápsula al día**
- Semanas 8 en adelante = 2 cápsula dos veces al día (BID)**

Peso del niño 30-45 kg

- 25 **Semana 1 = 1 cápsula al día**
- Semanas 2 y 3 = 1 cápsulas dos veces al día (BID)**
- Semanas 4 y 5 = 3 cápsulas al día**
- Semanas 6 y 7 = 2 cápsulas dos veces al día (BID)**
- Semanas 8 en adelante = 5 cápsulas al día**

Peso del niño > 45 kg

- 30 **Semana 1 = 1 cápsula dos veces al día (BID)**
- Semanas 2 y 3 = 2 cápsulas dos veces al día (BID)**
- Semanas 4 y 5 = 3 cápsulas dos veces al día (BID)**
- Semanas 6 y 7 = 4 cápsulas dos veces al día (BID)**
- Semanas 8 en adelante dosis de 5 cápsulas dos veces al día (BID).**

5 Por lo menos un antibiótico se puede coformular con un potenciador de la absorción que puede mejorar la biodisponibilidad de dicho antibiótico. La cantidad de potenciador de la absorción puede estar entre 300-700% p/p en relación con la cantidad de antibiótico. En ciertas realizaciones, el potenciador de la absorción es polietilenglicol. En un ejemplo, el polietilenglicol tiene un peso molecular promedio de entre 200-20.000 (tal como, entre 1000-15000, 5000-12000, 7000-9000, o 7500-8500).

10 En una realización adicional, un método de formulación de las presentes composiciones incluye la dispersión de por lo menos dicha clofazimina en PEG para formar una dispersión de PEG/clofazimina y posteriormente mezclar dicha dispersión de PEG/clofazimina con por lo menos uno de dichos otros agentes antibióticos. En una realización, la dispersión de PEG/clofazimina se mezcla con tanto claritromicina como rifabutina. De manera similar, la claritromicina o la rifabutina se puede dispersar primero en PEG y posteriormente se puede mezclar con los antibióticos restantes.

Las presentes composiciones pueden incluir además una vitamina. En una realización particular, las presentes composiciones incluyen Vitamina D.

15 Las presentes composiciones pueden incluir además un agente antiinflamatorio. El agente antiinflamatorio puede incluir ácido 5-aminosalicílico. En forma alternativa, el antiinflamatorio puede comprender Azatioprina. Otro antiinflamatorio puede comprender Metotrexato.

Las presentes composiciones pueden comprender además un inhibidor de quinasa dependiente de ciclina. Un ejemplo incluye R-roscovitina. Un ejemplo adicional incluye Flavopiridol.

20 Además, las presentes composiciones pueden comprender un inhibidor de transcripción de células T activado. Un ejemplo incluye Tacrolimus.

Se ha hallado que los pacientes con MS muestran elevaciones inmunológicas y de citocinas consistentes con las encontradas en las infecciones crónicas. La presente descripción se refiere al uso de propiedades inmunomoduladoras de los antibióticos como un enfoque terapéutico para atenuar la respuesta inflamatoria de un huésped, en particular en los casos de respuestas autoinmunes con el fin de tratar enfermedades autoinmunes.

25 Los antibióticos bacteriolíticos tales como B-lactámicos actúan por medio de la inhibición de la síntesis de la pared celular bacteriana, lo que conduce a la lisis del patógeno y, por lo tanto, a la liberación de componentes bacterianos proinflamatorios que dan lugar a un aumento de la mortalidad y las secuelas. Contrariamente a lo anterior, los antibióticos bactericidas tales como rifabutina previenen la explosión inflamatoria inicial. Los datos in vitro sugieren que la terapia con los antibióticos no bacteriolíticos provoca menos inflamación y podría mejorar el resultado de las infecciones graves.

30 Los antibióticos macrólidos tienen una acción inmunomoduladora superior. La claritromicina reduce la viabilidad bacteriana en correlación con una disminución en la síntesis de proteína bacteriana de acuerdo con lo mostrado por una acumulación intracelular dependiente del tiempo establecida en un número de infecciones bacterianas. Los macrólidos tales como la claritromicina inhiben la síntesis de especies reactivas de oxígeno y/o la secreción de citoquinas proinflamatorias in vitro mientras ejercen efectos variables en la liberación de citoquinas antiinflamatorias.

35 Se investigó el rol de las citoquinas inflamatorias en las enfermedades inflamatorias humanas y se evaluaron los efectos de la combinación de antibióticos en los niveles de proteína de las citoquinas.

40 De acuerdo con lo observado con anterioridad, la esclerosis múltiple es una enfermedad autoinmune que implica la destrucción de la vaina de mielina que rodea las neuronas en el cerebro y la médula espinal. Afecta el movimiento, la sensación y las funciones corporales y se caracteriza por la infiltración de células inflamatorias en el SNC. Su etiología incluye una combinación de factores genéticos y ambientales. Si bien su patogénesis necesita investigarse más, las infecciones microbianas y/o virales parecen contribuir a la enfermedad. Comúnmente afecta a adultos jóvenes, mujeres y los caucásicos de ascendencia del norte de Europa.

45 En la esclerosis múltiple, las proteínas de clase II del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC, por su sigla en inglés) expresadas en la superficie de células presentadoras de antígeno se unen a proteínas de mielina o a proteínas relacionadas con la mielina, lo que provoca que las células Th0 experimenten una activación y diferenciación. Las células Th1 luego cruzan la barrera hematoencefálica hacia el SNC, se insertan en complejos de antígeno-MHC y producen citoquinas proinflamatorias.

50 La encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE) es el modelo de ratón más comúnmente utilizado de esclerosis múltiple (MS) humana. Debido a sus muchas similitudes con MS, la EAE se utiliza para estudiar la patogénesis de la autoinmunidad, la inflamación del SNC, la desmielinización, el tráfico de células y la inducción de tolerancia.

55 Investigaciones recientes que involucran modelos animales de EAE señalan el rol de una cascada proinflamatoria de células Th17, IL-6 y TGF-β en el sistema nervioso central en la patogénesis de tanto EAE como MS. EAE muestra similitudes clínicas y patológicas con MS. El modelo de EAE es importante para la determinación de los tratamientos terapéuticos (la validez del objetivo, la evaluación de potenciales candidatos a fármacos, el modo de estudio

acelerado, el análisis de histopatología).

Ejemplo 1: Experimento de citoquina

Modelo de ratón - inmunización con MOG₃₅₋₅₅/CFA

5 El objetivo de este estudio fue determinar los efectos de una composición que comprende rifabutina, claritromicina y clofazimina de aquí en adelante denominada formulación RHB 104 en la producción de citoquina por medio de linfocitos T a partir del drenaje de ganglios linfáticos y el bazo después de la inmunización con MOG₃₅₋₅₅/CFA.

Las cápsulas RHB-104 comprenden 10 mg de clofazimina, 95 mg de claritromicina y 45 mg de rifabutina y junto con varios excipientes.

A continuación se proporciona la realización de la composición utilizada en este estudio y denominada RHB 104.

10 Composición de las cápsulas RHB-104

Componente (Grado)	Función	mg por cápsula	%
Clofazimina (USP/Ph.Eur.)	Activa	10,00	3,23
Rifabutina (USP/Ph.Eur.)	Activa	45,00	14,53
Claritromicina (USP/Ph.Eur.)	Activa	95,00	30,67
Polietilenglicol 8000 (NF/Ph.Eur.)	Agente de dispersión	50,00	16,14
Polisorbato 80 (NF/Ph.Eur.)	Agente humectante	6,66	2,15
Celulosa microcristalina 200 (NF/Ph.Eur.)	Diluyente	28,00	9,04
Estearato de magnesio, grado vegetal (NF/Ph.Eur.)	Lubricante	4,68	1,51
Lauril sulfato de sodio (NF/Ph.Eur.)	Agente humectante	10,00	3,23
Celulosa microcristalina 200	Diluyente	60,42	19,51
Cápsula de gelatina dura (Mfg.Std)	-	1 unidad	
Total		309,76	100

Diseño experimental

Hubo 3 grupos experimentales con 4 ratones/grupo.

15 Se indujo la enfermedad por medio de la inmunización de los ratones en el Día 0 con glicoproteína de oligodendrocito de mielina, el péptido 33-55 (MOG₃₅₋₅₅) emulsionado en un adyuvante completo de Freund (CFA, por su sigla en inglés) y se inició el tratamiento en el mismo día. Once días después de la inmunización, se sacrificaron los ratones, se recolectaron los bazos y los ganglios linfáticos y se prepararon suspensiones celulares. Se cultivaron las suspensiones celulares durante 3 días en la presencia de múltiples concentraciones de MOG₃₅₋₅₅. Se recolectaron los sobrenadantes del cultivo al final de este periodo de cultivo de 3 días. Se determinaron las
20 concentraciones de 7 citoquinas (IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17A, TNF-alfa y IFN-γ) en los sobrenadantes del cultivo por medio de los kits del ensayo de perlas de citoquinas (CBA, por su sigla en inglés) Th1/Th2/Th17 de Becton Dickinson.

