

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 655 419**

51 Int. Cl.:

A61K 31/53 (2006.01)

A61P 25/00 (2006.01)

A61P 37/00 (2006.01)

A61P 29/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.06.2012 PCT/EP2012/062511**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.01.2013 WO13000974**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.06.2012 E 12731413 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.08.2017 EP 2726078**

54 Título: **Métodos para tratar enfermedades inmunomediadas del sistema nervioso administrando un compuesto que comprende agentes que inhiben la actividad de receptores de procineticinas**

30 Prioridad:

30.06.2011 IT MI20111225

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

20.02.2018

73 Titular/es:

**FONDAZIONE I.R.C.C.S. ISTITUTO
NEUROLOGICO 'CARLO BESTA' (100.0%)
Via Celoria 11
20133 Milano, IT**

72 Inventor/es:

**PEDOTTI, ROSETTA y
ABOU HAMDAN, MOHAMAD**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 655 419 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

Métodos para tratar enfermedades inmunomediadas del sistema nervioso administrando un compuesto que comprende agentes que inhiben la actividad de receptores de procinetinas

5 La presente invención se refiere a un compuesto que comprende antagonistas no peptídicos de receptores de procinetinas para su uso en el tratamiento de enfermedades inmunomediadas del sistema nervioso central, sistema nervioso periférico y uniones neuromusculares.

10 Las procinetinas son pequeños péptidos bioactivos secretados muy conservados de reptiles a seres humanos.

Hasta ahora se han descrito dos moléculas de esta familia, que son procinetina 1 (también llamada EG-VEGF, en el presente documento denominada PK-1) y procinetina 2 (también llamada Bv8, en el presente documento denominada PK-2). Estas dos proteínas secretadas de la familia de proteínas secretadas AVIT ejercen sus efectos biológicos estimulando dos receptores acoplados a proteínas G muy relacionados: PK-R1 y PK-R2. Las procinetinas y sus receptores están ampliamente distribuidos en tejidos y células de mamíferos incluyendo neuronas, granulocitos, macrófagos y células endoteliales. (Negri et al., *Life Science* 2007).

20 La lista de actividades biológicas asociadas con estos péptidos crece rápidamente.

PK1 y PK2 con sus receptores están implicadas en una amplia variedad de funciones biológicas incluyendo motilidad gastrointestinal, angiogénesis, neurogénesis, ritmo circadiano, reproducción, hematopoyesis, y dolor (Negri et al., *Life Sci* 2007; Martucci et al., *Br J Pharmacol* 2006). También desempeñan un papel importante en la respuesta inmunitaria.

25 La activación de PK-R1 y PK-R2 en células inmunitarias tal como neutrófilos, macrófagos y células dendríticas fomenta la quimiotaxia, y la liberación de citoquinas, mientras que en las células endoteliales de capilares estimula angiogénesis. Se ha demostrado que PK-2 induce un fenotipo proinflamatorio en macrófagos, ya que activa estas células, fomentando la migración de las mismas y la producción de citoquinas proinflamatorias como IL-1 e IL-12, al tiempo que disminuye los niveles de la citoquina antiinflamatoria IL-10 (Martucci et al., *Br J Pharmacol* 2006). PK-2 también modifica la funcionalidad de linfocitos T al inducir un cambio en el equilibrio Th1/Th2 hacia una respuesta de tipo Th1 (Franchi et al., 2008). Estos efectos parecen depender en la activación de PK-R1, ya que no se manifiestan en los linfocitos o macrófagos de ratones que carecen genéticamente de este receptor.

35 Entre las enfermedades del sistema nervioso central, una de las más importantes es esclerosis múltiple (EM).

La esclerosis múltiple es una enfermedad autoinmunitaria caracterizada por un ataque del sistema inmunitario contra la capa de mielina que cubre los axones neuronales. En Italia hay aproximadamente 60.000 personas afectadas por EM, con una proporción de aproximadamente 1:1.000 habitantes. Aunque es ahora una hipótesis acreditada que mecanismos de un tipo inmunomediado están en la base de esta enfermedad, la etiopatogénesis de la EM todavía no se ha clarificado por completo, y la eficacia de las terapias actuales solo es parcialmente satisfactoria. Se sabe bien que en EM y su modelo experimental, encefalomiелitis autoinmunitaria experimental (EAE), las respuestas mediadas por linfocitos T cooperadores (Th) de los tipos Th1 (caracterizada por la secreción de interferón-gamma) y Th17 (caracterizada por la secreción de interleuquina 17) desempeñan un papel activador, mientras que las respuestas de tipo Th2 (caracterizadas por la secreción de interleuquina 4, 5 y 13) desempeñan un papel protector (Steinman, *J Ex Med* 2008; Liblau et al., *Immunology today* 1995). De hecho, los tratamientos inmunomoduladores que inducen un cambio en las respuestas inmunitarias de tipo Th1 a las de tipo Th2 han demostrado ser eficaces tanto en EAE como en EM. El acetato de glatirámico (Copaxone), uno de los tratamientos inmunomoduladores comúnmente usados en esta enfermedad, induce un cambio de Th1 a Th2 y ha demostrado ser eficaz en mejorar la expresión clínica de EM (entendido como una reducción en recaídas de la enfermedad y un aumento en el intervalo de tiempo entre los primeros síntomas clínicos de EM – síndrome clínicamente aislado o CIS – y la enfermedad clínicamente definitiva).

55 La presente invención se basa en el descubrimiento particular de que las rutas asociadas con procinetinas y sus receptores PK-R1 y PK-R2 favorecen el desarrollo de esclerosis múltiple (EM) en el modelo experimental de la misma (EAE). Puesto que las procinetinas y sus receptores están presentes en células tanto del sistema nervioso como del sistema inmunitario, donde se sobreexpresan en situaciones de inflamación, estos mediadores parecen ser los candidatos ideales para modular las interacciones neuroinmunológicas en diferentes estados inflamatorios del sistema nervioso central y periférico.

60 Como la EM es una enfermedad asociada con una desregulación de la respuesta inmunitaria, se ha hipotetizado que, si las procinetinas tienen un papel en esta enfermedad, bloquear los PK-R con un antagonista puede reducir la gravedad de la enfermedad.

Por tanto, la tarea técnica que se ha fijado la presente invención, es proporcionar un compuesto para un nuevo uso terapéutico como un agente que pueda prevenir o tratar enfermedades inmunomediadas del sistema nervioso y más específicamente esclerosis múltiple.

5 La tarea técnica, así como estos y otros objetos, según la presente invención, se logran proporcionando un compuesto para un nuevo uso terapéutico como antagonistas de receptores de procinetinas según la reivindicación 1.

Otras características de la presente invención se definen, además, en las reivindicaciones posteriores.

10 Características y ventajas adicionales de la invención serán más aparentes de la descripción que sigue, ilustrada a modo de ejemplo no restrictivo en las figuras adjuntas en las que:

15 la figura 1 muestra la estructura de los antagonistas no peptídicos de receptores de procinetinas PC1 y PC7, ambos eficaces en reducir la gravedad de la enfermedad en dos modelos experimentales de EM: el primer modelo experimental es EAE recidivante-remitente (EAE-RR) y el segundo modelo es EAE crónica.

20 la figura 2 muestra la modulación de la expresión del ARNm de PK-2, PK-R1 y PK-R2 en células de ganglio linfático o células T CD4+ durante EAE crónica inducida por MOG₃₅₋₅₅ en ratones C57Bl/6;

25 la figura 3 muestra los niveles de PK-2 en el suero de ratones con EAE crónica inducida por MOG₃₅₋₅₅;

30 la figura 4 muestra la reducción en gravedad de la EAE recidivante-remitente inducida por PLP₁₃₉₋₁₅₁ en ratones SJL tratados con el antagonista de receptores de procinetinas PC1, administrado en una pauta de tratamiento preventivo;

35 la figura 5 muestra la reducción en la respuesta de células T en los esplenocitos de ratones con EAE recidivante-remitente inducida por PLP₁₃₉₋₁₅₁ tratados con el antagonista de receptores de procinetinas PC1 empezando el día de la inducción de la EAE recidivante-remitente;

40 la figura 6 muestra la reducción en la gravedad de EAE recidivante-remitente inducida por PLP₁₃₉₋₁₅₁ en ratones SJL tratados con el antagonista de receptores de procinetinas PC7, administrado en una pauta de tratamiento preventivo;

45 la figura 7 muestra la reducción en la gravedad de EAE recidivante-remitente inducida por PLP₁₃₉₋₁₅₁ en ratones SJL tratados con el antagonista de receptores de procinetinas PC7, administrado en una pauta de tratamiento terapéutico;

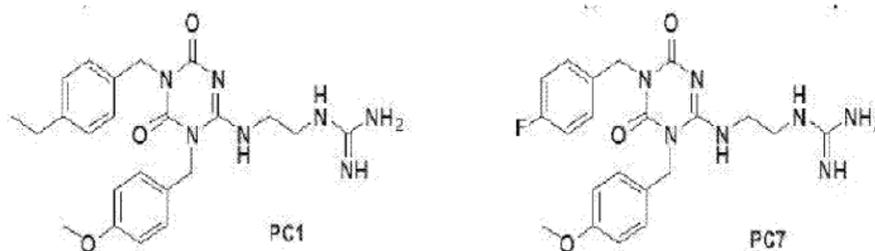
50 la figura 8 muestra la reducción en la respuesta de células T en los ganglios linfáticos de ratones con EAE recidivante-remitente inducida por PLP₁₃₉₋₁₅₁ tratados con el antagonista de receptores de procinetinas PC7 en una pauta de tratamiento preventivo;

55 la figura 9 muestra la reducción en la gravedad de EAE crónica inducida por MOG₃₅₋₅₅ en ratones C57Bl/6 tratados con el antagonista de receptores de procinetinas PC7 en una pauta de tratamiento preventivo;

la figura 10 muestra la reducción en la gravedad de EAE crónica inducida por MOG₃₅₋₅₅ en ratones C57Bl/6 tratados con el antagonista de receptores de procinetinas PC7 en una pauta de tratamiento terapéutico;

la figura 11 muestra la reducción en la respuesta de células T en los ganglios linfáticos de ratones con EAE crónica inducida por MOG₃₅₋₅₅ tratados con el antagonista de receptores de procinetinas PC7 en una pauta de tratamiento preventivo.

