

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 732 669**

51 Int. Cl.:

A61K 31/42 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.06.2017 PCT/EP2017/064206**

87 Fecha y número de publicación internacional: **14.12.2017 WO17212061**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.06.2017 E 17735004 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.04.2019 EP 3307267**

54 Título: **Tratamiento de la esclerosis múltiple**

30 Prioridad:

10.06.2016 WO PCT/EP2016/063368

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

25.11.2019

73 Titular/es:

**ORYZON GENOMICS, S.A. (100.0%)
Carrera de San Jerónimo, 15, 2nd floor
28014 Madrid, ES**

72 Inventor/es:

**MAES, TAMARA;
MASCARÓ CRUSAT, CRISTINA y
ROTLLANT POZO, DAVID**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 732 669 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

Tratamiento de la esclerosis múltiple

Campo

La presente invención se refiere generalmente al campo del tratamiento de la esclerosis múltiple.

5 Antecedentes

La esclerosis múltiple (EM) es una enfermedad crónica desmielinizante mediada por el sistema inmunitario del sistema nervioso central (SNC). El sistema inmunitario ataca el revestimiento de mielina alrededor de los nervios en el SNC y las propias fibras nerviosas. La EM es el trastorno autoinmune más común que afecta al SNC, y es una causa principal de discapacidad en adultos jóvenes. La enfermedad comienza habitualmente entre las edades de 20 y 50. En 2015, aproximadamente 2,3 millones de personas fueron afectadas en todo el mundo.

La EM adopta varias formas, bien con síntomas nuevos que aparecen en ataques aislados (formas recidivantes) o bien progresando la enfermedad gradualmente en el tiempo sin recaídas típicas (formas progresivas). Las formas progresivas incluyen EM progresiva primaria y EM progresiva secundaria.

A pesar de una investigación intensiva, los mecanismos de la patogénesis de la enfermedad siguen sin estar claros, y aunque hay varios fármacos aprobados por la FDA para la EM, aún no existe cura. Entre estos fármacos, la mayoría están aprobados para el tratamiento de la EM recidivante-remitente, mientras que solo hay un fármaco aprobado por la FDA para el tratamiento de la EM progresiva primaria. Las medicaciones actuales usadas para tratar la EM, bien la forma recidivante-remitente o bien la forma progresiva, aunque moderadamente eficaces, pueden tener efectos secundarios graves o ser toleradas escasamente. Además, muchos de estos fármacos deben administrarse por vía parenteral, lo que es una desventaja para los pacientes en el contexto de una enfermedad crónica como la EM.

Por tanto, hay una necesidad de nuevos fármacos para tratar la EM, particularmente de fármacos que puedan ser eficaces también contra las formas progresivas de la enfermedad y/o que exhiban menos efectos secundarios que los tratamientos actuales, y que puedan administrarse por vía oral. La presente invención aborda estas y otras necesidades.

25 Compendio de la invención

La presente invención proporciona (-) 5-(((trans)-2-(4-(benciloxi)fenil)ciclopropil)amino)metil)-1,3,4-oxadiazol-2-amina o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo para uso en el tratamiento de la esclerosis múltiple.

La presente invención proporciona además un compuesto, que es (-) 5-(((trans)-2-(4-(benciloxi)fenil)ciclopropil)amino)metil)-1,3,4-oxadiazol-2-amina o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, para uso en el tratamiento de la esclerosis múltiple en un paciente (preferiblemente un ser humano), comprendiendo dicho uso administrar al paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de dicho compuesto.

La presente invención proporciona además un compuesto, que es (-) 5-(((trans)-2-(4-(benciloxi)fenil)ciclopropil)amino)metil)-1,3,4-oxadiazol-2-amina o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo para uso como medicamento para el tratamiento de la esclerosis múltiple.

En algunas realizaciones, la esclerosis múltiple es esclerosis múltiple progresiva crónica, particularmente esclerosis múltiple progresiva primaria o esclerosis múltiple progresiva secundaria.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra los resultados obtenidos con el Compuesto 1 a 1 y 3 mg/kg p.o. en el modelo de encefalitis autoinmune experimental (EAE) murino descrito en el Ejemplo 3.1 y 3.2. Los datos representan la progresión de la enfermedad para cada grupo, medida como puntuación clínica media (\pm SEM).

La Figura 2 muestra los efectos del Compuesto 1 a 1, 0,5 y 0,05 mg/kg p.o. en el modelo EAE descrito en el Ejemplo 3.3. Los datos representan la progresión de la enfermedad para cada grupo, medida como puntuación clínica media (\pm SEM).

La Figura 3 muestra los efectos del inhibidor de LSD1 designado como "ORY-LSD1" (definido además en el Ejemplo 1) a 0,06 y 0,180 mg/kg p.o en el modelo EAE descrito en el Ejemplo 3.4. Los datos representan la progresión de la enfermedad para cada grupo, medida como puntuación clínica media (\pm SEM).

La Figura 4 muestra los efectos del Compuesto 1 a 0,5 mg/kg p.o. en el ensayo EAE descrito en el Ejemplo 4. Los datos representan la progresión de la enfermedad para cada grupo, medida como puntuación clínica media (\pm SEM).

La Figura 5 muestra los resultados del análisis histopatológico de médulas espinales aisladas al final del tratamiento (26 días después de la inmunización) de animales tratados con el Compuesto 1 a 0,5 mg/kg p.o. o vehículo en el

ensayo EAE descrito en el Ejemplo 4. Las imágenes mostradas corresponden a secciones transversales de la médula espinal cervical (A) y lumbar (B) seleccionadas en el pico de enfermedad clínica, teñidas con Kluver-Barrera. Las flechas apuntan a áreas de desmielinización e infiltración celular inflamatoria. La barra horizontal indica una escala de 200 µm.

- 5 La Figura 6 muestra el número medio de placas de desmielinización en las regiones lumbar y cervical que corresponden a las médulas espinales aisladas en el Ejemplo 4, demostrando una desmielinización ausente o reducida en gran medida en las secciones de la médula espinal cervical y lumbar, respectivamente, de animales tratados con el Compuesto 1.