Ratones e inmunización

El estudio utilizó un total de 12 ratones C57BL/6 hembras (Taconic Farms, 14 semanas de edad).

25 En el Día 0, se inmunizaron los ratones en dos lugares en la espalda s.c. con MOG₃₅₋₅₅/CFA.

Grupos y tratamiento

Se inició el tratamiento en el Día 0 (día de inmunización) y se continuó hasta que se sacrificaron los ratones en el Día 11.

Grupo 1 — Vehículo, 10 ml/kg, p.o., BID (control negativo)

30 Grupo 2 — RHB-104, 36 mg/kg, p.o., BID, 10 ml/kg

Grupo 3 — RHB-104, 36 mg/kg, p.o., QD, 10 ml/kg

Dosificación AM: RHB-104, 36 mg/kg, p.o., QD, 10 ml/kg

Dosificación PM: Vehículo, QD, 10 ml/kg (control para la tensión de dosificación)

Todas las dosificaciones se llevaron a cabo al mismo tiempo (+/- 1 hora) cada día. Hubo por lo menos 10 horas entre la dosificación de la mañana y la noche y no más de 14 horas entre la dosificación de la noche y la mañana.

Se sacrificaron todos los ratones 1 a 4 horas después de la dosis de la mañana en el Día 11.

5 Cultivos de células del bazo y ganglio linfático

Se recolectaron los bazos de todos los ratones, se agruparon para cada grupo, y se prepararon suspensiones celulares.

Se recolectaron los ganglios linfáticos inguinales de todos los ratones, se agruparon para cada grupo, y se prepararon suspensiones celulares.

10 De cada suspensión celular, se prepararon los cultivos en placas de 96 pocillos con cinco concentraciones de MOG₃₅₋₅₅; ninguno, 0,7, 2,2, 6,7, y 20,0 µg/ml, todo por triplicado.

Después de 72 horas de cultivo, se recolectaron los sobrenadantes.

15 Se midieron las concentraciones de citoquina en cada cultivo por medio del kit CBA Th1/Th2/Th17 (El kit de ratón de la matriz de perlas citométrica (CBA, por su sigla en inglés) BD™ Th1/Th2/Th17, Becton Dickinson). Este kit permite la medición simultánea de 7 concentraciones de citoquina diferentes (IL-10, IL-4, IL-2, IL-17A, IFN-γ, TNF-alfa, IL-6).

Resultados

1) Citoquina IL-10

IL-10 estuvo por debajo del intervalo estándar, por lo que no se pudo observar ningún cambio.

2) Citoquina IL-17 A

20 La dosificación con RHB-104 BID demostró una reducción en los niveles de citoquina en los ganglios linfáticos y en menor medida en el bazo de acuerdo con lo visto en la Figura 1.

3) Citoquina TNF-alfa

25 La dosificación de RHB-104 BID y QD redujo TNF-alfa en el bazo. En forma adicional, la dosificación de BID redujo TN-alfa en los ganglios linfáticos. la reducción de la dosificación de BID del TNF-alfa en el bazo fue casi 50% de acuerdo con lo mostrado en la Figura 2.

4) Citoquina IFN-gamma

RHB-104 redujo IFN-gamma para la dosificación de BID en el bazo de acuerdo con lo mostrado en la Figura 3:

5) Citoquina IL-6

30 La dosificación de RHB 104 BID en el bazo mostró una reducción de casi 50% de IL-6 en el bazo de acuerdo con lo mostrado en la Figura 4.

6) Citoquina IL-4

IL-4 estuvo por debajo de la detección estándar.

7) Citoquina IL-2

35 RHB-104 redujo IL-2 en la dosificación de QD en tanto el bazo como los ganglios linfáticos de acuerdo con lo mostrado en la Figura 5.

El efecto de la formulación de RHB 104 que comprende rifabutina, claritromicina y clofazimina en los niveles de citoquina en el modelo de ratón anterior apoyó un análisis adicional un modelo de ratón EAE que es un modelo muy reconocido para MS humana.:

Experimento 2: Evaluación de la eficacia de RHB 104 administrado en un modelo de ratón de EAE.

40 Antecedentes y visión general del modelo EAE

Inducción de EAE

Se desarrolla EAE crónica en ratones C57BL/6 después de la inmunización con una emulsión de MOG₃₅₋₅₅/CFA o MOG₁₋₁₂₅/CFA seguido de la inyección de la toxina pertussis. Este modelo se utiliza para probar el potencial de los

compuestos para prevenir o mitigar la enfermedad EAE. Se puede ejecutar con el compuesto dosificado desde el momento de la inmunización (tratamiento profiláctico), o con el objetivo de revertir el curso de la enfermedad y facilitar la recuperación por medio de la dosificación del compuesto desde el momento de la aparición de EAE (tratamiento terapéutico).

- 5 El modelo utiliza ratones C57BL/6 hembras 10 a 14 semanas de edad en el inicio del estudio. En forma típica, la EAE se desarrolla de 8-18 días después de la inmunización. El desarrollo de EAE por lo general se sigue durante 4 semanas (28 días) después de la inmunización.

10 La tensión reduce la susceptibilidad del ratón a EAE. Aparte de cualquier efecto del compuesto, el tratamiento de administración durante el periodo de inducción de la enfermedad (~0-10 días después de la inmunización) Pospone la aparición de la enfermedad y reduce la gravedad de la enfermedad. Esto es debido a la tensión de la administración del compuesto y los efectos del vehículo en los ratones. Cuanto más frecuente sea la administración y menos tolerado el vehículo, mayor será el impacto en el desarrollo de la enfermedad.

La tensión del tratamiento y la administración del vehículo tienen mucho menos efecto sobre el desarrollo de la enfermedad después de que han aparecido signos clínicos de EAE.

15 **Tratamiento profiláctico**

En los estudios profilácticos, el tratamiento comienza antes de la aparición de la enfermedad, en el momento de la inmunización y la asignación de grupos. Los ratones se asignan a los grupos de tratamiento de una manera equilibrada para lograr grupos con distribuciones similares de pesos corporales.

20 Los estudios profilácticos evalúan si el tratamiento afectará el curso de la enfermedad tanto antes como después de los primeros signos clínicos de EAE.

Para compensar la tensión del tratamiento en los estudios del tratamiento profiláctico y lograr la gravedad de la enfermedad diana, se induce EAE con una mayor dosis de toxina pertussis que la utilizada en los estudios terapéuticos. La dosis de toxina pertussis está basada en la tensión esperada debido a la dosificación (la vía, la frecuencia, y la formulación del vehículo).

25 En los estudios profilácticos, el tiempo medio de la aparición de la enfermedad suele ser la medida más sensible de la eficacia del compuesto.

Pequeños cambios en la respuesta inmune pueden dar lugar al aplazamiento de la aparición de la enfermedad - la supresión de la activación y proliferación de células T, una presentación antigénica, la diferenciación en las células Th1 y/o Th17 darán lugar al aplazamiento de la aparición de EAE.

30 La aparición tardía de EAE acompañada de una gravedad máxima más baja indica la eficacia global del tratamiento en comparación con el grupo de control negativo.

Tratamiento terapéutico

35 En los estudios del tratamiento terapéutico, el tratamiento comienza en el momento de la aparición de EAE. Los ratones se distribuyen diferentes grupos de tratamiento a medida que desarrollan EAE (registro de inscripción) de una manera equilibrada para lograr grupos con tiempo similar de la aparición de EAE y puntuaciones de aparición similares.

Los estudios terapéuticos evalúan si el tratamiento va a revertir el curso de la enfermedad o mejorar la recuperación de EAE.

40 La lectura más importante en este modelo es la puntuación media de EAE clínica final. Este es el resultado clínico del experimento; una reducción en comparación con el grupo de control negativo indica la eficacia del tratamiento.

Curso de desarrollo de EAE en ratones no tratados

45 Los ratones individuales tendrán diferentes cursos de enfermedad. La mayoría de los ratones muestran signos iniciales de EAE entre 9 y 14 días después de la inmunización. Una vez que la EAE comienza, el pico de la enfermedad casi siempre se produce 3-4 días después. La puntuación máxima continúa durante varios días y luego los ratones se recuperan de manera parcial. En algunos ratones, la enfermedad se mantendrá en la máxima gravedad hasta el final del estudio. Con menos frecuencia, el ratón permanecerá en la gravedad máxima durante únicamente un día y luego comenzará a recuperarse.