Según la invención, se hace uso de antagonistas de receptores no peptídicos de procinetinas, capaces de modular o bloquear la señalización de receptores de procinetinas, que tienen una estructura química básica PC1 o PC7, para el tratamiento de enfermedades inmunomediadas del sistema nervioso central y periférico, en donde:



Dichos antagonistas de procinetinas (por tanto, antagonistas de los receptores de procinetinas conocidos, que son los receptores 1 y 2, también llamados PK-R1 y PK-R2, y de cualquier receptor de estas moléculas que se pueda descubrir en el futuro) se pueden usar ventajosamente: para el tratamiento de esclerosis múltiple y otras enfermedades autoinmunitarias o enfermedades dismunitarias o enfermedades con un componente dismunitario o autoinmunitario que afectan al sistema nervioso central (incluyendo síndrome clínicamente aislado o CIS, encefalomiелitis aguda desmielizante o EMAD, encefalomiелitis posinfecciosa, encefalitis de Rasmussen, encefalitis de Bickerstaff, encefalopatías paraneoplásicas, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, esclerosis lateral amiotrófica, epilepsia); para el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias o dismunitarias o enfermedades con un componente dismunitario o autoinmunitario que afectan al sistema nervioso periférico y la unión neuromuscular (tal como síndrome de Guillain-Barré, polineuropatía desmielizante inflamatoria crónica o PDIC, neuropatías motoras multifocales o NMM, neuropatía asociada con componentes monoclonales, neuropatía asociada con gammopatía anti-MAG; miastenia grave; síndrome de Lambert-Eaton y Síndrome de la persona rígida).

Los antagonistas no peptídicos PC1 y PC7 preferentemente se unen al receptor de procinetina 1 (PK-R1).

Puesto que las procinetinas son capaces de fomentar respuestas de tipo Th1 que contribuyen al desarrollo de EM, se ha mostrado que es útil intervenir en el sistema de procinetina con el fin de reducir las respuestas de tipo Th1 dirigidas contra la mielina y fomentar en su lugar respuestas protectoras de tipo Th2 para reducir la gravedad de la EM en modelos experimentales EAE de la misma.

En el estudio realizado se verificó la expresión de PK-2 y sus receptores PK-R1 y PK-R2 en el modelo experimental de EAE crónica, un modelo experimental de EM. El modelo de EAE crónica se obtuvo en ratones C57Bl/6 por inmunización con el fragmento peptídico de la glucoproteína de mielina de oligodendrocito 35-55 (MOG₃₅₋₅₅) y PTX (toxina pertúsica) [Pedotti et al., PNAS 2003]. Durante EAE crónica, se observó un aumento en la expresión del ARNm de PK-2 por células de ganglios linfáticos y células T CD4+ purificadas en ratones C57Bl/6 durante la enfermedad. Este aumento de la expresión de ARNm empezaba antes del inicio de la enfermedad y es menos significativo después de su inicio (figura 2). También se observó un aumento importante de los niveles de la proteína PK-2 en el suero de ratones con EAE inducida por MOG₃₅₋₅₅ (figura 3). Este aumento de PK-2 estaba acompañado por una reducción drástica de la expresión de PK-R2 en células de ganglios linfáticos y células T CD4+. Por otra parte, la expresión de PK-R1 no estaba significativamente modulada en nuestro modelo de EAE crónica. Por tanto, el par PK-2/PK-R1 parece desempeñar un papel importante durante EAE, el modelo experimental de EM.

Para verificar si las procinetinas y sus receptores desempeñan un papel en EAE, se usaron dos antagonistas no peptídicos de los receptores de procinetinas 1 y 2, preferentemente bloqueando el receptor 1 (PK-R1), para evaluar los efectos del bloqueo farmacológico de la señalización de estos receptores en la expresión clínica de dos modelos experimentales de EM: el modelo experimental de EAE recidivante-remitente y el modelo experimental de EAE crónica.

El modelo de EAE recidivante-remitente se obtuvo en ratones SJL hembra por inmunización con el fragmento de la proteína proteolípidos de mielina 139-151 (PLP₁₃₉₋₁₅₁) en adyuvante de Freund completo (CFA) [Pedotti et al., Nat Immunol 2001]. El modelo de EAE crónica se obtuvo en ratones C57Bl/6 como se ha mencionado anteriormente.

Se usaron los fármacos antagonistas de receptores de procinetinas llamados PC1 y PC7 (cuya estructura química se muestra en la figura 1) para tratar de forma crónica los ratones empezando tanto desde el momento de inducción de EAE (día 0; tratamiento preventivo) como desde el inicio de los primeros síntomas de EAE (día 10-12, aproximadamente; tratamiento terapéutico).

En tres experimentos consecutivos, se observó que el tratamiento con estos fármacos mejoraba significativamente la expresión de EAE recidivante-remitente (retrasando el inicio de la enfermedad en los ratones tratados desde el momento de la inducción de EAE, y reduciendo la gravedad media en el pico de la enfermedad (tabla 1 y figura 4, figura 6).

En particular, el antagonista PC7 demostró ser extremadamente eficaz en reducir la gravedad de la enfermedad tanto en ratones con EAE recidivante-remitente, como en ratones con EAE crónica, tanto en pautas de tratamiento preventivo como terapéutico (tabla 2, tabla 3, tabla 4, tabla 5, figura 6, figura 7, figura 9 y figura 10).

5 A continuación, se realizaron estudios funcionales en el ganglio linfático y células de bazo de estos ratones tratados, y se observó que en linfocitos T estimulados con el antígeno específico de mielina, PLP₁₃₉₋₁₅₁, el tratamiento produjo una reducción significativa en la producción de citoquinas inflamatorias Th1 y Th7, que son muy importantes para el desarrollo de EAE (interleuquina [IL]-17, interferón-gamma e IL-6), mientras que aumentaba la de citoquinas antiinflamatorias de linfocitos T cooperadores 2 (tal como IL-4) (figura 5, figura 8, figura 11).

10 Estos estudios inmunológicos sugieren que el tratamiento con inhibidores de receptores de procinetinas produjo un efecto inmunomodulador cambiando la respuesta autoinmunitaria específica contra la mielina de un fenotipo de tipo Th1 (inflamatoria) a un tipo Th2 (protectora).

15 Este tipo de cambio ha demostrado ser eficaz en el tratamiento de EAE y esclerosis múltiple humana, tanto así que se ha demostrado que el acetato de glatirámico (Copaxone), uno de los tratamientos inmunomoduladores comúnmente usados en esta enfermedad, induce un cambio análogo de Th1 a Th2. Los mecanismos de acción de procinetinas y sus receptores en EAE se tienen que calificar. De hecho, junto con la capacidad ya observada de estos compuestos para modificar el fenotipo autoinmunitario T cooperador de Th1 a Th2, otros mecanismos podrían determinar la eficacia de estos compuestos en EAE incluyendo, por ejemplo, un efecto de estos compuestos en la capacidad de que linfocitos T autorreactivos salgan de los ganglios linfáticos y se adhieran y penetren a través de la barrera hematoencefálica (BHE) inflamada, una etapa crucial en el desarrollo de EAE y EM humana. En efecto, varios estudios indican que las procinetinas y sus receptores tienen un efecto sobre la permeabilidad vascular y pueden favorecer filtraciones de vasos [Urayama et al., Cardiovasc Res 2009; Guilini et al., Am J Physiol Heart Circ Physiol 2010]. Por tanto, se puede especular que tal mecanismo podría estar implicado en la eficacia de estos fármacos, que contienen antagonistas de receptores de procinetinas, en prevenir o tratar EAE.

25 Se puede indicar, de hecho, que algunos de los tratamientos más recientes para EM, tal como tratamientos con Natalizumab (Tysabri) y FTY720 (Fingolimod), se dirigen precisamente a bloquear el tráfico de células inmunitarias hacia el sitio diana, el sistema nervioso central.

Experimentos realizados y resultados

Expresión del ARNm de PK-2, PK-R1 y PK-R2 en ratones con EAE inducida con MOG35-55 (EAE crónica)

35 Con referencia a la figura 2, la EAE crónica se había inducido en ratones C57Bl/6 por inmunización con MOG₃₅₋₅₅ (100 µg/ratón) y PTX (400 ng/ratón).