10 La Figura 7 muestra el número de células inmunitarias aisladas del bazo y ganglios linfáticos de animales tratados con el Compuesto 1 a 0,5 mg/kg p.o. o vehículo según el Ejemplo 4, demostrando un aumento significativo en el número de linfocitos T retenidos en el bazo y ganglios linfáticos de animales tratados con el Compuesto 1, indicando una salida reducida de linfocitos de los tejidos inmunitarios.

15 La Figura 8 muestra los niveles de varias citocinas y quimiocinas determinados por ELISA en médulas espinales recogidas en el día 26 postinmunización de animales tratados con el Compuesto 1 a 0,5 mg/kg p.o. o vehículo según el Ejemplo 4. Fig 8A: IL-4; Fig 8B: IL-6; Fig 8C: IL-1beta; Fig 8D: IP-10; Fig 8E: MCP-1. Los niveles se expresan como ng/100 mg de proteína tisular.

Descripción detallada de la invención

20 La presente invención se basa en la identificación del compuesto (-) 5-(((trans)-2-(4-(benciloxi)fenil)ciclopropil)amino)metil)-1,3,4-oxadiazol-2-amina como un agente terapéutico sumamente eficaz para el tratamiento de la esclerosis múltiple, como se explica en más detalle en la presente memoria a continuación y se ilustra en los Ejemplos.

25 Este compuesto, (-) 5-(((trans)-2-(4-(benciloxi)fenil)ciclopropil)amino)metil)-1,3,4-oxadiazol-2-amina, se designa en los Ejemplos y Figuras como Compuesto 1 (o Comp. 1). Los nombres "(-) 5-(((trans)-2-(4-(benciloxi)fenil)ciclopropil)amino)metil)-1,3,4-oxadiazol-2-amina", "Compuesto 1" o "Comp. 1" se usan de manera intercambiable en la presente memoria.

Por consiguiente, la presente invención proporciona (-) 5-(((trans)-2-(4-(benciloxi)fenil)ciclopropil)amino)metil)-1,3,4-oxadiazol-2-amina o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo para uso en el tratamiento de la esclerosis múltiple.

30 La presente invención proporciona además un compuesto, que es (-) 5-(((trans)-2-(4-(benciloxi)fenil)ciclopropil)amino)metil)-1,3,4-oxadiazol-2-amina o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, para uso en el tratamiento de la esclerosis múltiple en un paciente (preferiblemente un ser humano), comprendiendo dicho uso administrar al paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de dicho compuesto.

35 La presente invención proporciona además (-) 5-(((trans)-2-(4-(benciloxi)fenil)ciclopropil)amino)metil)-1,3,4-oxadiazol-2-amina o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, para uso como medicamento para el tratamiento de la esclerosis múltiple.

En algunas realizaciones, la esclerosis múltiple es esclerosis múltiple progresiva crónica (p.ej., esclerosis múltiple progresiva primaria o esclerosis múltiple progresiva secundaria).

40 Por consiguiente, la presente invención proporciona además (-) 5-(((trans)-2-(4-(benciloxi)fenil)ciclopropil)amino)metil)-1,3,4-oxadiazol-2-amina o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, para uso en el tratamiento de la esclerosis múltiple progresiva crónica.

La presente invención proporciona además un compuesto, que es (-) 5-(((trans)-2-(4-(benciloxi)fenil)ciclopropil)amino)metil)-1,3,4-oxadiazol-2-amina o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, para uso en el tratamiento de la esclerosis múltiple progresiva en un paciente (preferiblemente un ser humano), comprendiendo dicho uso administrar al paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de dicho compuesto.

45 La presente invención proporciona además (-) 5-(((trans)-2-(4-(benciloxi)fenil)ciclopropil)amino)metil)-1,3,4-oxadiazol-2-amina o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo para uso como medicamento para el tratamiento de la esclerosis múltiple progresiva crónica.

50 Preferiblemente, el compuesto (-) 5-(((trans)-2-(4-(benciloxi)fenil)ciclopropil)amino)metil)-1,3,4-oxadiazol-2-amina (o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo) se administra por vía oral. Las formulaciones ilustrativas que pueden administrarse por ingestión peroral (o deglución) se describen en más detalle más adelante.

Como se explicó anteriormente, la presente invención proporciona el compuesto (-) 5-(((trans)-2-(4-(benciloxi)fenil)ciclopropil)amino)metil)-1,3,4-oxadiazol-2-amina o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable de dicho compuesto, para uso en el tratamiento de la esclerosis múltiple. Por consiguiente, la invención se refiere al

compuesto (-) 5-(((trans)-2-(4-(benciloxi)fenil)ciclopropil)amino)metil)-1,3,4-oxadiazol-2-amina como base libre (en forma no de sal) para uso en el tratamiento de la esclerosis múltiple (p.ej., esclerosis múltiple progresiva crónica) y, además, la invención también se refiere a una sal o solvato farmacéuticamente aceptable de (-) 5-(((trans)-2-(4-(benciloxi)fenil)ciclopropil)amino)metil)-1,3,4-oxadiazol-2-amina para uso en el tratamiento de la esclerosis múltiple (p.ej., esclerosis múltiple progresiva crónica).

Como se ilustra en los Ejemplos, el compuesto (-) 5-(((trans)-2-(4-(benciloxi)fenil)ciclopropil)amino)metil)-1,3,4-oxadiazol-2-amina proporciona claros efectos terapéuticos en modelos animales de esclerosis múltiple. En particular, el Compuesto 1 se ha ensayado usando un modelo de Encefalomiелitis Autoinmune Experimental (EAE). La EAE muestra similitudes patológicas y clínicas a la EM humana, y se usa ampliamente como sistema modelo para ensayar agentes terapéuticos para la EM potenciales. En particular, el modelo EAE murino descrito en los Ejemplos, que usa el linaje de ratones MOG₃₅₋₅₅ y C57BL/6, se considera un modelo preclínico validado de la forma progresiva crónica de la EM.