50 El grado de recuperación depende en gran medida de la gravedad máxima alcanzada por el ratón. La mayoría de los ratones no tratados o tratados con el vehículo no se recuperarán por completo, pero su puntuación final por lo general será 0,5 a 1,5 puntos más baja que su puntuación máxima. Aproximadamente 25% los ratones no tratados o tratados con el vehículo muestran un empeoramiento de EAE entre 24 y 28 días después de la inmunización, lo que se asemeja a una recaída. Las médulas espinales de estos ratones en el momento del empeoramiento de EAE tienen

un número grande de focos inflamatorios (> 7 focos por sección), similar a los hallazgos histológicos en el momento de la aparición y pico de EAE, lo que sugiere que éstas son verdaderas recaídas con una nueva ola de inflamación en las médulas espinales.

5 Cuando se siguen los ratones durante un periodo de tiempo más largo, la enfermedad aumenta lentamente en gravedad, lo que se asemeja al curso progresivo crónico de la enfermedad observada en los pacientes de MS humana.

10 Durante el curso de EAE, los cambios en el peso corporal reflejan la gravedad de la enfermedad. Los ratones a menudo pierden una pequeña cantidad de peso en el día siguiente a la inmunización. Esto parece ser debido a los efectos del adyuvante administrado y la toxina pertussis. Luego los ratones aumentan de manera constante su peso corporal hasta la aparición de la enfermedad. En el día de la aparición de EAE, los ratones constantemente pierden 1-2 g de su peso corporal (5-10% de peso corporal). La pérdida de peso continúa con la progresión de la gravedad de EAE, con una pérdida que alcanza alrededor del 20% de peso corporal antes de la aparición en el pico de la enfermedad. La pérdida de peso es más probable debido a la parálisis y la reducción de la ingesta de alimentos al igual que la alta producción de citoquinas proinflamatorias tales como TNF durante la fase aguda de la inflamación.

15 Después de que se alcanza el pico de la enfermedad, los ratones ganan peso lentamente, incluso si su puntuación clínica no mejora. Este aumento de peso se puede deber a la regulación de la inflamación cuyos resultados en los niveles inferiores de citoquinas proinflamatorias en sangre. Los ratones no tratados o tratados con el vehículo por lo general tienen alrededor del 90% de su peso corporal de preinmunización 28 días después de la inmunización.

Histología

20 La inflamación en EAE normalmente comienza en la región lumbar de la médula espinal, que se extiende a toda la médula espinal por el pico de la enfermedad.

25 En la aparición de la enfermedad el número de focos inflamatorios se correlaciona fuertemente con la gravedad de la enfermedad. El número de focos aumenta hasta el pico de la enfermedad, cuando en forma típica se encuentran 6-15 focos inflamatorios/sección en toda la médula espinal. En la fase crónica de EAE (que comienza varios días después del pico de la enfermedad), se resuelven muchos focos inflamatorios, en forma típica lo que da lugar a 3-4 focos inflamatorios en cada sección de la médula espinal por aproximadamente 28 días después de la inmunización.

30 Debido a los números más grandes de focos inflamatorios están presentes temprano en el curso de la enfermedad, si el análisis histológico se lleva a cabo al final del estudio, los ratones que tienen una aparición tardía de EAE a menudo tienen más focos inflamatorios en sus médulas espinales que lo que podría esperar de su puntuación clínica. Por ejemplo, en un estudio de 28 días un ratón con una aparición de EAE a los 27 días después de la inmunización y una puntuación clínica final de 2 probablemente tendrá más focos inflamatorios que un ratón con una aparición de EAE 9 días después de la inmunización y una puntuación final de 3,5. De manera similar, un ratón que tiene una recaída poco antes del final del estudio (recaída se define como 1 o más puntos de aumento en la puntuación clínica) por lo general tendrá más focos inflamatorios al final del estudio que un ratón con una enfermedad crónica estable, incluso si los dos tienen la misma puntuación clínica al final del estudio.

35

La desmielinización por lo general no se encuentra durante los primeros dos días después de la aparición de la enfermedad, pero se encuentra en el pico de la enfermedad (4-5 días después de la aparición de EAE) y continúa durante la fase crónica de EAE. Las puntuaciones de desmielinización no cambian mucho entre el pico y 28 días después de la inmunización y por lo general promedian entre 1,2 y 2,5.

40 La desmielinización se puntúa en tanto las secciones manchadas con azul rápido Luxol (LFB, por su sigla en inglés) y en las secciones H y E.

En las secciones LFB, la materia blanca de la médula espinal se mancha de color azul oscuro y las áreas desmielinizadas son de un color azul más claro, y se asocian con grandes vacuolas.

45 En las secciones H y E manchadas la interrupción de la estructura normal con grandes vacuolas es indicativa de desmielinización.

Las células apoptóticas se identifican en las secciones H y E, y por lo general no se encuentran durante los primeros dos días del desarrollo de la enfermedad. Se encuentran en el pico y durante la fase crónica de EAE. El número promedio de células apoptóticas por lo general se encuentra entre 2 y 4 por sección.

Diseño experimental

50 Los ratones se pesaron antes del inicio del estudio y luego se asignaron a los grupos de una manera equilibrada. El compuesto se inició el tratamiento en el día de inmunización (Día 0 del estudio).

Se indujo la enfermedad por medio de la inmunización de los ratones en el Día 0 con glicoproteína de oligodendrocito de mielina, el péptido 35-55 (MOG₃₅₋₅₅) emulsionado en un adyuvante completo de Freund (CFA), seguido de dos inyecciones de toxina pertussis (administradas en los Días 0 y 1).

Para evaluar el desarrollo de la enfermedad, los ratones se pesaron tres veces por semana (lunes, miércoles y viernes) desde el momento de la inmunización y se puntuaron diariamente para los signos clínicos de EAE que comienza en el Día 7.

Materiales y métodos

5 Ratones

El estudio utilizó un total de 24 ratones C57BL/6 hembras (Taconic Farms, 10 semanas de edad).

Grupos y tratamiento

Los ratones se asignaron a los grupos de una manera equilibrada para lograr un peso similar en el inicio del estudio.

La Tabla 1 a continuación muestra qué tratamiento se administró a cada grupo.

10 **Tabla 1 - Inmunización y régimen de tratamiento**

Grupo	Compuesto	Dosis	Frecuencia	Propósito
1	Vehículo	-	ID	Control negativo
2	RHB-104	36 mg/kg	BID	Compuesto de prueba

Cada grupo consistió en 12 ratones.

El tratamiento de todos los grupos fue p.o., BID a un volumen de 10 ml/kg.

15 Se inició el tratamiento en el día de inmunización (Día 0) y duró hasta el Día 27 después de la inmunización. Todas las dosificaciones se llevaron a cabo al mismo tiempo (+/- 1 hora) cada día. No hubo más de 14 horas entre la dosis de la noche y de la mañana y no menos de 10 horas entre la dosis de la mañana y de la noche.

Inducción de EAE

Se indujo EAE en 24 ratones C57BL/6 hembras (10 semanas de edad) de la siguiente manera:

Día 0, Hora 0 — Inmunización con MOG₃₅₋₅₅/CFA

20 *Día 0, Hora 2 — Inyección de toxina pertussis*

Día 1, Hora 0 — 2ª inyección de toxina pertussis (24 horas después de la inmunización inicial)

25 Los ratones se inyectaron por vía subcutánea en dos lugares en la espalda con el componente de emulsión modificado del kit (que contiene MOG₃₅₋₅₅). Un sitio de la inyección fue en la zona de la espalda superior, aproximadamente 1 cm de caudal de la línea del cuello. El segundo sitio fue en la zona de la espalda inferior, aproximadamente 2 cm de craneal de la base de la cola. El volumen de inyección fue 0,1 ml en cada sitio.

Dentro de 2 horas de la inyección de emulsión, y luego de nuevo 24 horas después de la inyección de emulsión, se administró el componente de toxina pertussis del kit por vía intraperitoneal. El volumen de cada inyección fue 0,1 ml.

Puntuación y lectura

Las lecturas fueron puntuaciones de EAE y el peso corporal al final del estudio.

30 Los ratones se puntuaron diariamente desde el Día 7 hasta el final del estudio, y el peso corporal se midió tres veces/semana (lunes, miércoles y viernes), comenzando en el Día -1.

El último día de puntuación fue el Día 28 después de la inmunización.