40 Los ratones se sacrificaron a diferentes tiempos después de la inmunización. Se usaron células de ganglios linfáticos recién aisladas (LNC) o células T CD4⁺ magnéticamente purificadas de LNC (bolas Miltenyi) de ratones C57Bl/6 sin tratar (n=14) o inmunizados (n=5 para cada punto de tiempo) para examinar la expresión de ARNm *ex vivo* de PK-2, PK-R1 y PK-R2. Se aisló ARN total de LNC o células T CD4⁺ magnéticamente purificadas (Miltenyi) usando solución Tri Reagent (Ambion) según el protocolo del fabricante. 1 µg de ARN se sometió a transcripción inversa a ADNc con el kit de transcripción inversa Quantitect®, que incluye una etapa de eliminación de ADN (Qiagen). Se realizó PCR en tiempo real en un sistema 7500 Fast Real-time PCR (Applied Biosystems) usando Taqman® Fast Universal PCR Master Mix y ensayos de expresión génica TaqMan® para PK-2 (Mm01182450_g1), PK-R1 (Mm00517546_m1), PK-R2 (Mm03049046_m1) normalizado en GAPDH (Mm99999915_g1) según el protocolo del fabricante (Applied Biosystems). Los datos se analizaron usando el método comparativo Ct y se expresan como el porcentaje del gen de mantenimiento GAPDH (media ± DE). Los resultados son representativos de dos experimentos consecutivos que dieron resultados similares. Estos resultados muestran un aumento en la expresión de ARNm de PK-2 por células de ganglio linfático y células T CD4⁺ purificadas en ratones C57Bl/6 durante la enfermedad. Este aumento de la expresión del ARNm empezó antes del inicio de la enfermedad alcanzó su nivel más alto en el inicio y era menos significativo después del inicio de EAE. Esta modulación de la expresión de PK-2 estaba acompañada por una reducción drástica de la expresión de PK-R2 durante EAE crónica. Por otra parte, la expresión de PK-R1 no estaba significativamente modulada durante la enfermedad. Por tanto, el par PK-2/PK-R1 parecía desempeñar un papel importante durante EAE, el modelo experimental de EM.

Modulación de los niveles de procinetina-2 en suero de ratones con EAE inducida con MOG35-55 (EAE crónica)

60 Con referencia a la figura 3, la EAE crónica se había inducido en ratones C57Bl/6 por inmunización con MOG₃₅₋₅₅ (100 µg/ratón) y PTX (400 ng/ratón). Los ratones se sacrificaron a diferentes tiempos después de la inmunización y se prepararon sueros sanguíneos (5-6 ratones en cada punto de tiempo). Se evaluaron los niveles de procinetina-2 en el suero usando un kit de Elisa para procinetina-2 murina según el protocolo del fabricante (Uscn, Life Science Inc., EE UU). Los datos se expresan como ng/ml medio ± EEM. P por la prueba de la t de Student para datos no emparejados bilateral frente a ratones sin tratar.

Estos resultados muestran un aumento importante de los niveles de la proteína PK-2 en el suero de ratones con EAE inducida con MOG₃₅₋₅₅, lo que sugiere un papel importante para esta proteína en EAE.

5 Reducción en la gravedad de EAE recidivante-remitente en ratones SJL tratados con PC1

Con referencia a la figura 4, el antagonista no peptídico de los receptores de procineticinas 1 y 2 PC1 se administró por vía intraperitoneal a ratones SJL hembra de 8-12 semanas de edad en los que se había inducido EAE por inmunización con PLP₁₃₉₋₁₅₁ (100 µg/ratón) en CFA. Se dio PC1 a una dosis de 500 µg/kg (n=10). Como control, se inyectó una cantidad igual de solución salina (vehículo) (n=10). Los tratamientos empezaron en el momento de la inducción de EAE (tratamiento preventivo) o, más específicamente, 4 horas después de la inducción de EAE. Se usaron diez ratones por grupo. El gráfico representa la puntuación de enfermedad diaria media ± error estándar de la media (EEM). Se usó una escala de 0 a 5 para atribuir la puntuación, donde 0 es ausencia de síntomas y 5 es muerte (como se describe en Pedotti et al., Nat Immunol 2001). * p<0,05 para prueba de la t de Student de datos no emparejados bilateral frente al control. Los resultados son representativos de tres experimentos consecutivos que dieron resultados similares.

La tabla 1 a continuación muestra el tratamiento de ratones afectados por EAE recidivante-remitente con el antagonista no peptídico de los receptores de procineticinas 1 y 2 PC1, llevado a cabo como se describe en la figura 4. * p<0,05 para prueba de la t de Student de datos no emparejados bilateral frente al control.

Tratamiento	Incidencia (%)	Inicio de la enfermedad (día)	Pico de gravedad de la enfermedad	Puntuación acumulada de enfermedad
Control	100% (10/10)	9,7 ± 0,3	3,0 ± 0,4	45,5 ± 10,1
PC1 (500 µg/kg)	70% (7/10)	12,4 ± 1,0*	1,7 ± 0,4*	24,8 ± 9,0*

Tabla 1. Tratamiento de ratones afectados con EAE con el antagonista no peptídico de los receptores de procineticinas 1 y 2 PC-1, llevado a cabo como se describe en la figura 2. * p<0,05 para prueba de la t de Student de datos no emparejados bilateral frente al control.

Estos resultados muestran que tratar los ratones afectados con EAE recidivante-remitente con PC1 induce una reducción en la gravedad de la enfermedad, con un retraso en el inicio de la enfermedad en los ratones tratados desde el momento de inducción de EAE y una reducción en la gravedad media en el pico de la enfermedad.

30 Respuesta de células T reducida en esplenocitos de ratones con EAE recidivante-remitente tratados con PC-1 en una pauta de tratamiento preventivo

Con referencia a la figura 5, ratones SJL hembra de 8-12 semanas de edad en los que se había inducido EAE por inmunización con PLP₁₃₉₋₁₅₁ en CFA se trataron preventivamente (día 0) con PC1 a una dosis de 500 µg/kg al día, o con vehículo como se describe en la figura 4. Se obtuvieron los esplenocitos 35 días después de la inmunización con PLP₁₃₉₋₁₅₁, y se reestimularon in vitro con el antígeno PLP₁₃₉₋₁₅₁ a diferentes concentraciones o con el medio.

Para ensayar la proliferación, después de 48 horas de incubación con Co2 al 5% a 37°C, los cultivos se cargaron durante 18 horas con 0,5 µCi de 3H-timidina por pocillo. Para ensayar la producción de citoquinas, los esplenocitos se reestimularon in vitro con el antígeno PLP₁₃₉₋₁₅₁ a diferentes concentraciones o con el medio. Se determinó la concentración de interferón-gamma (IFN-gamma), factor de necrosis tumoral (TNF), interleuquina-6 (IL-6), IL-17, IL-14 e IL-10 en duplicado usando la técnica ELISA (ELISA DuoSet, Pharmingen, CA). Los resultados con representativos de dos experimentos consecutivos que dieron resultados similares.

Los resultados muestran que en linfocitos T estimulados con el antígeno específico de mielina PLP₁₃₉₋₁₅₁ el tratamiento con el antagonista PC-1 produce una reducción en la proliferación de células T específicas de péptido y en la producción de citoquinas Th1 inflamatorias, que son muy importantes para el desarrollo de EAE (interferón-gamma, y TNF), al tiempo que aumenta la de IL-4, la citoquina antiinflamatoria de linfocitos T cooperadores 2.

50 Reducción en la gravedad de EAE recidivante-remitente en ratones SJL tratados con el antagonista PC-7, administrado en una pauta de tratamiento preventivo

Con referencia a la figura 6, el antagonista no peptídico de los receptores de procineticinas 1 y 2 PC-7 se administró por vía intraperitoneal a ratones SJL hembra de 8-12 semanas de edad en los que se había inducido EAE por inmunización con PLP₁₃₉₋₁₅₁ (100 µg/ratón) en CFA. Se dio PC7 a una dosis de 500 µg/kg (n=10). Como control, se inyectó una cantidad igual de solución salina (vehículo) (n=10). Los tratamientos empezaron en el momento de la inducción de EAE (tratamiento preventivo) o, más específicamente, 4 horas después de la inducción de EAE. Se usaron diez ratones por grupo. El gráfico representa la puntuación de enfermedad diaria media ± error estándar de la media (EEM). Los resultados son representativos de tres experimentos consecutivos que dieron resultados similares.

La tabla 2 a continuación muestra el tratamiento de ratones afectados por EAE recidivante-remitente con el antagonista no peptídico de los receptores de procineticinas 1 y 2 PC-7, llevado a cabo como se describe en la figura 6. * $p < 0,05$ para prueba de la t de Student de datos no emparejados bilateral frente al control.

Tratamiento	Incidencia (%)	Inicio de la enfermedad (día)	Pico de gravedad de la enfermedad	Puntuación acumulada de enfermedad
Control	100% (10/10)	10,4 ± 0,3	3,5 ± 0,3	45,1 ± 8,7
PC7 (500 µg/kg)	90% (9/10)	11,4 ± 0,1*	2,2 ± 0,3*	21,2 ± 5,1*

5 **Tabla 2.** Tratamiento de ratones afectados con EAE con el antagonista no peptídico de los receptores de procineticinas 1 y 2 PC-7, llevado a cabo como se describe en la figura 5. * $p < 0,05$ para prueba de la t de Student de datos no emparejados bilateral frente al control.

10 Estos resultados muestran que tratar preventivamente ratones afectados por EAE recidivante-remitente con PC7 a una dosis de 500 µg/kg reduce la gravedad de la enfermedad.