Los efectos del Compuesto 1 sobre la EAE activa crónica se han evaluado en un régimen terapéutico, es decir, administrando el compuesto después del inicio de los síntomas de la enfermedad. Como se ilustra en más detalle en el Ejemplo 3 y las Figuras 1, 2 y 4, el tratamiento con el Compuesto 1 inhibió en gran medida el desarrollo de EAE y redujo la incidencia y gravedad de la enfermedad, medido por una puntuación clínica media diaria. Por ejemplo, en un ensayo de EAE donde el Compuesto 1 se administró a 1 o 3 mg/kg p.o., mientras que los ratones tratados con vehículo desarrollaron signos moderados a severos de EAE y mostraron mortalidad debido a parálisis severa, en los grupos tratados con el Compuesto 1, 40-70% de los ratones presentaron síntomas leves y 30% de ellos se recuperaron casi completamente 40 días después del comienzo de la enfermedad. Se ha encontrado que el compuesto 1 es eficaz en este modelo de EM a dosis tan bajas como 0,05 mg/kg p.o., como se muestra en el Ejemplo 3.3 y la Figura 2. De manera importante, el efecto protector del Compuesto 1 se mantuvo durante un periodo de tiempo largo después del cese del tratamiento.

Es notable que el Compuesto 1 exhibe un rápido comienzo de acción contra la progresión de la enfermedad, exhibiendo efectos beneficiosos sobre la puntuación clínica diaria ya poco después del inicio del tratamiento, como se muestra p.ej. en la Figura 1. Por tanto el Compuesto 1 puede ser beneficioso para proporcionar un alivio temprano de los ataques agudos de EM o esclerosis múltiple de progresión rápida, y puede proporcionar una alternativa al tratamiento estándar con dosis altas i.v. de corticosteroides, especialmente en casos de hipersensibilidad o alergia a los corticosteroides.

Como se ilustra en el Ejemplo 4 y las Figuras 5 y 6, el Compuesto 1 es útil para reducir la infiltración de células inmunitarias en la médula espinal, así como reducir la desmielinización en la médula espinal, como se muestra en los ratones EAE. El tratamiento con el Compuesto 1 reduce la salida de linfocitos de los tejidos inmunitarios, como muestra un aumento significativo en el número de células inmunitarias retenidas en el bazo y los ganglios linfáticos, como se describe en más detalle en el Ejemplo 4 y la Figura 7. El Compuesto 1 también reduce citocinas proinflamatorias tales como IL-6 y IL-1beta, y quimiocinas tales como IP-10 y MCP-1 en la médula espinal (véase la Figura 8). La citocina IL-4 aumentó significativamente en las médulas espinales de los animales tratados con el Compuesto 1, indicativo de respuesta antiinflamatoria Th2 (Figura 8A).

De manera importante, los efectos terapéuticos del Compuesto 1 en la EM pueden conseguirse en dosis que no producen efectos relevantes clínicamente sobre la hematología o los recuentos de linfocitos circulantes, un efecto secundario habitual en los fármacos para EM, y/o sin signos de toxicidad gastrointestinal. Por consiguiente, el Compuesto 1 puede usarse para tratar la EM, incluyendo EM progresiva, sin producir efectos relevantes clínicamente sobre la hematología o los recuentos de linfocitos circulantes. Se ha encontrado que los efectos terapéuticos del Compuesto 1 en el tratamiento de la EM son inesperadamente sobresalientes, también cuando se comparan con los efectos de otros inhibidores de LSD1. El Compuesto 1 es un inhibidor de LSD1 irreversible basado en ciclopropilamino. Usando el modelo EAE de la EM del Ejemplo 3.1, se compararon los efectos del Compuesto 1 con otro inhibidor de LSD1 irreversible basado en ciclopropilamino, el compuesto designado como ORY-LSD1, descrito en más detalle en el Ejemplo 1. El Compuesto 1 exhibe una IC50 contra LSD1 de 90 nM, mientras que el ORY-LSD1 tiene una IC50 contra LSD1 de 10 nM, como se describe en más detalle en el Ejemplo 2. Como los dos compuestos tienen potencias in vitro contra LSD1 diferentes, se ensayó el ORY-LSD1 en el modelo EAE del Ejemplo 3 en dosis equivalentes a las usadas para el Compuesto 1 con respecto a la inhibición de LSD1 in vivo. Aunque el ORY-LSD1 proporcionó una clara tendencia a la mejora (Figura 3), el Compuesto 1 fue considerablemente más eficaz que ORY-LSD1. El Compuesto 1 es por lo tanto un inhibidor de LSD1 particularmente adecuado para el uso en el tratamiento de la esclerosis múltiple.

Formulaciones farmacéuticas

Aunque es posible que el Compuesto 1 pueda administrarse para uso en terapia directamente como tal, se administra típicamente en la forma de una composición farmacéutica, que comprende el Compuesto 1 como ingrediente farmacéutico activo junto con uno o más excipientes o vehículos farmacéuticamente aceptables. Cualquier referencia al Compuesto 1 en la presente memoria incluye el compuesto como base libre y cualquier sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo.

El Compuesto 1 puede administrarse por cualquier medio que lleve a cabo el propósito pretendido. Los ejemplos incluyen la administración por vía oral, parenteral, intravenosa, subcutánea o tópica.

Para administración oral, el Compuesto 1 puede ser incorporado en una formulación que incluya vehículos farmacéuticamente aceptables tales como aglutinantes (p.ej., gelatina, celulosa, goma tragacanto), excipientes (p.ej., almidón, lactosa), lubricantes (p.ej., estearato de magnesio, dióxido de silicio), agentes disgregantes (p.ej., alginato, Primogel y almidón de maíz), y agentes edulcorantes o aromatizantes (p.ej., glucosa, sacarosa, sacarina, salicilato de metilo y hierbabuena). La formulación puede administrarse por vía oral en la forma de cápsulas de gelatina cerradas o comprimidos. Las cápsulas y comprimidos pueden prepararse por cualquier técnica convencional. Las cápsulas y comprimidos también pueden revestirse con diversos revestimientos conocidos en la técnica para modificar los aromas, sabores, colores y formas de las cápsulas y comprimidos. Además, también pueden incluirse en las cápsulas vehículos líquidos tales como aceite graso.

Las formulaciones orales adecuadas también pueden estar en la forma de suspensión, jarabe, goma de mascar, oblea, elixir y similares. Si se desea, también pueden incluirse agentes convencionales para modificar aromas, sabores, colores y formas de las formas especiales. Además, para una administración conveniente mediante un tubo de alimentación enteral en pacientes incapaces de tragar, los compuestos activos pueden disolverse en un vehículo de aceite vegetal lipófilo aceptable tal como aceite de oliva, aceite de maíz y aceite de cártamo.