La puntuación se llevó a cabo a ciegas, por una persona no consciente del tratamiento y de las puntuaciones anteriores para cada puntuación de ratón para cada ratón.

35 *Puntuación de EAE*

Se puntuó EAE en una escala de 0 a 5:

Puntuación de 0.

No hay cambios obvios en las funciones motoras del ratón en comparación con los ratones no inmunizados.

Cuando se recogen por la cola, la cola tiene tensión y está erecta. Por lo general las patas traseras están separadas.

Cuando el ratón está caminando, no hay marcha o inclinación de la cabeza.

Puntuación de 1.

5 Cola débil.

Cuando el ratón se recoge por la cola, en lugar de estar erecta, la cola entera cubre el dedo.

Puntuación de 2.

Cola débil y debilidad de las patas traseras.

10 Cuando el ratón se recoge por la cola, las patas no están separadas, pero se mantienen cerca. Cuando se observa que el ratón camina, tiene una clara y evidente caminata tambaleante.

Puntuación de 3.

Cola débil y parálisis completa de las patas traseras (más común); o

Cola débil con parálisis de una parte delantera y una pata trasera; o

Todos de:

15 Inclinación grave de la cabeza,

Caminar únicamente a lo largo de los bordes de la jaula,

Empuje contra la pared de la jaula,

Gira al recogerlo por la cola.

Puntuación de 4.

20 Cola débil, parálisis completa de las patas traseras y parcial de las patas delanteras.

El ratón se mueve mínimamente alrededor de la jaula pero parece estar alerta y alimentándose.

Por lo general, se recomienda la eutanasia después de que el ratón tenga la puntuación de nivel 4 durante 2 días. Cuando el ratón es sacrificado debido a la parálisis grave, se introduce la puntuación de 5 para ese el ratón durante el resto del experimento.

25 **Puntuación de 5.**

Parálisis completa de las patas traseras y completa de las patas delanteras, sin movimiento alrededor de la jaula; o

El ratón está rodando espontáneamente en la jaula; o

Se encuentra muerto al ratón debido a la parálisis.

30 Las puntuaciones intermedias se asignaron cuando los signos clínicos entraron entre dos puntuaciones definidas con anterioridad.

Análisis histológico de las médulas espinales

En el Día 28 (final del estudio) se sacrificaron todos los ratones para el análisis histológico.

Los ratones se perfundieron con PBS y se recolectaron las espinas en formalina tamponada al 10%.

35 Para cada ratón, se prepararon y se analizaron 3 secciones manchadas con azul rápido Luxol y 3 secciones H y E, de la médula espinal lumbar, torácica y cervical.

El análisis histológico se llevó a cabo por un patólogo cegado a los grupos experimentales y todas las lecturas clínicas.

Conteo de los focos inflamatorios

40 Se contaron los focos inflamatorios de aproximadamente 20 células en cada sección manchada H & E. Cuando los infiltrados inflamatorios consistieron en más de 20 células, se realizó una estimación de cuántos focos de 20 celdas

estuvieron presentes.

Estimación del área desmielinada

La puntuación de desmielinización representa una estimación del área desmielinada para cada sección de la siguiente manera:

- 5 0 — sin desmielinización (menos del 5% de área desmielinizada)
- 1 — 5 a 20% de área desmielinizada
- 2 — 20 a 40% de área desmielinizada
- 3 — 40 a 60% de área desmielinizada
- 4 — 60 a 80% de área desmielinizada
- 10 5 — 80 a 100% de área desmielinizada

Para las diapositivas manchadas con azul rápido Luxol, el tamaño del área desmielinizada se estimó sobre la base de una tinción de azul menos intensa de mielina.

Para las secciones H y E manchadas, el área desmielinizada se estimó por medio de la búsqueda de la interrupción de la estructura normal — la palidez y vacuolación consistentes con edema y desmielinización y axones dilatados.

15 *Conteo de células apoptóticas*

Se determinó el número de células apoptóticas en cada una de las tres secciones H y E. Las células apoptóticas son neuronas y su número se correlaciona con las fases de la enfermedad. Las células apoptóticas aparecen poco después de la aparición de la enfermedad, por lo que en la aparición de EAE habrá muchos focos inflamatorios, pero pocas células apoptóticas. Luego, el número de células apoptóticas aumenta hasta el pico de la enfermedad, luego se mantiene elevado.

20

Análisis estadístico

El análisis estadístico se llevó a cabo de la siguiente manera:

La incidencia de la enfermedad se comparó por medio de la prueba de ji-cuadrado

El día medio de la aparición de EAE se comparó por medio de la prueba de supervivencia de Wilcoxon

- 25 El día promedio de la aparición de EAE se comparó por medio de la prueba t de Student de dos colas

La puntuación máxima media (MMS, por su sigla en inglés) se comparó por medio de la prueba de suma de rangos de Wilcoxon

La puntuación final se comparó por medio de la prueba de suma de rangos de Wilcoxon

El cambio en el peso corporal se comparó por medio de la prueba t de Student de dos colas

- 30 Las puntuaciones de desmielinización (LFB) se compararon por medio de la prueba no paramétrica de Wilcoxon

Las puntuaciones de desmielinización (H y E) se compararon por medio de la prueba no paramétrica de Wilcoxon

El número de células apoptóticas se comparó por medio de la prueba t de Student de 2 colas

Resultados e interpretación de los datos

El desarrollo de EAE se evaluó por medio de la comparación de:

- 35 la incidencia de EAE,
- el día medio y promedio de la aparición de EAE (MME),
- puntuación máxima media (MMS),
- las puntuaciones promedio de EAE al final del estudio, y
- el peso corporal promedio al final del estudio en relación con el peso inicial
- 40 entre el grupo del vehículo (control negativo) y el grupo RHB-104

Resumen de los resultados - Hallazgos Clínicos

Tabla 2

Tratamiento	Incidencia de EAE (%)	valor p	MME	valor p	MMS +/- SD	valor p	Puntuación final +/- SD	valor p	% final de peso corporal +/- SD	valor p
Vehículo	100,0%		15,0		3,08 +/- 0,87		2,54 +/- 1,05		90,7 +/- 7,5	
RHB-104	100,0%	1,0000	15,0	0,7617	2,33 +/- 0,65	0,0031	0,92 +/- 0,67	0,0011	105,2 +/- 3,8	0,0000

Grupo 1: Vehículo grupo, p.o., BID (control negativo)

- 5 La mayoría de los ratones en este grupo desarrollaron EAE grave (Tabla 1 y Figura 6).
 La mayoría de los ratones en este grupo perdieron peso durante este estudio, lo cual se esperaba (Tabla 1 y Figura 7)
 No murieron ratones en este grupo.

Grupo 2: RHB-104, 36 mg/kg, p.o., BID

- 10 La mayoría de los ratones en este grupo desarrollaron una enfermedad más leve que la observada en el grupo del vehículo.
 Este grupo se mejoró de manera significativa en la mayoría de las lecturas clínicas de EAE en comparación con el grupo del vehículo (Tabla 1 y Figuras 6 y 7).
 No murieron ratones en este grupo.
- 15 Los resultados anteriores observados muestran un efecto marcado en relación con la gravedad de la enfermedad por medio de los indicadores mencionados con anterioridad luego del tratamiento con RHB 104 cuando se comparan con un control en el modelo de ratón de MS humana reconocida.

Resumen de los resultados - Hallazgos histológicos

Tabla 3

Tratamiento	Focos inflamatorios +/- SD	valor p	Desmielinización (LFB) +/- SD	Valor p	Desmielinización (H y E) +/- SD	Valor p	Células apoptóticas +/- SD	Valor p
Vehículo	3,2 +/- 2,2		1,7 +/- 0,7		1,4 +/- 0,6		3,1 +/- 1,2	
RHB-104	1,8 +/- 1,6	0,0867	0,6 +/- 0,6	0,0018	0,8 +/- 0,5	0,0198	1,4 +/- 1,7	0,0093

- 20
- Ratones tratados con el vehículo**
- Los hallazgos histológicos en los ratones tratados con el vehículo fueron típicos para esta fase y la gravedad de EAE. Las imágenes de bajo aumento de secciones torácicas y lumbares representativas de la médula espinal de los ratones tratados con el vehículo mostraron que la inflamación estuvo presente en las leptomeninges y en la materia blanca. No murieron ratones en este grupo.