Reducción en la gravedad de EAE recidivante-remitente en ratones SJL tratados con el antagonista PC-7, administrado en una pauta de tratamiento terapéutico

15 Con referencia a la figura 7, el antagonista no peptídico de los receptores de procineticinas 1 y 2 PC-7 se administró por vía intraperitoneal a ratones SJL hembra de 8-12 semanas de edad en los que se había inducido EAE por inmunización con PLP₁₃₉₋₁₅₁ (100 µg/ratón) en CFA. Se dio PC-7 a una dosis de 500 µg/kg (n=10). Como control, se inyectó una cantidad igual de solución salina (vehículo) (n=10). Los tratamientos empezaron en la aparición de los primeros síntomas de la enfermedad (día 11). Se usaron diez ratones por grupo. El gráfico representa la puntuación de enfermedad diaria media ± error estándar de la media (EEM). Los resultados son representativos de tres experimentos consecutivos que dieron resultados similares.

20 La tabla 3 a continuación muestra el tratamiento de ratones afectados por EAE recidivante-remitente con el antagonista no peptídico de los receptores de procineticinas 1 y 2 PC-7, llevado a cabo como se describe en la figura 7. * $p < 0,05$ para prueba de la t de Student de datos no emparejados bilateral frente al control.

Tratamiento	Incidencia (%)	Pico de gravedad de la enfermedad	Puntuación acumulada de enfermedad
Placebo	100% (10/10)	3,4 ± 0,3	69,6 ± 9,8
PC7 (500 µg/kg)	100% (10/10)	2,6 ± 0,3*	42,3 ± 7,5

25 **Tabla 4.** Tratamiento de ratones afectados con EAE con el antagonista no peptídico de los receptores de procineticinas 1 y 2 PC-7, llevado a cabo como se describe en la figura 7. * $p < 0,05$ para prueba de la t de Student de datos no emparejados bilateral frente al control.

30 Estos resultados muestran que tratar terapéuticamente ratones afectados por EAE recidivante-remitente con PC7 a una dosis de 500 µg/kg empezando desde la aparición de los primeros síntomas de la enfermedad reduce significativamente la gravedad de la enfermedad.

35 Respuesta de células T reducida en los ganglios linfáticos de ratones con EAE recidivante-remitente tratados con PC7 en una pauta de tratamiento preventivo

40 Con referencia a la figura 8, ratones SJL hembra de 8-12 semanas de edad en los que se había inducido EAE por inmunización con PLP₁₃₉₋₁₅₁ en CFA se trataron preventivamente (día 0) con PC-7 a una dosis de 500 µg/kg al día, o con vehículo como se describe en los experimentos previos. Se obtuvieron los ganglios linfáticos drenantes (DLN, inguinal y axilar) 7 días después de la inmunización con PLP₁₃₉₋₁₅₁. Para ensayar la proliferación, las células de DLN se reestimularon *in vitro* con el antígeno PLP₁₃₉₋₁₅₁ a diferentes concentraciones, con concanavalina A (2µg/ml) o con el medio.

45 Después de 48 horas de incubación con Co2 al 5% a 37°C, los cultivos se cargaron durante 18 horas con 0,5 µCi de 3H-timidina por pocillo.

50 Para ensayar la producción de citoquinas, las células de DLN se reestimularon *in vitro* con el antígeno PLP₁₃₉₋₁₅₁ a diferentes concentraciones o con el medio. Los datos se expresan como media de cpm ± EEM, ng/ml ± EEM o pg/ml ± EEM.

55 Los resultados obtenidos muestran que las células de los ganglios linfáticos obtenidos de ratones tratados con PC-7 muestran proliferación reducida y producen un número significativamente menor de citoquinas proinflamatorias, tal como IFN y TNF, cuando se reestiman con PLP₁₃₉₋₁₅₁ comparado con células derivadas de ratones tratados con el vehículo (grupo control). También se puede observar una ligera reducción en los niveles de IL-17A. Además, se puede observar un aumento en los niveles de interleuquina IL-6, y de la interleuquina antiinflamatoria IL-10 en

células derivadas de ratones tratados con PC-7, comparado con células derivadas de ratones tratados solo con el vehículo (control).

Reducción en la gravedad de EAE crónica en ratones C57Bl/6 tratados con el antagonista del receptor de procinetinas PC-7, administrado en una pauta de tratamiento preventivo

Con referencia a la figura 9, el antagonista no peptídico de los receptores de procinetinas 1 y 2 PC7 se administró por vía intraperitoneal a ratones C57Bl/6 hembras de 8-12 semanas de edad en los que se había inducido EAE crónica por inmunización con MOG₃₅₋₅₅ (100 µg/ratón) y PTX (400 ng/ratón). PC-7 se dio a una dosis de 500 µg/kg (n=10). Como control, se inyectó una cantidad igual de solución salina (vehículo) (n=10). Los tratamientos empezaron en el momento de la inducción de EAE (tratamiento preventivo) o, más específicamente, 4 horas después de la inducción de EAE. Se usaron diez ratones por grupo. El gráfico representa la puntuación de enfermedad diaria media ± error estándar de la media (EEM). Los resultados son representativos de tres experimentos consecutivos que dieron resultados similares.

La tabla 4 a continuación muestra el tratamiento de ratones afectados por EAE crónica con el antagonista no peptídico de los receptores de procinetinas 1 y 2 PC7, llevado a cabo como se describe en la figura 9. * p<0,05 para prueba de la t de Student de datos no emparejados bilateral frente al control.

Tratamiento	Incidencia (%)	Inicio de la enfermedad (día)	Pico de gravedad de la enfermedad	Puntuación acumulada de enfermedad
Control	100% (10/10)	12,3 ± 0,4	4,5 ± 0,2	77,1 ± 6,2
PC7 (500 µg/kg)	90% (9/10)	16,8 ± 1,7*	2,5 ± 0,5*	41,1 ± 11,8*

Tabla 5. Tratamiento de ratones afectados con EAE crónica con el antagonista no peptídico de los receptores de procinetinas 1 y 2 PC-7, llevado a cabo como se describe en la figura 9. * p<0,05 para prueba de la t de Student de datos no emparejados bilateral frente al control.

Los resultados obtenidos muestran que el tratamiento preventivo con PC7 induce una reducción significativa en la gravedad de la enfermedad.

Reducción en la gravedad de EAE crónica en ratones C57Bl/6 tratados con el antagonista del receptor de procinetinas PC7, administrado en una pauta de tratamiento terapéutico

Con referencia a la figura 10, el antagonista no peptídico de los receptores de procinetinas 1 y 2 PC-7 se administró por vía intraperitoneal a ratones C57Bl/6 hembras de 8-12 semanas de edad en los que se había inducido EAE crónica por inmunización con MOG₃₅₋₅₅ (100 µg/ratón) y PTX (400 ng/ratón). PC-7 se dio a una dosis de 500 µg/kg (n=10). Como control, se inyectó una cantidad igual de solución salina (vehículo) (n=10). Los tratamientos empezaron en el inicio de los primeros síntomas de la enfermedad (día 12). Se usaron diez ratones por grupo. El gráfico representa la puntuación de enfermedad diaria media ± error estándar de la media (EEM). Los resultados son representativos de dos experimentos consecutivos que dieron resultados similares.

La tabla 5 a continuación muestra el tratamiento de ratones afectados por EAE crónica con el antagonista no peptídico de los receptores de procinetinas 1 y 2 PC-7, llevado a cabo como se describe en la figura 10. * p<0,05 para prueba de la t de Student de datos no emparejados bilateral frente al control.

Tratamiento	Incidencia (%)	Pico de gravedad de la enfermedad	Puntuación acumulada de enfermedad
Control	100% (10/10)	4,4 ± 0,2	79,8 ± 5,0
PC7 (500 µg/kg)	100% (10/10)	3,3 ± 0,3*	50,9 ± 11,8*

Tabla 6. Tratamiento de ratones afectados con EAE crónica con el antagonista no peptídico de los receptores de procinetinas 1 y 2 PC-7, llevado a cabo como se describe en la figura 10. * p<0,05 para prueba de la t de Student de datos no emparejados bilateral frente al control.

Los resultados obtenidos muestran que el tratamiento terapéutico con PC7 a una dosis de 500 µg/kg induce una reducción significativa en la gravedad de la enfermedad en EAE crónica.

Respuesta de células T reducida en los ganglios linfáticos de ratones con EAE crónica tratados con PC-7 en una pauta de tratamiento preventivo

Con referencia a la figura 11, ratones C57Bl/6 hembras de 8-12 semanas de edad en los que se había inducido EAE crónica por inmunización con MOG₃₅₋₅₅ se trataron preventivamente (día 0) con PC-7 a una dosis de 500 µg/kg al día, o con vehículo como se describe en los experimentos previos. Se obtuvieron los ganglios linfáticos drenantes (DLN, inguinal y axilar) 10 días después de la inmunización con MOG₃₅₋₅₅. Para ensayar la proliferación, las células de DLN se reestimularon in vitro con MOG₃₅₋₅₅ a diferentes concentraciones, con concanavalina A (2µg/ml) o con el medio. Los datos se expresan como media de cpm ± EEM, ng/ml ± EEM o pg/ml ± EEM.

Después de 48 horas de incubación con Co2 al 5% a 37°C, los cultivos se cargaron durante 18 horas con 0,5 µCi de 3H-timidina por pocillo.