El Compuesto 1 también puede administrarse por vía parenteral en la forma de disolución o suspensión, o en forma liofilizada capaz de convertirse en una forma de disolución o suspensión antes del uso. En tales formulaciones, pueden usarse diluyentes o vehículos farmacéuticamente aceptables tales como agua estéril y suero salino fisiológico tamponado. También pueden incluirse otros disolventes convencionales, amortiguadores de pH, estabilizantes, agentes antibacterias, tensioactivos y antioxidantes. Por ejemplo, componentes útiles incluyen cloruro de sodio, acetatos, amortiguadores de citratos o fosfatos, glicerina, dextrosa, aceites fijos, metilparabenos, polietilenglicol, propilenglicol, bisulfato de sodio, alcohol bencílico, ácido ascórbico y similares. Las formulaciones parenterales pueden almacenarse en cualesquiera recipientes convencionales, tal como viales y ampollas.

Para administración tópica, el Compuesto 1 puede formularse en lociones, cremas, pomadas, geles, polvos, pastas, pulverizadores, suspensiones, gotas y aerosoles. Por tanto, pueden incluirse en las formulaciones uno o más agentes espesantes, humectantes y agentes estabilizantes. Los ejemplos de tales agentes incluyen, pero no se limitan a, polietilenglicol, sorbitol, goma xantana, vaselina, cera de abejas, o aceite mineral, lanolina, escualeno y similares. Una forma especial de administración tópica es la entrega mediante un parche transdérmico. Se describen métodos para preparar parches transdérmicos, p.ej., en Brown, et al. (1988) *Ann. Rev. Med.* 39:221-229.

La implantación subcutánea para liberación sostenida del Compuesto 1 también puede ser una vía adecuada de administración. Esto implica procedimientos quirúrgicos para implantar un compuesto activo en cualquier formulación adecuada en un espacio subcutáneo, p.ej., debajo de la pared abdominal anterior. Véase, p.ej., Wilson et al. (1984) *J. Clin. Psych.* 45:242-247. Pueden usarse hidrogeles como vehículo para la liberación sostenida de compuestos activos. Los hidrogeles se conocen generalmente en la técnica. Se preparan típicamente reticulando polímeros biocompatibles de alto peso molecular en una red, que se hincha en el agua para formar un material similar a un gel. Preferiblemente, los hidrogeles son biodegradables o bioabsorbibles. Para los fines de esta invención, los hidrogeles hechos de polietilenglicoles, colágeno o poli(ácido glicólico-co-L-láctico) pueden ser útiles. Véase, p.ej., Phillips et al. (1984) *J. Pharmaceut. Sci.*, 73: 1718-1720.

El Compuesto 1 también puede ser conjugado con un polímero de alto peso molecular, no inmunogénico, no peptídico, soluble en agua, para formar un conjugado polimérico. Por ejemplo, el Compuesto 1 puede enlazarse covalentemente a polietilenglicol para formar un conjugado. Por regla general, tal conjugado exhibe una solubilidad mejorada, estabilidad, y una toxicidad e inmunogenicidad reducidas. Por tanto, cuando se administra a un paciente, el Compuesto 1 en el conjugado puede tener una semivida en el cuerpo más larga, y exhibir mejor eficacia. Véase generalmente Burnham (1994) *Am. J. Hosp. Pharm.* 15:210-218. Actualmente se están usando proteínas PEGiladas en terapias de sustitución de proteínas y para otros usos terapéuticos. Por ejemplo, se usa clínicamente interferón PEGilado (PEG-INTRON A®) para tratar la Hepatitis B. Se está usando adenosina desaminasa PEGilada (ADAGEN®) para tratar la enfermedad de inmunodeficiencia combinada severa (EICS). Se está usando L-asparaginasa PEGilada (ONCAPSPAR®) para tratar la leucemia linfoblástica aguda (LLA). Se prefiere que el enlace covalente entre el polímero y el compuesto activo y/o el propio polímero sea degradable hidrolíticamente en condiciones fisiológicas. Tales conjugados, conocidos como "profármacos", pueden liberar fácilmente el compuesto activo dentro del cuerpo. También puede conseguirse una liberación controlada de un compuesto activo incorporando el ingrediente activo en microcápsulas, nanocápsulas o hidrogeles conocidos generalmente en la técnica. Otros profármacos farmacéuticamente aceptables del Compuesto 1 incluyen, pero no se limitan a, ésteres, carbonatos, tiocarbonatos, derivados de N-acilo, derivados de N-aciloxialquilo, derivados cuaternarios de aminas terciarias, bases de N-Mannich, bases de Schiff, conjugados e aminoácidos, ésteres de fosfato, sales metálicas y ésteres de sulfonato.

También pueden usarse liposomas como vehículos para el compuesto activo. Los liposomas son micelas hechas de diversos lípidos tales como colesterol, fosfolípidos, ácidos grasos y derivados de los mismos. También pueden usarse diversos lípidos modificados. Los liposomas pueden reducir la toxicidad de los compuestos activos, y aumentar su estabilidad. Los métodos para preparar suspensiones liposomales que contienen ingredientes activos en las mismas

se conocen generalmente en la técnica. Véase, p.ej., la patente de EE.UU. N° 4.522.811; Prescott, Ed., Methods in Cell Biology, Volume XIV, Academic Press, New York, N.Y. (1976).

5 Las composiciones farmacéuticas, como composiciones orales y parenterales, pueden formularse en formas de dosificación unitaria por facilidad de administración y uniformidad de dosificación. Como se emplea en la presente memoria, "formas de dosificación unitaria" hace referencia a unidades físicamente discretas adecuadas como dosificaciones unitarias para administración a sujetos, conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de ingrediente activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado, en asociación con uno o más vehículos farmacéuticos adecuados.

10 En aplicaciones terapéuticas, las composiciones farmacéuticas son para ser administradas de una manera apropiada para la enfermedad a ser tratada, determinada por un experto en las técnicas médicas. Una dosis apropiada y duración y frecuencia de administración adecuadas serán determinadas por factores tales como el estado del paciente, el tipo y gravedad de la enfermedad, la forma particular del ingrediente activo, el método de administración, entre otros. En general, una dosis y régimen de administración apropiados proporciona la composición farmacéutica en una cantidad suficiente para proporcionar beneficio terapéutico, por ejemplo un resultado clínico mejorado, tal como remisiones completas o parciales más frecuentes, o supervivencia libre de enfermedad y/o global más larga, o disminución de la gravedad de los síntomas, o cualquier otra mejora objetivamente identificable advertida por el clínico. Las dosis efectivas pueden ser evaluadas o extrapoladas generalmente usando modelos experimentales como curvas de dosis-respuesta derivadas de sistemas de ensayo in vitro o de modelos animales como los ilustrados en los Ejemplos.