Ratones tratados con RHB 014

- De acuerdo con los hallazgos clínicos, la mayoría de las lecturas histológicas en estos ratones fueron indicativas de una enfermedad significativamente menos grave que en los ratones tratados con el vehículo. Las imágenes de bajo aumento de secciones torácicas y lumbares representativas de la médula espinal de los ratones tratados con RHB-104 mostraron menos focos inflamatorios en estas secciones que en las secciones de los ratones tratados con el vehículo. En adición, los focos inflamatorios fueron más pequeños los ratones tratados con RHB-104 que en los ratones tratados con el vehículo.
- Las áreas desmielinizadas fueron significativamente más pequeñas en los ratones tratados con RHB-104 que en los ratones tratados con el vehículo. No murieron ratones en este grupo.
- 35 El número promedio de focos inflamatorios detectados en las secciones H y E se muestra en la Figura 8 y la

puntuación media de desmielinización de las secciones de color azul rápido Luxol se muestra en la Figura 9.

De acuerdo con los hallazgos clínicos, las lecturas histológicas en estos ratones fueron indicativas de una enfermedad significativamente menos grave que en los ratones tratados con el vehículo. Se encontraron menos focos inflamatorios en los ratones tratados con RHB 104 que en las secciones de los ratones tratados con el vehículo. En adición, los focos inflamatorios fueron más pequeños los ratones tratados con RHB-104 que en los ratones tratados con el vehículo.

Las áreas desmielinizadas fueron significativamente más pequeñas en los ratones tratados con RHB-104 que en los ratones tratados con el vehículo. Todos estos hallazgos confirman la observación clínica de que los ratones tratados con RHB-104 tuvieron una EAE significativamente menos grave que los ratones tratados con el vehículo al final del estudio del modelo de ratón de MS.

Experimento 3: Estudio de la recaída de EAE.

El modelo se asemeja más fuertemente a la forma remitente-recidivante de MS (la forma más común de MS).

Como antecedente del modelo, se debe comprender que los ratones desarrollan un primer episodio de parálisis 11-14 días después de la inmunización en un modelo EAE y, de modo similar, para la mayoría de los pacientes con MS, se recuperan total o casi completamente de esta primera oleada de parálisis. Después de un periodo libre de enfermedad de 1-2 semanas, 50 a 100% de los ratones desarrollan una segunda oleada de parálisis (recaída).

Este modelo se utiliza para probar el efecto de los compuestos en el desarrollo de las recaídas de EAE (tratamiento terapéutico). El tratamiento se puede iniciar en la aparición de signos clínicos de EAE, o en el inicio de la recuperación de la primera oleada de EAE. Este modelo se ejecuta en forma típica durante 5 a 7 semanas, pero a veces los ratones se observan más tiempo.

Diseño del experimento

Se indujo la enfermedad por medio de la inmunización de los ratones en el Día 0 con el péptido PLP₁₃₉₋₁₅₁ emulsionado en un adyuvante completo de Freund (CFA).

Para evaluar el desarrollo de la enfermedad, los ratones se pesaron tres veces por semana (lunes, miércoles y viernes) desde el momento de la inmunización y se puntuaron diariamente para los signos clínicos de EAE comenzando en el Día 9.

El registro de los ratones en los grupos se produjo en el segundo día de los signos clínicos de EAE para cada ratón. Los ratones se registraron en los grupos de tratamiento a medida que desarrollaban signos de EAE (registro de inscripción).

Asignación de grupos y tratamiento

Inicialmente todos los ratones se consideraron como un solo grupo. La puntuación diaria comenzó en el Día 9 después de la inmunización.

El registro de los ratones en los grupos se produjo en el segundo día de los signos clínicos de EAE para cada ratón. Los ratones se registraron en los grupos de tratamiento a medida que desarrollaban signos de EAE (registro de inscripción).

Se registraron 45 ratones en 3 grupos de 15 y se inició el tratamiento en el día de registro. Se equilibró la asignación para lograr puntuaciones similares entre los grupos en el registro.

7 ratones que desarrollaron la enfermedad más reciente, o que tenían síntomas inusuales, no se registraron en los grupos y no se utilizaron en el estudio.

Grupos

Grupo 1 – Vehículo (PBS), p.o., BID, 5 ml/kg (control negativo)

Grupo 2 – tratado con FTY-720 (Fingolimod, Gilenya) 3 mg/kg, p.o., QD (un fármaco utilizado para el tratamiento de MS y utilizado como un control positivo)

Grupo 3 – tratado con RHB-104, p.o., BID, 5 ml/kg

Tratamiento

Se inició el tratamiento en el día de registro y se continuó hasta el Día 39.

Todas las dosificaciones se llevaron a cabo al mismo tiempo (+/- 1 hora) cada día. Hubo por lo menos 10 horas entre la dosificación de la mañana y la noche y no más de 14 horas entre la dosificación de la noche y la mañana.

El último día de dosificación fue el Día 39 para todos los ratones.

Puntuación y lectura

Los ratones se puntuaron diariamente desde el Día 9 al Día 40, y el peso corporal se midió tres veces/semana (lunes, miércoles y viernes), comenzando antes de la inmunización (Día -1).

- 5 La puntuación se llevó a cabo a ciegas, por una persona no consciente del tratamiento y de las puntuaciones anteriores para cada puntuación de ratón para cada ratón.

Las lecturas fueron puntuaciones de EAE en la escala de 0-5 en incrementos de 0,5 unidades, y cambios en el peso corporal.

Puntuación de EAE

- 10 EAE se puntuó en una escala de 0 a 5 de acuerdo con lo descrito con anterioridad.

Análisis estadístico

Análisis estadístico se llevó a cabo de la siguiente manera:

El día medio de la aparición de EAE se comparó por medio de la prueba de supervivencia de Wilcoxon

El día promedio de la aparición de EAE se comparó por medio de la prueba t de Student de dos colas

- 15 La puntuación máxima media (MMS) de la primera oleada se comparó por medio de la prueba de suma de rangos de Wilcoxon

La incidencia de recaída se comparó por medio de la prueba de ji-cuadrado

La puntuación máxima media (MMS) de recaída se comparó por medio de la prueba de suma de rangos de Wilcoxon

- 20 La Puntuación final se comparó por medio de la prueba de suma de rangos de Wilcoxon

El cambio en el peso corporal se comparó por medio de la prueba t de Student de dos colas

Resultados

8 ratones en el Grupo 1 mostraron recaída de acuerdo con lo indicado en sus puntuaciones clínicas mientras que únicamente 2 ratones de cada uno de Grupos 2 y 3 demostraron recaída.

- 25 Además, la gravedad de la enfermedad recidivante en el Grupo 3 fue significativamente menor que la gravedad en el Grupo 1 de acuerdo con lo reflejado en el gráfico que se muestra en la Figura 12.

Conclusión

- 30 Además de la reducción de los síntomas en una aparición inicial de EAE, se ha demostrado que la presente composición de RHB-104 protege contra la recaída de la enfermedad en el modelo de ratón muy reconocido utilizado con anterioridad y en los casos en los que se produce una recaída, la gravedad de la enfermedad se reduce de manera significativa cuando se compara con un grupo de control negativo. En forma colectiva, estos resultados indican que RHB-104 fue altamente eficaz en la reducción de la gravedad de la enfermedad en este estudio.

- 35 Se apreciará por los expertos en la técnica en la técnica que se pueden realizar numerosas variaciones y/o modificaciones a las realizaciones descritas con anterioridad, sin apartarse del amplio alcance general de la presente descripción. Las presentes realizaciones, por lo tanto, se deben considerar en todos los aspectos como ilustrativas y no restrictivas.

REIVINDICACIONES

1. Una combinación de tres antibióticos que comprende claritromicina, rifabutina, y clofazimina para su uso en el tratamiento de la esclerosis múltiple.
- 5 2. Una combinación de tres antibióticos de acuerdo con la reivindicación 1, para su uso en el tratamiento de la esclerosis múltiple remitente-recidivante.
3. La combinación de acuerdo con la reivindicación 1, que además comprende Vitamina D.
4. La combinación de acuerdo con la reivindicación 1, que además comprende un agente antiinflamatorio.
- 10 5. La combinación de acuerdo con la reivindicación 1, que además comprende un inhibidor de quinasa dependiente de ciclina.
6. La combinación de acuerdo con la reivindicación 1, que además comprende un inhibidor de transcripción de células T activado.