- 5 Para ensayar la producción de citoquinas, las células de DLN se reestimularon *in vitro* con MOG₃₅₋₅₅ a diferentes concentraciones o con el medio.

10 Los resultados obtenidos muestran que en linfocitos T estimulados con el antígeno específico de mielina MOG₃₅₋₅₅ el tratamiento con PC-7 induce una reducción en la proliferación de células T específicas de péptido y en la producción de citoquinas Th1 y Th17, que son muy importantes para el desarrollo de EAE (IFN-gamma, TNF e IL-17) mientras que aumentan la del supresor IL-10, la citoquina antiinflamatoria Th2.

15 Por tanto, se demostró que las prokineticinas y sus receptores parecen estar implicados en la fisiopatología de dos modelos de EAE, el modelo experimental de esclerosis múltiple humana, y que el uso de antagonistas no peptídicos de los receptores de prokineticinas según la invención muestra eficacia particular en el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias o enfermedades con un componente autoinmunitario o enfermedades disimunitarias o enfermedades con un componentes disimunitario que afectan al sistema nervioso central, sistema nervioso periférico y la unión neuromuscular.

20 **Referencias principales:**

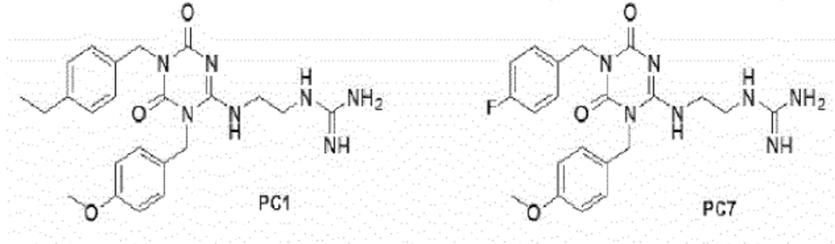
1. Negri, L., R. Lattanzi, E. Giannini, y P. Melchiorri. 2007. Bv8/Prokineticin proteins and their receptors. *Life Sci* 81:1103-1116.
- 25 2. Martucci, C., S. Franchi, E. Giannini, H. Tian, P. Melchiorri, L. Negri, y P. Sacerdote. 2006. Bv8, the amphibian homologue of the mammalian prokineticins, induces a proinflammatory phenotype of mouse macrophages. *Br J Pharmacol* 147:225-234
3. Franchi, S., E. Giannini, D. Lattuada, R. Lattanzi, H. Tian, P. Melchiorri, L. Negri, A. E. Panerai, y P. Sacerdote. 2008. The prokineticin receptor agonist Bv8 decreases IL-10 and IL-4 production in mice splenocytes by activating prokineticin receptor-1. *BMC Immunol* 9:60.
- 30 4. Steinman, L. 2008. A rush to judgment on Th17. *The Journal of experimental medicine* 205:1517-1522.
5. Liblau, R. S., S. M. Singer, y H. O. McDevitt. 1995. Th1 and Th2 CD4+ T cells in the pathogenesis of organ-specific autoimmune diseases. *Immunology today* 16:34-38.
6. Pedotti, R., D. Mitchell, J. Wedemeyer, M. Karpuj, D. Chabas, E. M. Hattab, M. Tsai, S. J. Galli, y L. Steinman. 2001. An unexpected version of horror autotoxicus: anaphylactic shock to a self-peptide. *Nat Immunol* 2:216-222.
- 35 7. Pedotti, R., Jason J. DeVoss, S. Youssef, D. Mitchell, J. Wedemeyer, r. Madanat, H. Garren, P. Fontoura, M. Tsai, S. Galli, R. Sobel, y L. Steinman. 2003. Multiple elements of the allergic arm of the immune response modulate autoimmune demyelination. *PNAS* Vol.100, no.4, 1867-1872
8. Urayama, K., D.B. Dedeoglu, C.Guillini, S. Frantz, G. Ertl, N. Messaddeq y C.G. Nebigil 2009. Transgenic myocardial overexpression of prokineticin receptor-2 (GPR73b) induces hypertrophy and capillary vessel leakage. *Cardiovasc Res* 81:28-37.
- 40 9. Guilini, C., K. Urayama, G. Turkeri, D. B. Dedeoglu, H. Kurose, N. Messaddeq, y C. G. Nebigil. 2010. Divergent roles of prokineticin receptors in the endothelial cells: angiogenesis and fenestration. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 298:H844-852.

45

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto seleccionado de antagonistas no peptídicos de receptores de procinetinas de estructura química (PC1) o (PC7)

5



para su uso en el tratamiento de enfermedades inmunomediadas del sistema nervioso central, el sistema nervioso periférico y unión neuromuscular.

10

2. Compuesto para su uso según la reivindicación 1 para modular, directa e indirectamente, la respuesta autoinmunitaria específica contra mielina cambiándola de un fenotipo de linfocito T cooperador de tipo 1 a un fenotipo de linfocito T cooperador de tipo 2 de modo que se reduzca la producción de citoquinas inflamatorias por linfocitos T cooperadores de tipo 1 y aumente la producción de citoquinas inflamatorias por linfocitos T cooperadores de tipo 2.

15

3. Compuesto seleccionado de antagonistas no peptídicos de receptores de procinetinas según cualquiera de las reivindicaciones previas, para su uso en el tratamiento de esclerosis múltiple humana y/o encefalomiелitis autoinmunitaria experimental (EAE).

20

4. Compuesto según la reivindicación 3 para su uso en el tratamiento de encefalomiелitis autoinmunitaria experimental (EAE) recidivante-remitente.

5. Compuesto según la reivindicación 3 para su uso en el tratamiento de encefalomiелitis autoinmunitaria experimental (EAE) crónica.

25

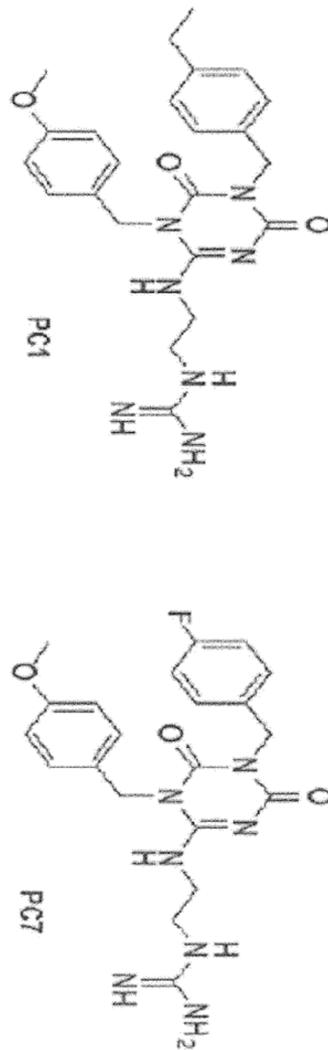


FIGURA 1

células de ganglio linfático total

células T CD4+

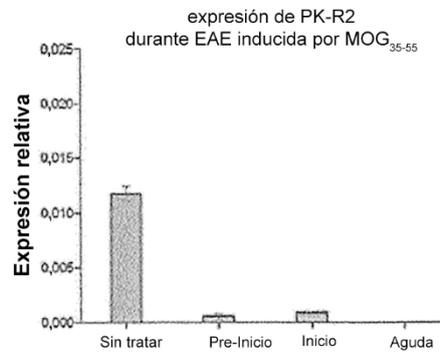
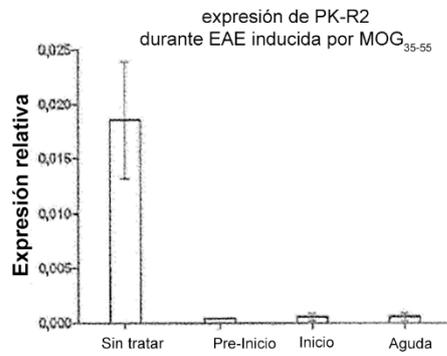
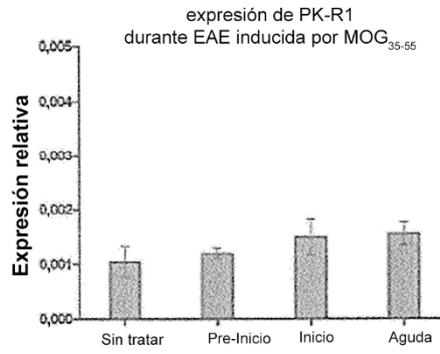
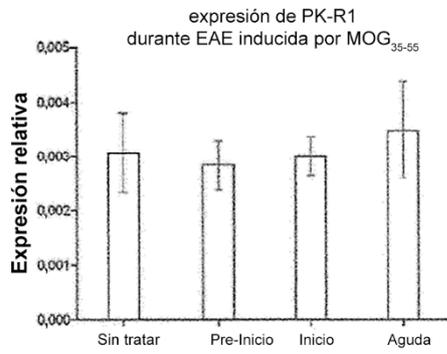
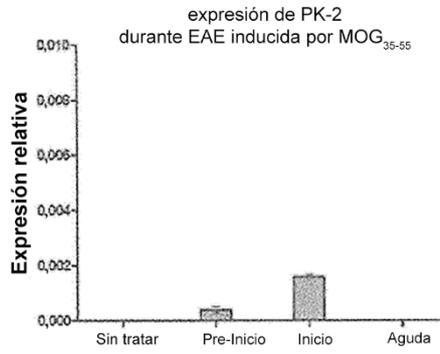
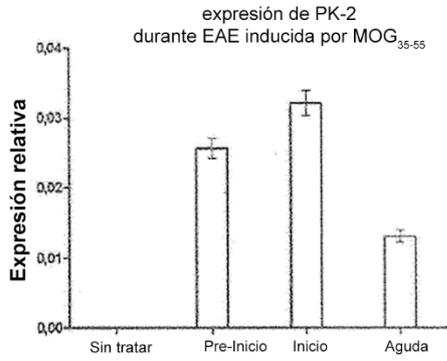