20 Las composiciones farmacéuticas pueden incluirse en un envase, paquete o dispensador junto con instrucciones para la administración.

El Compuesto 1 es activo por vía oral y es eficaz en el tratamiento de la EM cuando se administra por vía oral, como se ilustra en los Ejemplos 3 y 4. Por consiguiente, se prefiere que el Compuesto 1 sea administrado por vía oral para el tratamiento de la EM.

Definiciones

25 A menos que se definan de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente memoria tienen el mismo significado que el entendido habitualmente por un experto en la técnica a la que esta invención pertenece.

Las siguientes definiciones se aplican en toda la presente memoria descriptiva y reivindicaciones, a menos que se indique específicamente otra cosa.

30 Un "paciente" o "sujeto", para los fines de la presente invención, incluye tanto seres humanos como otros animales, particularmente mamíferos, y otros organismos. Por tanto, los métodos son aplicables tanto a terapia humana como aplicaciones veterinarias. En un aspecto preferido el sujeto o paciente es un mamífero, y en el aspecto más preferido el sujeto o paciente es un ser humano.

35 Los términos "tratamiento", "tratar" y similares se usan en la presente memoria para significar generalmente obtener un efecto farmacológico y/o fisiológico deseado. El efecto puede ser profiláctico, en términos de prevenir completamente o parcialmente una enfermedad o síntoma de la misma, y/o puede ser terapéutico, en términos de curar parcialmente o completamente una enfermedad y/o efecto adverso atribuido a la enfermedad. El término "tratamiento", como se emplea en la presente memoria, cubre cualquier tratamiento de una enfermedad en un paciente, e incluye: (a) prevenir una enfermedad en un paciente que puede estar predispuesto/en riesgo de desarrollar la enfermedad; (b) inhibir la enfermedad, es decir, detener su desarrollo; o (c) aliviar la enfermedad, es decir, causar regresión de la enfermedad. Como se emplea en la presente memoria, la expresión "tratar una enfermedad" o "tratamiento de una enfermedad" hace referencia particularmente a una ralentización de o una inversión del progreso de la enfermedad. Tratar una enfermedad incluye tratar un síntoma y/o reducir los síntomas de la enfermedad.

45 Como se emplea en la presente memoria, la expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" hace referencia a la cantidad suficiente para producir un efecto biológico deseado (p.ej., un efecto terapéutico) en un sujeto. Por consiguiente, una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto puede ser una cantidad que sea suficiente para tratar una enfermedad, y/o retrasar el comienzo o progresión de una enfermedad, y/o aliviar uno o más síntomas de la enfermedad, cuando se administra a un sujeto que padece de o es susceptible a esa enfermedad.

50 Como se emplea en la presente memoria, una "sal farmacéuticamente aceptable" pretende significar una sal que conserva la eficacia biológica de los ácidos y bases libres del compuesto especificado, y que no es indeseable biológicamente ni de otro modo. Un compuesto puede poseer un grupo funcional suficientemente ácido, suficientemente básico, o ambos grupos funcionales, y por consiguiente reaccionar con cualquiera de varias bases inorgánicas u orgánicas, y ácidos inorgánicos y orgánicos, para formar una sal farmacéuticamente aceptable. Las sales farmacéuticamente aceptables ilustrativas incluyen las sales preparadas por reacción del Compuesto 1 con un ácido mineral u orgánico, tales como hidrocloruros, hidrobromuros, sulfatos, piro-sulfatos, bisulfatos, sulfitos, bisulfitos, fosfatos, monohidrofosfatos, dihidrofosfatos, metafosfatos, pirofosfatos, cloruros, bromuros, yoduros, nitratos, acetatos, propionatos, decanoatos, caprilatos, acrilatos, formiatos, isobutiratos, caproatos, heptanoatos, propiolatos,

oxalatos, malonatos, succinatos, suberatos, sebacatos, fumaratos, maleatos, butino-1,4-dioatos, hexino-1,6-dioatos, benzoatos, clorobenzoatos, metilbenzoatos, dinitrobenzoatos, hidroxibenzoatos, metoxibenzoatos, ftalatos, sulfonatos, xilenosulfonatos, fenilacetatos, fenilpropionatos, fenilbutiratos, citratos, lactatos, gamma-hidroxibutiratos, glicolatos, tartratos, metanosulfonatos, etanosulfonatos, propanosulfonatos, bencenosulfonatos, toluenosulfonatos, trifluorometanosulfonatos, naftaleno-1-sulfonatos, naftaleno-2-sulfonatos, mandelatos, piruvatos, estearatos, ascorbatos o salicilatos. Cuando un compuesto lleva un resto ácido, las sales farmacéuticamente aceptables adecuadas del mismo pueden incluir sales de metales alcalinos, p.ej., sales de sodio o potasio; sales de metales alcalinotérreos, p.ej. sales de calcio o magnesio; y sales formadas con ligandos orgánicos adecuados tales como amoniaco, alquilaminas, hidroxialquilaminas, lisina, arginina, N-metilglucamina, procaína y similares. Las sales farmacéuticamente aceptables son bien conocidas en la técnica.

Como se emplea en la presente memoria, un "solvato farmacéuticamente aceptable" hace referencia a un complejo de estequiometría variable formado por un soluto y un disolvente farmacéuticamente aceptable tal como agua, etanol y similares. Un complejo con agua se conoce como hidrato.

Como se emplea en la presente memoria, un "vehículo farmacéuticamente aceptable" o "excipiente farmacéuticamente aceptable" hace referencia a sustancias no API (API hace referencia a Ingrediente Farmacéutico Activo) tales como disgregantes, aglutinantes, cargas y lubricantes usados en la formulación de productos farmacéuticos. Son generalmente seguros para la administración a los seres humanos según las normativas gubernamentales establecidas, incluyendo las promulgadas por la Administración de Alimentos y Fármacos de Estados Unidos y la Agencia Europea del Medicamento. Los vehículos o excipientes farmacéuticamente aceptables son bien conocidos por los expertos en la técnica.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos ilustran diversos aspectos de la invención. Debe entenderse, por supuesto, que los ejemplos son meramente ilustrativos de solo ciertas realizaciones de la invención y no constituyen limitaciones sobre el alcance de la invención. También se presentan y describen resultados en las Figuras y leyendas de las Figuras.