Figura 1

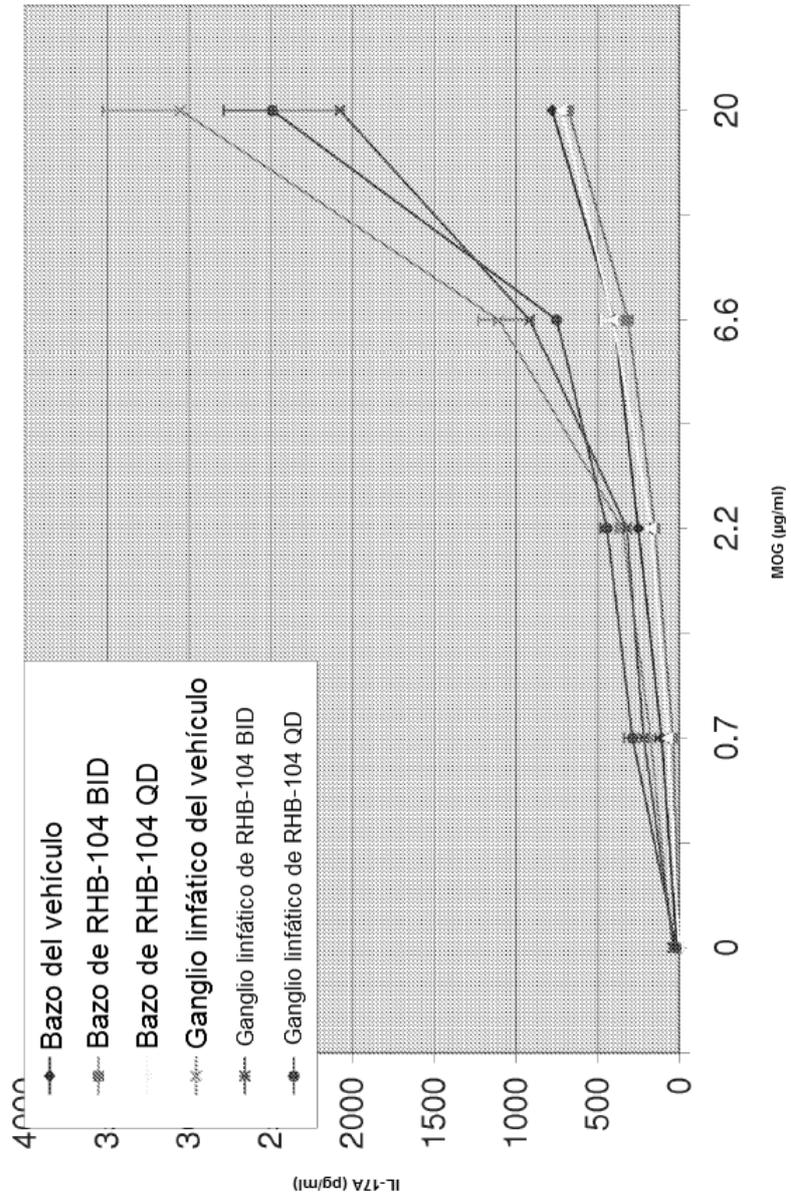


Figura 2

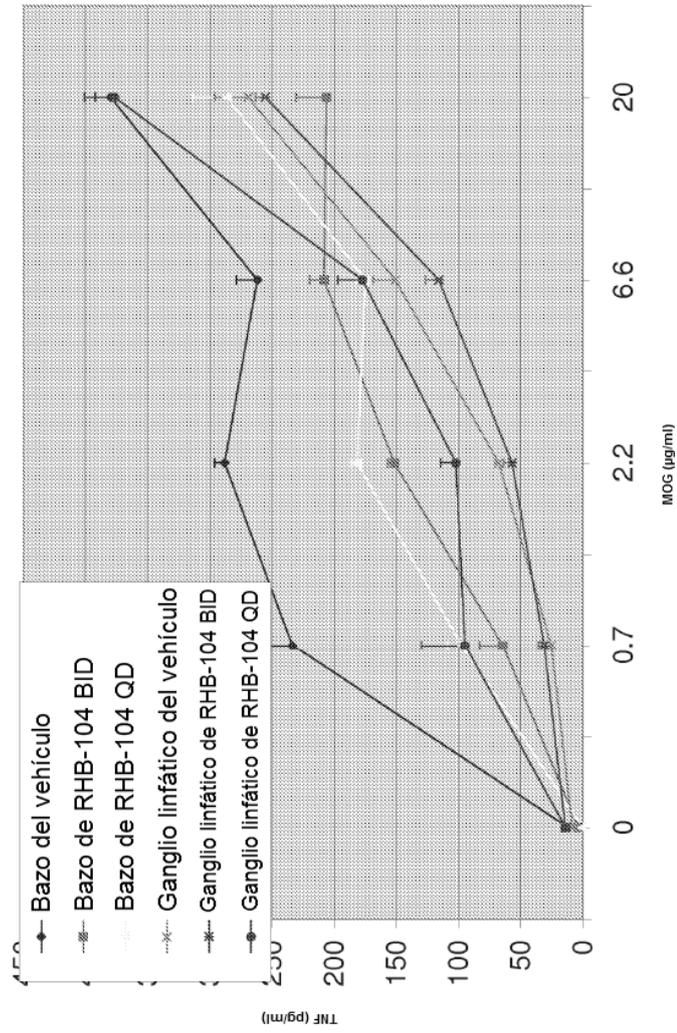


Figura 3

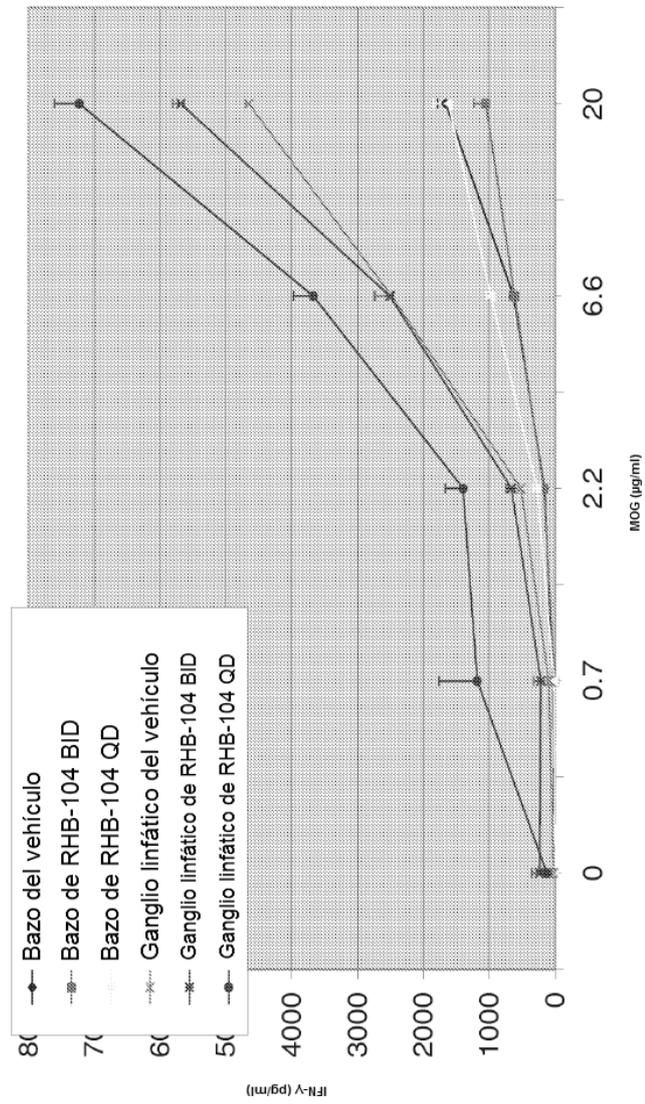


Figura 4

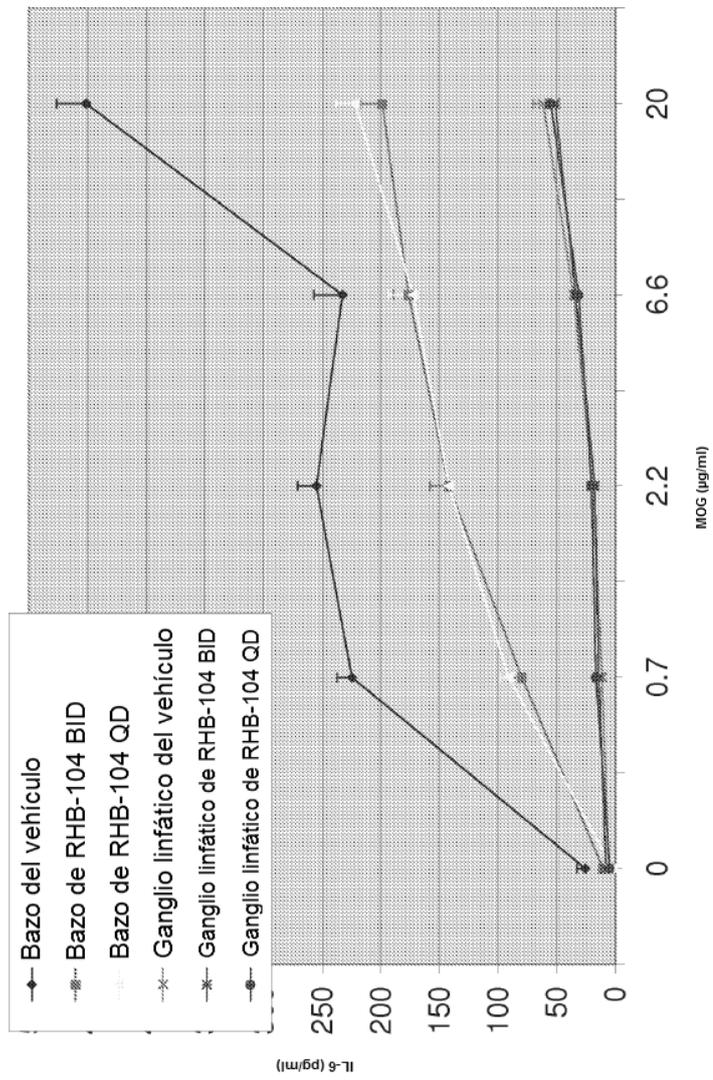