FIGURA 2

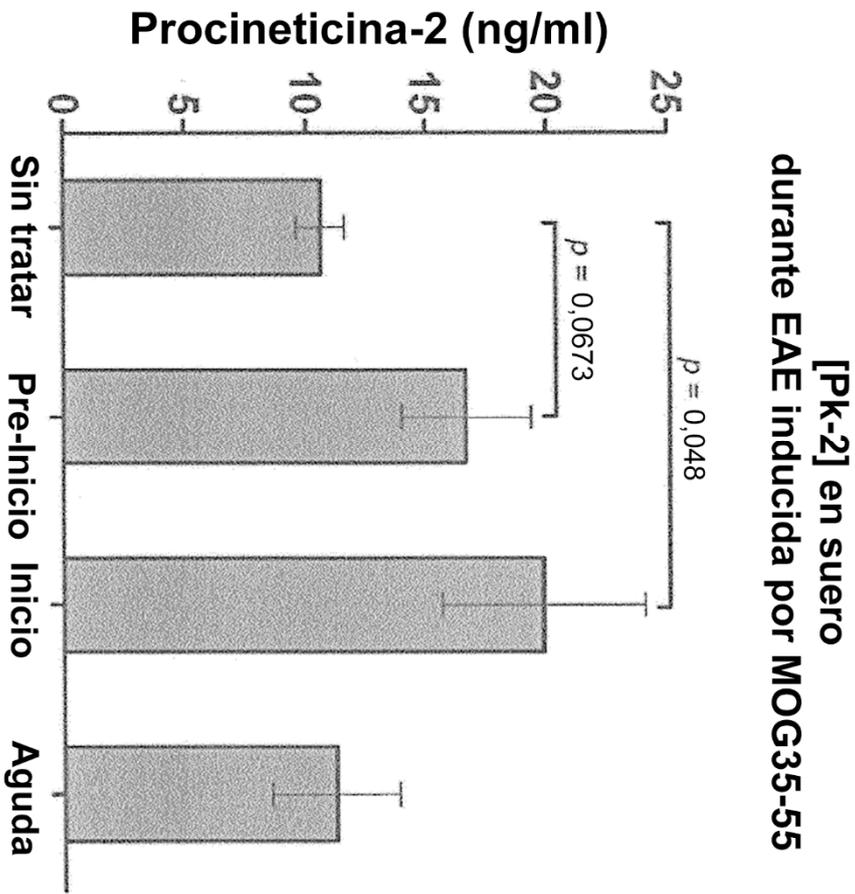


FIGURA 3

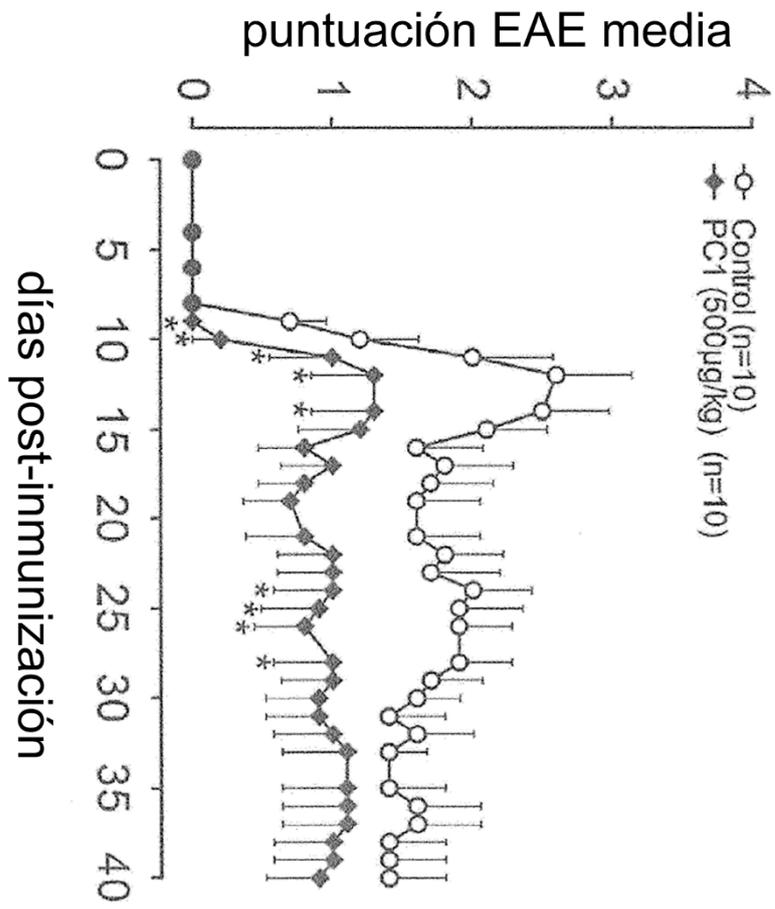


FIGURA 4

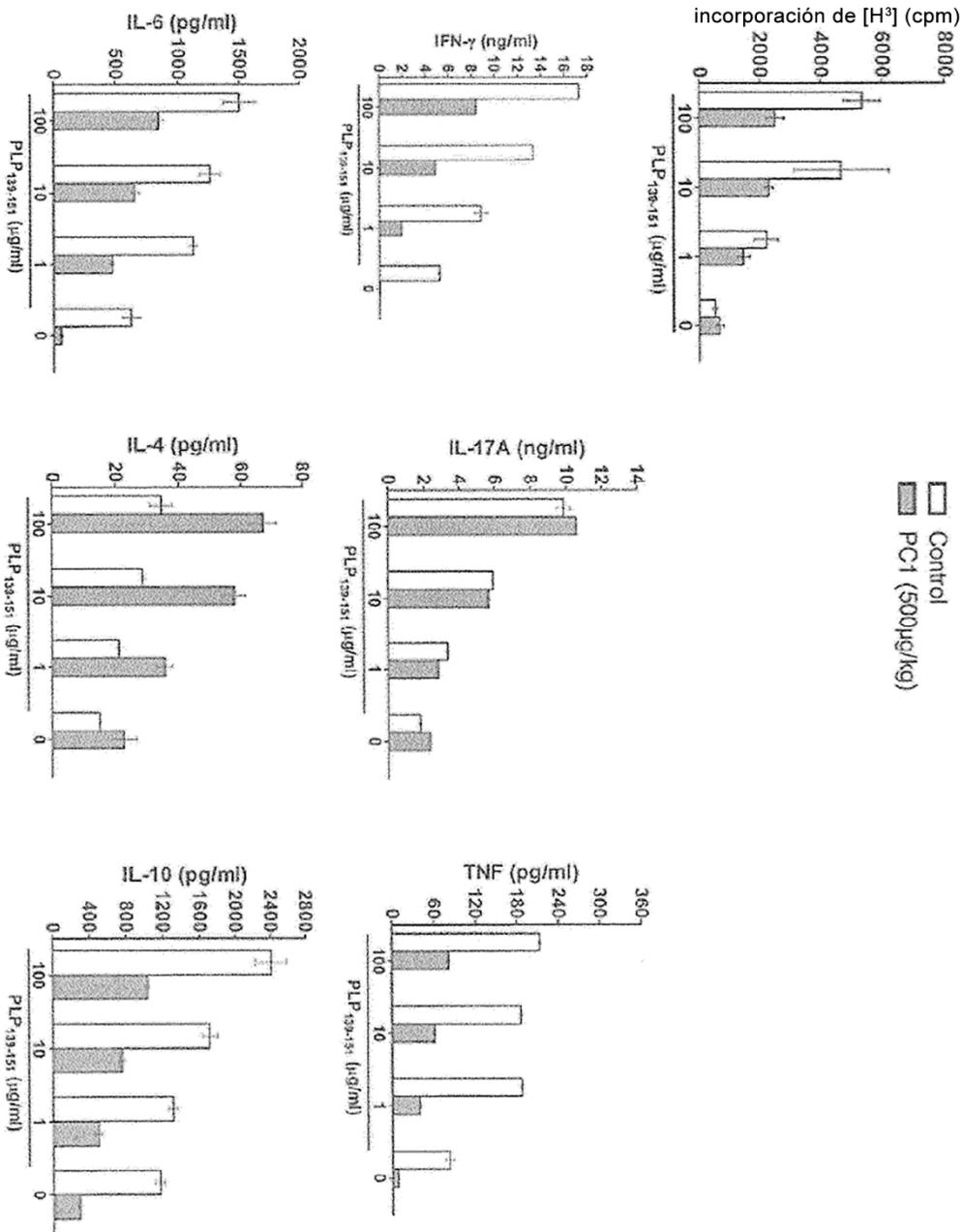