25 Ejemplo 1: Materiales

El Compuesto 1 es el compuesto (-) 5-(((trans)-2-(4-(benciloxi)fenil)ciclopropil)amino)metil)-1,3,4-oxadiazol-2-amina, que puede obtenerse como se describe en la solicitud de patente internacional WO2012/013728.

ORY-LSD1 es el compuesto N-((1R,2S)-2-(2-fluorofenil)ciclopropil)piperidin-4-amina, que puede obtenerse como se describe en la solicitud de patente internacional WO2013/057320.

30 Ejemplo 2: Ensayos bioquímicos in vitro

2.1 LSD1

La actividad inhibitoria de un compuesto de interés contra LSD1 puede ser ensayada usando el método descrito a continuación: Se usó proteína LSD1 recombinante humana de BPS Bioscience Inc (número de referencia de catálogo 50100: LSD1 recombinante humana, nº de acceso a GenBank NM_015013, aminoácidos 158-extremo con etiqueta GST N-terminal, MW: 103 kDa). A fin de hacer un seguimiento de la actividad enzimática de la LSD1 y/o su tasa de inhibición por un compuesto de ensayo, se eligió como sustrato el péptido H3-K4 dimetilado (Anaspec). La actividad desmetilasa se estimó, en condiciones aeróbicas, midiendo la liberación del H₂O₂ producido durante el proceso catalítico, usando el kit de ensayo de peróxido de hidrógeno/peroxidasa Amplex® Red (Invitrogen).

Brevemente, se incubó una cantidad fija de LSD1 en hielo durante 15 minutos, en ausencia y/o en presencia de al menos ocho diluciones en serie de 3 veces del inhibidor respectivo (p.ej., de 0 a 75 µM, dependiendo de la fuerza del inhibidor). Se usó Tranilcipromina (Biomol International) como control para la inhibición. Dentro del experimento, cada concentración de inhibidor se ensayó por duplicado. Después de dejar la enzima interactuando con el inhibidor, se añadió K_M de péptido H3-K4 dimetilado a cada reacción y se dejó el experimento durante 30 minutos a 37°C en la oscuridad. Las reacciones enzimáticas se configuraron en un amortiguador de fosfato de sodio 50 mM, pH 7,4. Al final de la incubación, se añadieron a la reacción el reactivo Amplex® Red y una disolución de peroxidasa de rábano picante (HPR) según las recomendaciones proporcionadas por el proveedor (Invitrogen), y se dejó incubar durante 5 minutos extra a temperatura ambiente en la oscuridad. Se usó una disolución de H₂O₂ 1 µM como control de la eficacia del kit. La conversión del reactivo Amplex® Red en resorufina debido a la presencia de H₂O₂ en el ensayo se monitorizó por fluorescencia (excitación a 540 nm, emisión a 590 nm) usando un lector de microplacas (Infinite 200, Tecan). Se usaron unidades arbitrarias para medir el nivel de H₂O₂ producido en ausencia y/o en presencia de inhibidor. La actividad desmetilasa máxima de LSD1 se obtuvo en ausencia de inhibidor y se corrigió para fluorescencia de fondo en ausencia de LSD1. El valor IC₅₀ de cada inhibidor se calculó con el programa informático GraphPad Prism.

2.2 Monoamina oxidasa A (MAO-A) y B (MAO-B)

La LSD1 tiene un amplio grado de similitud estructural e identidad/homología de aminoácidos con las amina oxidasas dependientes de flavina monoamina oxidasa A (MAO-A) y B (MAO-B). Para determinar el nivel de selectividad de un

inhibidor de LSD1 frente a MAO-A y MAO-B, la actividad inhibitoria de un compuesto de interés contra MAO-A y MAO-B puede ser ensayada usando el método descrito a continuación:

Las proteínas monoamina oxidasa recombinantes humanas MAO-A y MAO-B se adquirieron en Sigma Aldrich. Las MAOs catalizan la desaminación oxidativa de aminas primarias, secundarias y terciarias. A fin de monitorizar las actividades enzimáticas MAO y/o su tasa de inhibición por inhibidores de interés, se configuró un ensayo de cribado de inhibidores basado en fluorescencia. Se eligió como sustrato 3-(2-aminofenil)-3-oxopropanamina (kinuramina dihidrobromuro, Sigma Aldrich), un compuesto no fluorescente. La kinuramina es un sustrato no específico tanto para las actividades de MAO-A como de MAO-B. Mientras sufre desaminación oxidativa por las actividades de MAO, la kinuramina se convierte en 4-hidroxiquinolina (4-HQ), un producto fluorescente resultante.

La actividad monoamina oxidasa se estimó midiendo la conversión de kinuramina en 4-hidroxiquinolina. Los ensayos se realizaron en placas negras de 96 pocillos con fondo transparente (Corning) en un volumen final de 100 μ L. El amortiguador del ensayo fue HEPES 100 mM, pH 7,5. Cada experimento se realizó por duplicado dentro del mismo experimento.

Brevemente, se incubó una cantidad fija de MAO en hielo durante 15 minutos en el amortiguador de la reacción, en ausencia y/o en presencia de al menos ocho diluciones en serie de 3 veces de cada una. Se usó Clorgilina y Deprenilo (Sigma Aldrich) como control para la inhibición específica de MAO-A y MAO-B respectivamente.

Después de dejar la(s) enzima(s) interactuando con el inhibidor, se añadió K_M de kinuramina a cada reacción para el ensayo de MAO-B y MAO-A respectivamente, y la reacción se dejó durante 1 hora a 37°C en la oscuridad. La desaminación oxidativa del sustrato se detuvo añadiendo 50 μ L de NaOH 2N. La conversión de kinuramina en 4-hidroxiquinolina se monitorizó por fluorescencia (excitación a 320 nm, emisión a 360 nm) usando un lector de microplacas (Infinite 200, Tecan). Se usaron unidades arbitrarias para medir los niveles de fluorescencia producidos en ausencia y/o en presencia de inhibidor.