Figura 5

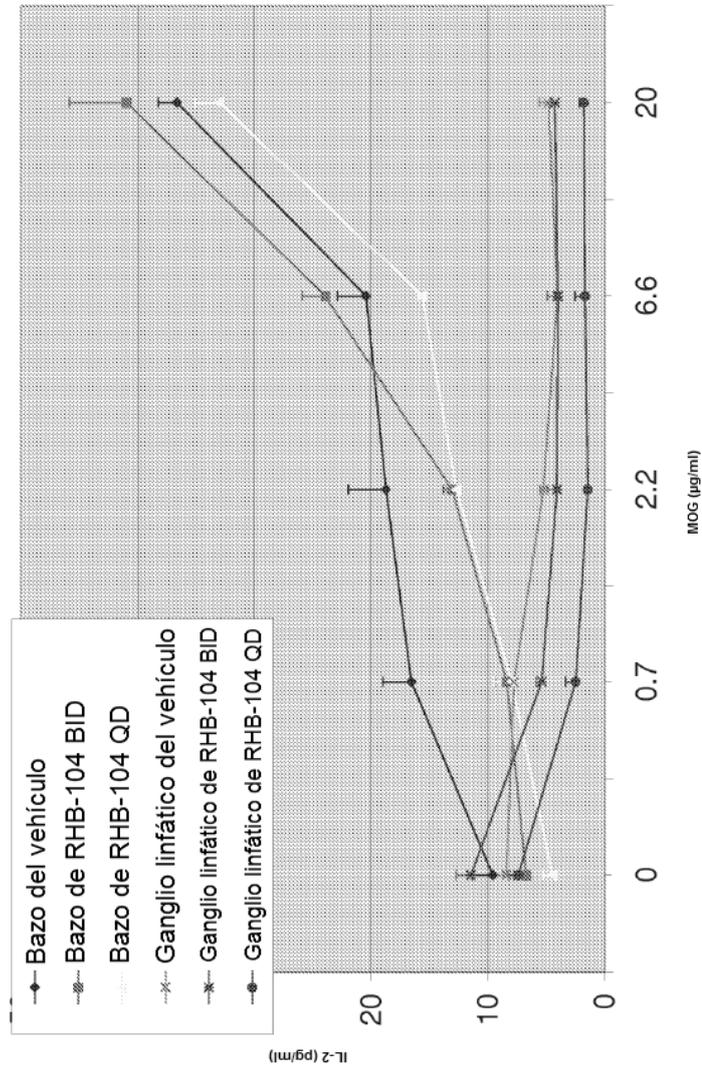


Figura 6

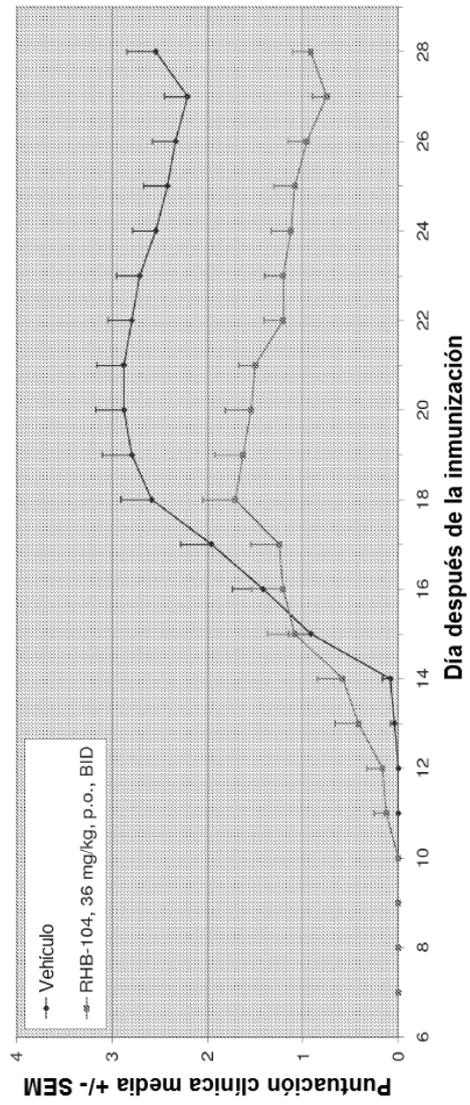


Figura 7

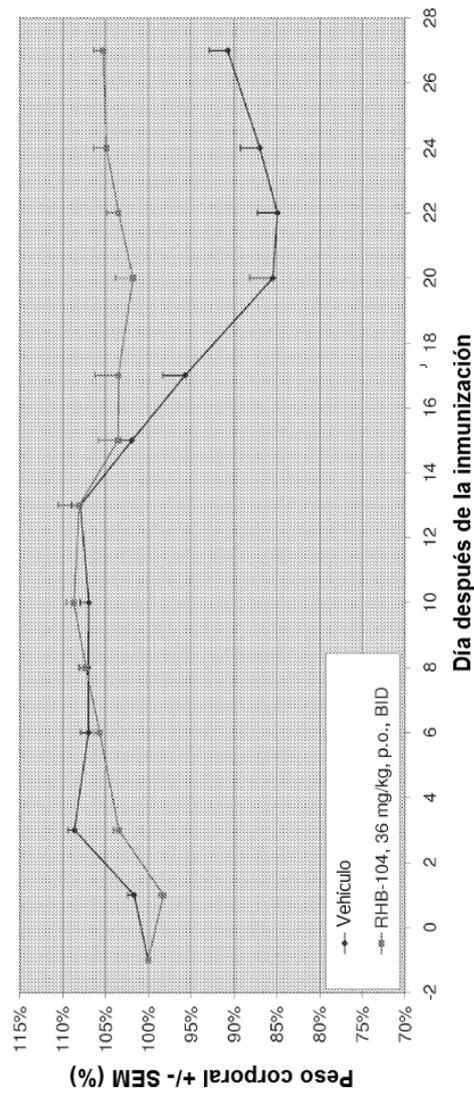


Figura 8