FIGURA 5

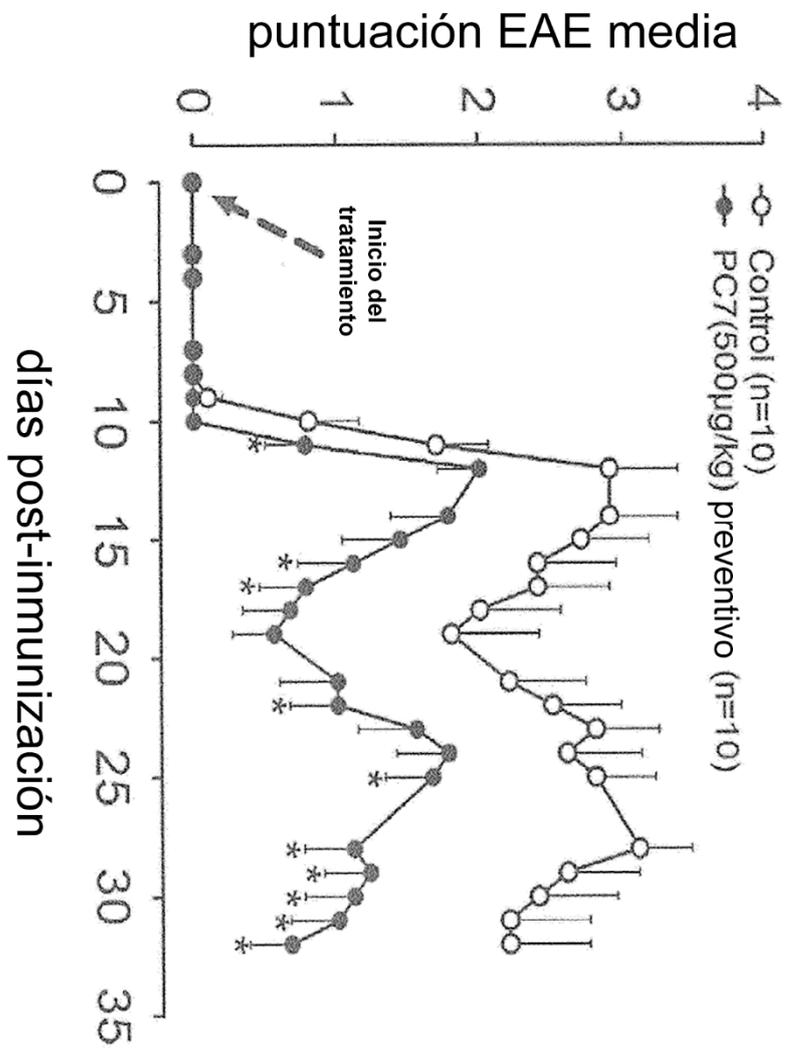


FIGURA 6

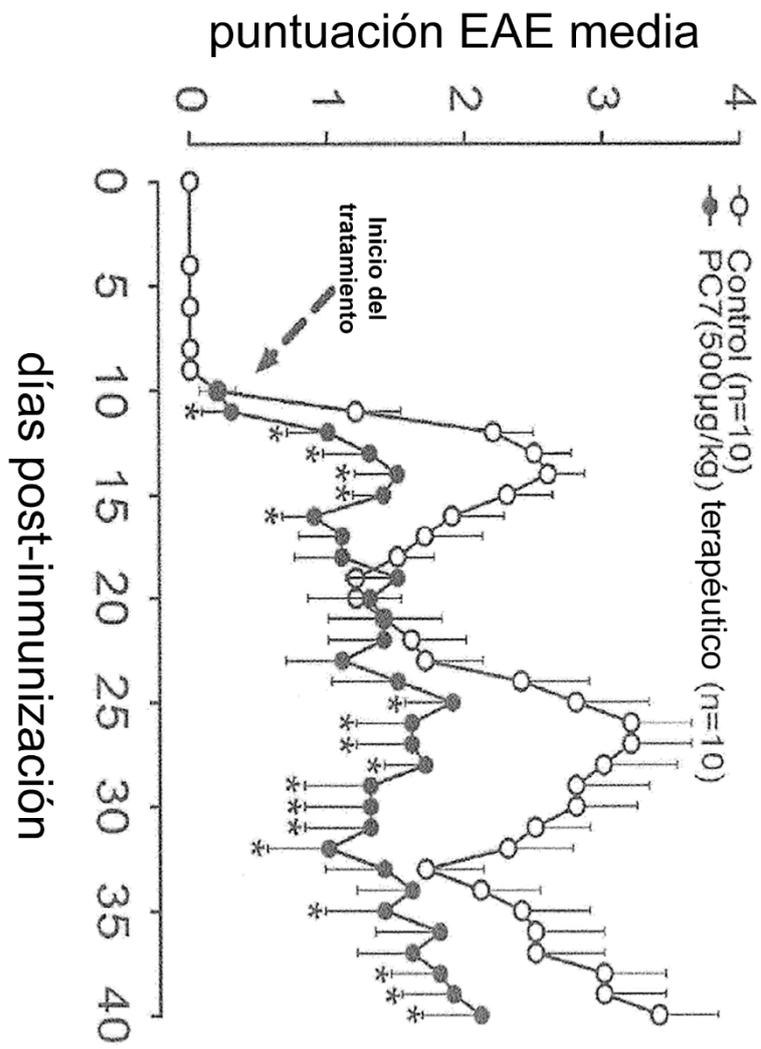


FIGURA 7

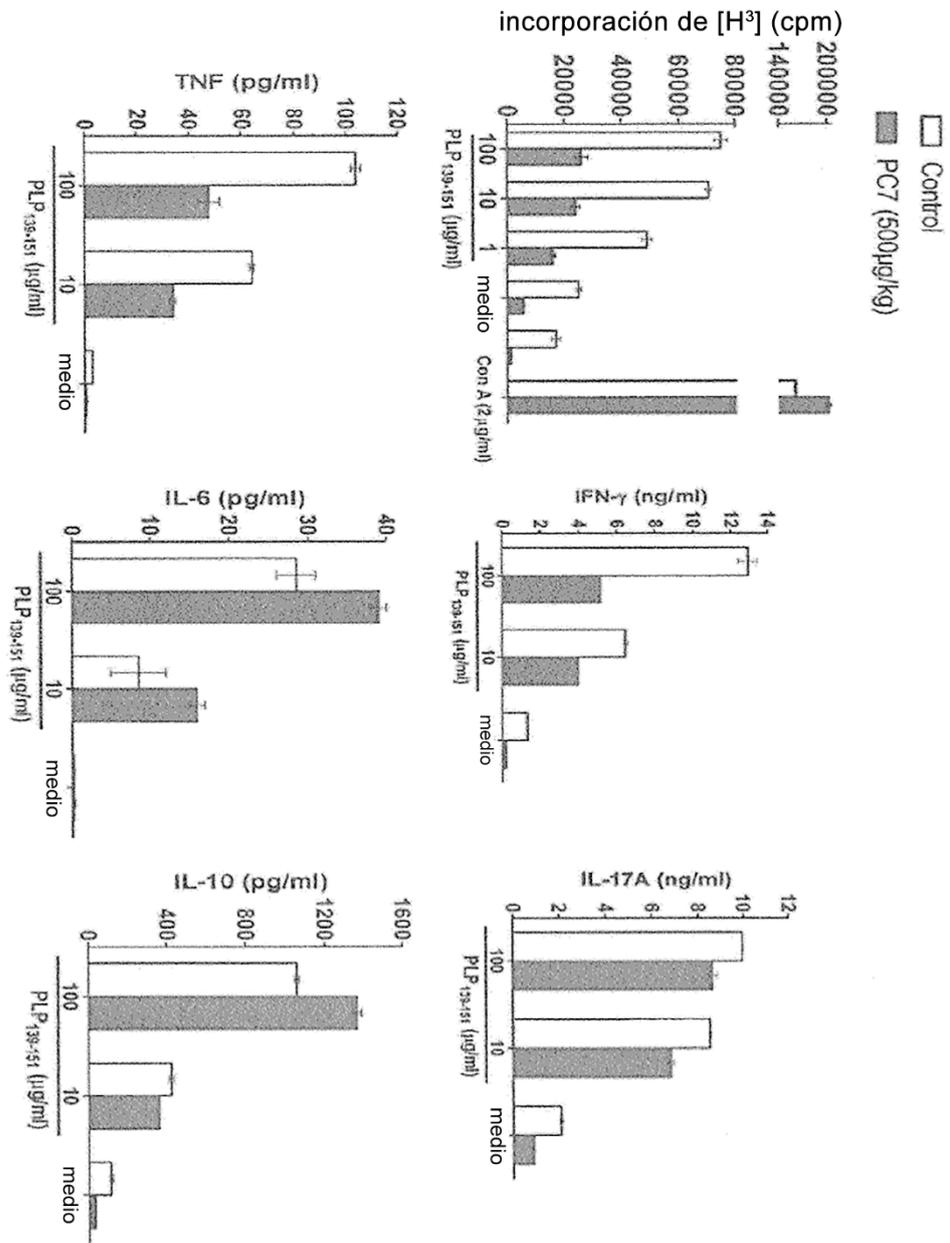


FIGURA 8