El máximo de actividad de desaminación oxidativa se obtuvo midiendo la cantidad de 4-hidroxiquinolina formada a partir de la desaminación de la kinuramina en ausencia de inhibidor, y se corrigió para la fluorescencia de fondo en ausencia de enzimas MAO. Los valores IC₅₀ de cada inhibidor se calcularon con el programa informático GraphPad Prism.

2.3 Resultados

En la tabla a continuación se muestran valores IC₅₀ ilustrativos contra LSD1, MAO-A y MAO-B obtenidos usando los métodos anteriores para el Compuesto 1 y ORY-LSD1:

Compuesto	LSD1	MAO-B	MAO-A
	IC ₅₀ (μ M)	IC ₅₀ (μ M)	IC ₅₀ (μ M)
Compuesto 1	0,09	0,06	5,3
ORY-LSD1	0,010	>100	>100

Como puede verse a partir de los datos anteriores, el Compuesto 1 es un potente inhibidor dual de LSD1/MAO-B. ORY-LSD1 es un potente inhibidor de LSD1 con selectividad para LSD1 sobre MAO-A y MAO-B.

Ejemplo 3: Evaluación de la eficacia del Compuesto 1 sobre encefalomiелitis autoinmune experimental en ratones

El modelo de Encefalomiелitis Autoinmune Experimental (EAE) muestra similitudes patológicas y clínicas con la esclerosis múltiple (EM) humana, y se usa ampliamente como modelo para la EM. En particular, el modelo de EAE murino descrito en la presente memoria, que usa el linaje de ratones MOG₃₅₋₅₅ y C57BL/6, se considera un modelo preclínico validado de la forma progresiva crónica de MS.

3.1 Método

Para inducir EAE crónica por inmunización activa, se inmunizaron ratones C57BL/6 s.c. con 100 μ g glicoproteína de oligodendrocitos de mielina MOG₃₅₋₅₅ emulsionada en adyuvante de Freund completo (CFA) que contenía 4 mg/ml de *Mycobacterium tuberculosis* H37 RA. Los ratones también recibieron inyecciones i.p. de 200 ng de toxina pertussis en los días 0 y 2.

El tratamiento consistió en la administración oral del Compuesto 1 (a 1 mg/kg o 3 mg/kg) después del comienzo de la enfermedad (día 12 postinmunización), una vez al día, durante cinco días consecutivos desde el día 12 hasta el día

16 postinmunización y desde el día 19 hasta el día 23 postinmunización. Los ratones de control se trataron por vía oral con vehículo [Tween-80 al 2% en volumen + HP β CD al 98% (13% peso/volumen)] siguiendo el mismo régimen de administración que el Compuesto 1. n=10 ratones/grupo, con la excepción del grupo tratado con el Compuesto 1 a 3 mg/kg, donde n=9.

- 5 Los ratones se puntuaron diariamente en cuanto a signos de EAE según el siguiente sistema de puntuación clínica: 0, ningún signo clínico; 0,5, pérdida parcial de tonicidad en la cola; 1, pérdida completa de tonicidad en la cola; 2, cola flácida y modo de andar anormal; 3, parálisis de las patas traseras; 4, parálisis de las patas traseras con paresia de la parte trasera del cuerpo; 5, parálisis de las patas traseras y delanteras; y 6, muerte.

3.2 Resultados

- 10 Los ratones de control no tratados desarrollaron signos moderados (30% de los animales alcanzaron una puntuación clínica máxima de 1,5-3) a grave (70% de los animales alcanzaron una puntuación clínica máxima de 3,5-6) de EAE, y mostraron una tasa de mortalidad de 40% debida a parálisis grave. El tratamiento con el Compuesto 1 inhibió en gran medida el desarrollo de EAE y redujo la incidencia y gravedad de la enfermedad, medida por puntuación clínica diaria, como se muestra en la Figura 1. En el grupo tratado con el Compuesto 1, 40-70% de los ratones presentaron síntomas leves, y 30% se recuperaron casi completamente 40 días después del comienzo de la enfermedad. El efecto protector del Compuesto 1 se mantuvo durante un periodo de tiempo largo después del cese del tratamiento.

En base a los resultados obtenidos en este ensayo, se espera que el Compuesto 1 sea útil para el tratamiento de la esclerosis múltiple, incluyendo la forma progresiva crónica de la esclerosis múltiple.

3.3 El compuesto 1 es eficaz a dosis tan bajas como 0,05 mg/Kg

- 20 Usando el mismo protocolo de ensayo EAE descrito en el Ejemplo 3.1 anterior, el Compuesto 1 se ensayó además a 1, 0,5 y 0,05 mg/kg p.o. partiendo en el día 12 postinmunización, una vez al día, durante cinco días consecutivos desde el día 12 hasta el día 16 postinmunización y desde el día 19 hasta el día 23 postinmunización. Los ratones de control se trataron por vía oral con vehículo [Tween-80 al 2% en volumen + HP β CD al 98% (13% en peso/volumen)] siguiendo el mismo régimen de administración. Los ratones se puntuaron diariamente en cuanto a signos de EAE según el sistema de puntuación clínica descrito en el Ejemplo 3.1. n=10 ratones/grupo. Como se muestra en la Figura 2, el Compuesto 1 exhibió un claro efecto sobre la EAE, reduciendo la puntuación clínica a dosis tan bajas como 0,05 mg/kg p.o.

3.4 Comparación de los efectos del Compuesto 1 con otro inhibidor de LSD1

- 30 Usando el modelo EAE del Ejemplo 3.1, los autores de la invención ensayaron otro inhibidor de LSD1 irreversible basado en ciclopropilo, ORY-LSD1, descrito en más detalle en el Ejemplo 1. El ORY-LSD1 es un potente y selectivo inhibidor de LSD1.

- 35 A fin de poder comparar los resultados obtenidos con el Compuesto 1 en el Ejemplo 3.1 con ORY-LSD1, y como los dos compuestos tienen potencias in vitro diferentes contra LSD1 (véase el Ejemplo 2 para sus valores IC₅₀), el ORY-LSD1 se administró en el ensayo EAE en dosis elegidas para ser equivalentes a las usadas para el Compuesto 1 en el Ejemplo 3.1 con respecto a la inhibición de LSD1 in vivo. El ORY-LSD1 se dio a 0,06 y 0,180 mg/kg p.o. El ORY-LSD1 y el vehículo (igual que en el Ejemplo 3.1) se administraron siguiendo el esquema de administración descrito en el Ejemplo 3.1 (n=10 ratones/grupo).