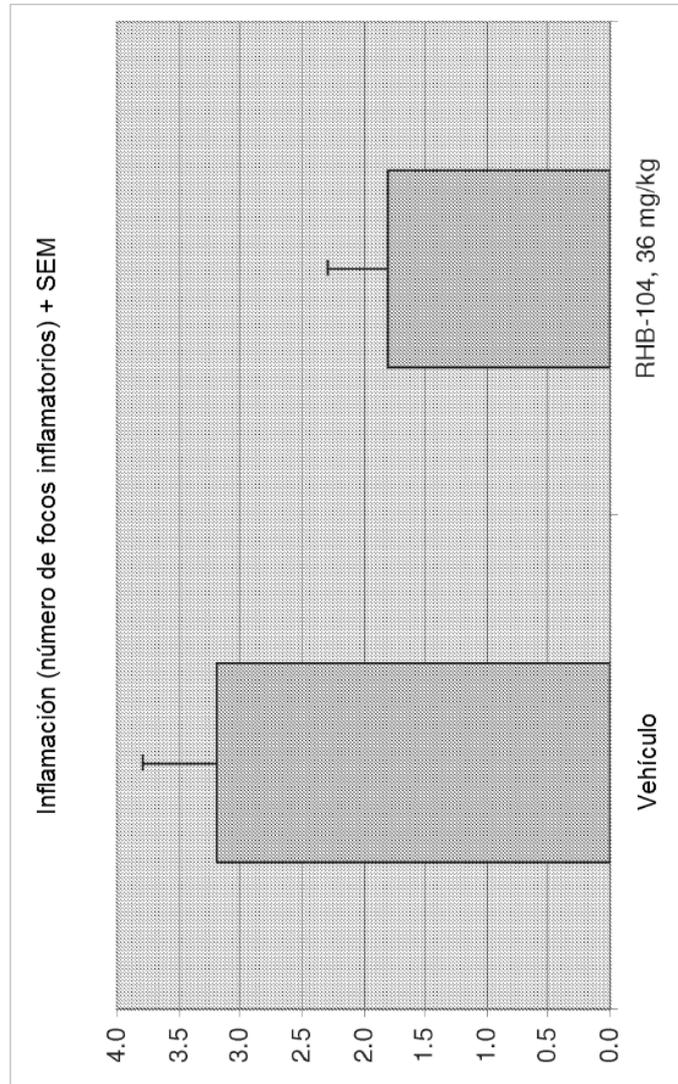


Figura 9

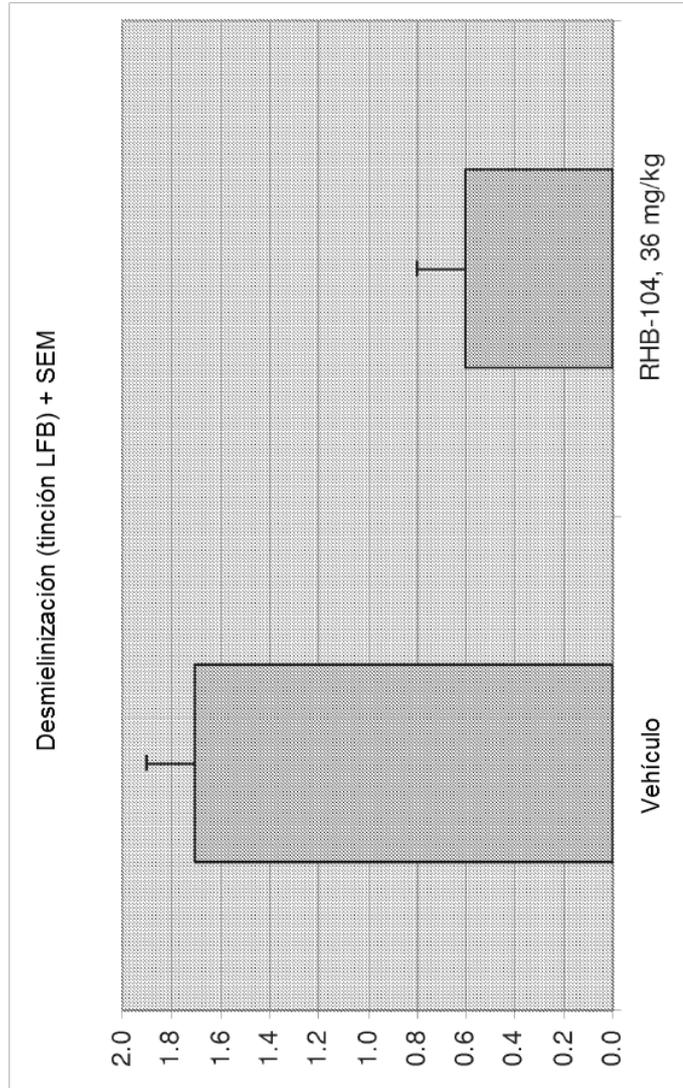


Figura 10

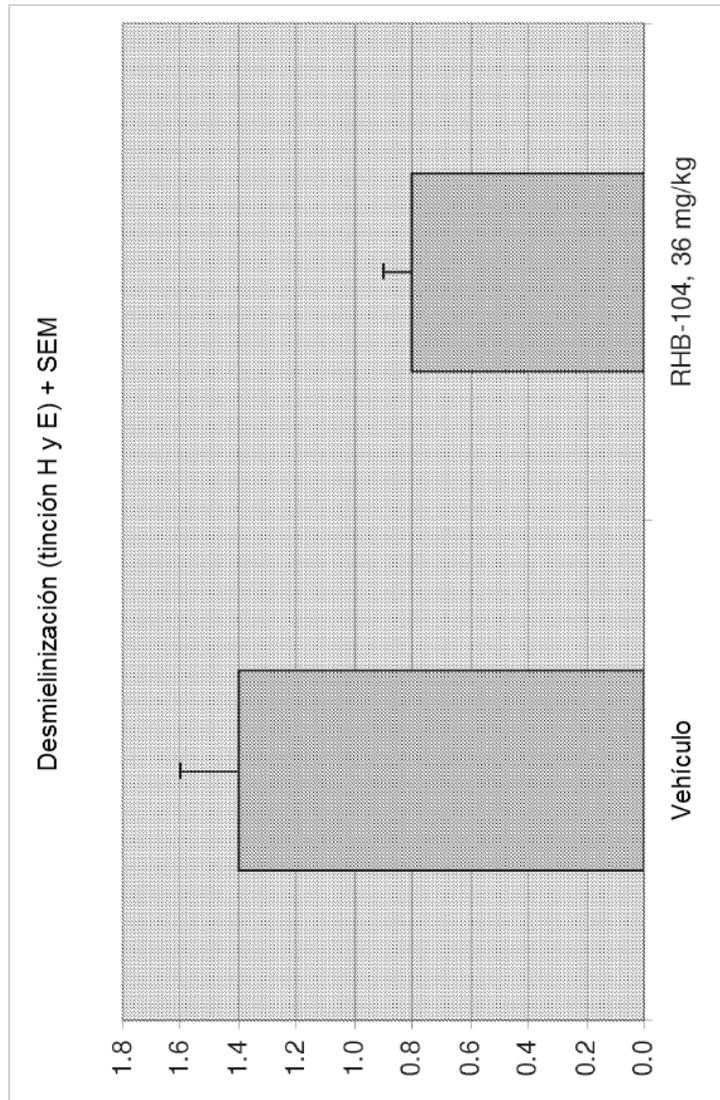


Figura 11

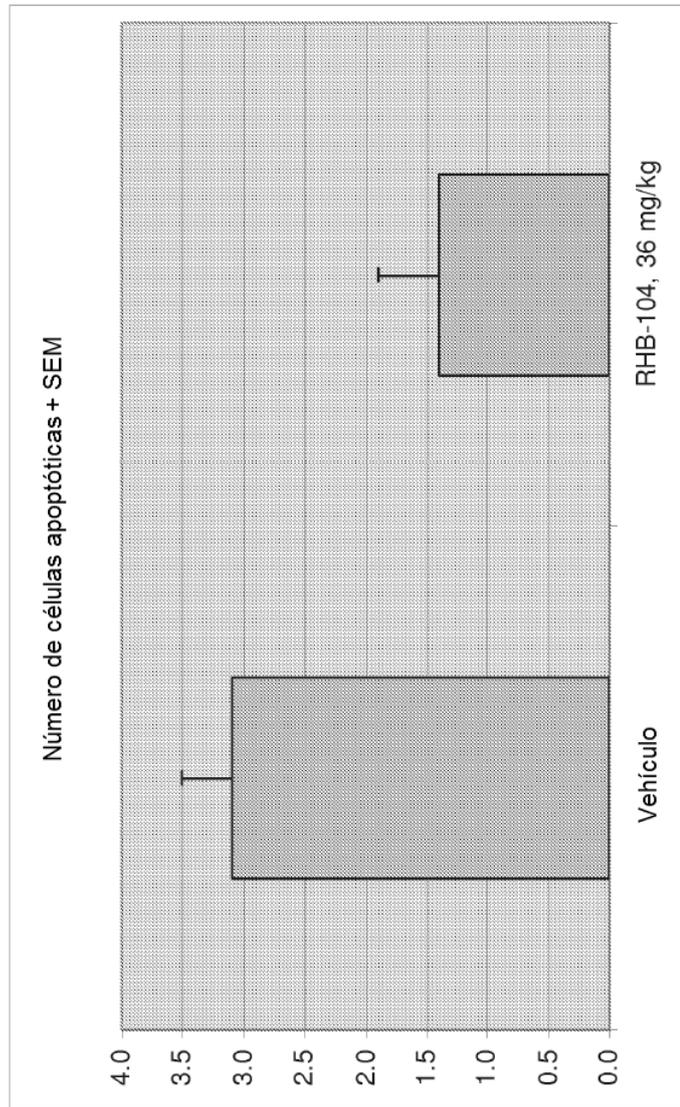


Figura 12