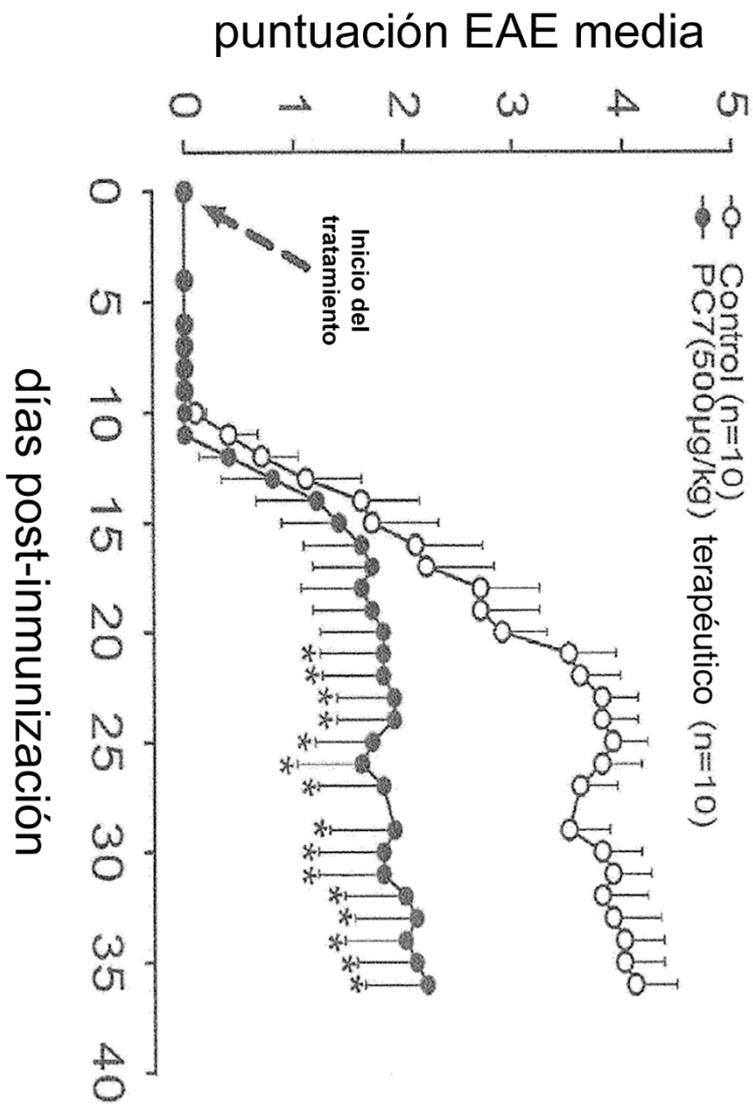


FIGURA 9

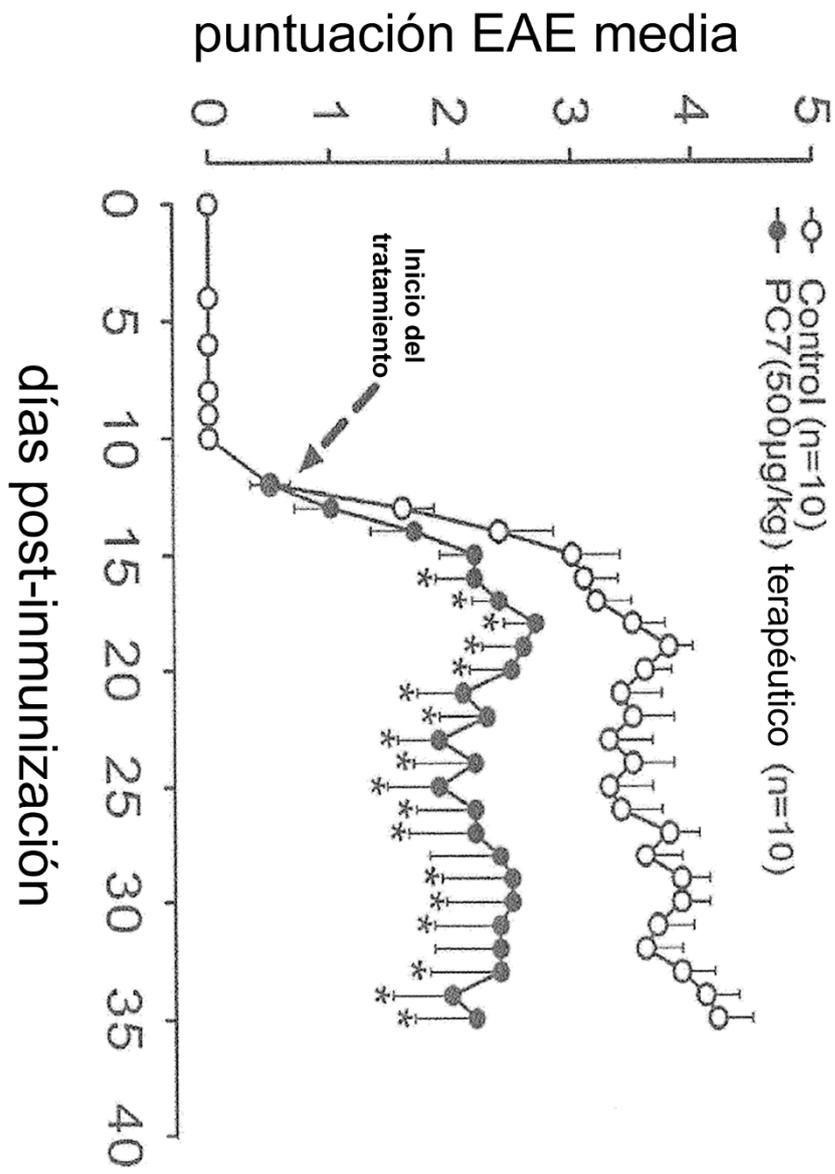


FIGURA 10

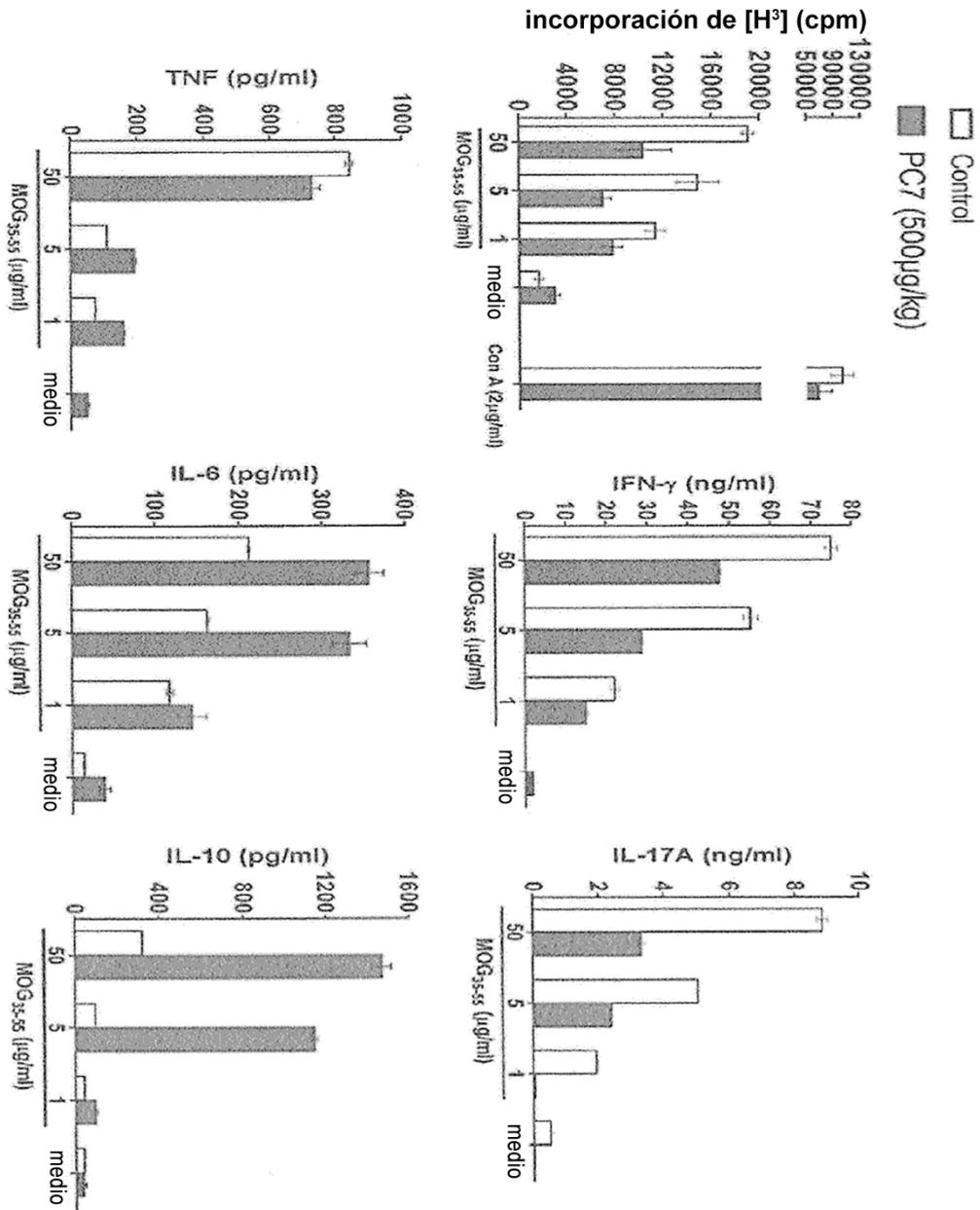


FIGURA 11