- 40 Los resultados obtenidos con ORY-LSD1 se muestran en la Figura 3. Aunque el ORY-LSD1 proporcionó una clara tendencia a la mejora, el ORY-LSD1 fue considerablemente menos eficaz que el Compuesto 1. Por tanto el Compuesto 1 sobresale como un compuesto particularmente adecuado para el tratamiento de la esclerosis múltiple.

Ejemplo 4: Caracterización adicional de los efectos terapéuticos del Compuesto 1 sobre el modelo EAE en ratones

Para caracterizar adicionalmente los efectos terapéuticos del Compuesto 1 en el modelo EAE del Ejemplo 3, el Compuesto 1 se ensayó adicionalmente a 0,5 mg/kg p.o. y se realizó un análisis de proteínas e histopatológico.

- 45 El tratamiento con el Compuesto 1 siguió el mismo esquema que el descrito en el Ejemplo 3.1, es decir, partiendo en el día 12 postinmunización, una vez al día, durante cinco días consecutivos desde el día 12 hasta el día 16 y desde el día 19 hasta el día 23 postinmunización. Los ratones de control se trataron por vía oral con vehículo [Tween-80 al 2% en volumen + HP β CD al 98% (13% en peso/volumen)] siguiendo el mismo régimen de administración que el Compuesto 1. Los ratones se puntuaron diariamente en cuanto a signos de EAE, usando las puntuaciones descritas en el Ejemplo 3.1. Los animales se sacrificaron en el día 26 postinmunización y se recogieron y procesaron muestras como se describe a continuación. n=10 ratones/grupo.

4.1 Métodos

Recogida de tejidos y aislamiento de células. En el día 26 postinmunización, se retiró el bazo, los ganglios linfáticos drenantes (DLNs: cervicales, inguinales y axilares), y la médula espinal. Se prepararon por separado segmentos

espinales de las regiones cervical y lumbar y se procesaron en cuanto a la extracción de proteínas y el análisis histopatológico. Se obtuvieron suspensiones de células simples del bazo o de los ganglios linfáticos reunidos, se homogeneizaron las muestras y se cuantificó el número total de células usando la cámara Neubauer.

- 5 Procesamiento de muestras para análisis histopatológico. Se dividieron y procesaron segmentos de la médula espinal cervical y lumbar para su inclusión y disección en parafina. Los segmentos de médula espinal se fijaron inmediatamente con formalina al 10% tamponada durante 48 h, se deshidrataron y se incluyeron en parafina usando técnicas estándar. Se tiñeron secciones transversales (4 µm de espesor) con azul rápido de Luxol, violeta de cresilo y hematoxilina siguiendo la técnica de Klüver-Barrera, y se analizaron en cuanto a la presencia de áreas de desmielinación e infiltración celular usando un microscopio óptico (Leica, DM2000).
- 10 Extracción de proteínas y análisis de citocinas/quimiocinas. Las proteínas se extrajeron de segmentos cervicales y lumbares de la médula espinal por homogeneización (50 mg tejido/ml) en tampón de lisis (Tris-HCl 50 mM, pH 7,4, DTT 0,5 mM, y 10 µg/ml de los inhibidores de proteinasa PMSF, pepstatina y leupeptina). Se centrifugaron las muestras (20.000 x g, 15 min, 4°C) y los sobrenadantes se ensayaron en cuanto a concentración de proteínas (usando el método de Bradford), y en cuanto al contenido de citocinas/quimiocinas usando ELISAs sandwich específicos para IL-4, IL-6, IL-1beta, IP-10 y MCP-1, según las recomendaciones del fabricante, usando los siguientes anticuerpos y proteínas recombinantes:

IL-4	IL-4 Anti-Ratón Purificada de Rata. BD Pharmingen. 0,5 mg/ml. Ref: 554387. IL-4 Recombinante de Ratón. BD Pharmingen. 0,2 mg/ml. Ref: 550067. IL-4 Anti-Ratón de Rata con Biotina. BD Pharmingen. 0,5 mg/ml. Ref: 554390
IL-6	IL-6 Anti-Ratón Purificada de Rata. BD Pharmingen. 0,5 mg/ml. Ref: 554400. IL-6 Recombinante de Ratón. BD Pharmingen. 0,1 mg/ml. Ref: 554582. IL-6 Anti-Ratón de Rata con Biotina. BD Pharmingen. 0,5 mg/ml. Ref: 554402.
IL-1 beta	IL-1 Beta Anti-Ratón de Hámster Purificada. BD Pharmingen. 0,5 mg/ml Ref: 550605. IL-1 Beta Recombinante de Murino. Peprotech. 0,1 mg/ml. Ref: 211-11B. IL-1 Beta Anti-Murino de Conejo Biotinilada. Peprotech. 0,4 mg/ml. Ref: 500-P51 Bt.
IP-10	Anticuerpo Policlonal Purificado por Afinidad a Antígenos IP-10 Anti-Murino. Peprotech. 0,5 mg/ml Ref: 500-P129. IP-10 Recombinante de Murino (CXCL10). Peprotech. 0,1 mg/ml. Ref : 250-16. IP-10 Anti-Murino Purificado por Afinidad a Antígenos Biotinilado. Peprotech. Ref: 500-P129Bt. 0,5 mg/ml
MCP-1	Anticuerpo Policlonal Purificado por Afinidad a Antígenos JE/MCP-1 Anti-Murino. Peprotech. 0,5 mg/ml. Ref: 500-P113. JE/MCP-1 (CCL2) Recombinante de Murino. Peprotech. 0,1 mg/ml. Ref : 250-10. Anticuerpo Policlonal Purificado por Afinidad a Antígenos JE Anti-Murino Biotinilado. Peprotech. 0,5 mg/ml. Ref: 500-P113Bt.

- 20 Análisis estadístico: Análisis del número de células en ganglios linfáticos y bazo: las diferencias estadísticas se indican como ***p<0,001 frente a vehículo usando el test ANOVA. Análisis del nivel de citocinas/quimiocinas: las diferencias estadísticas se indican como: *p<0,05, **p<0,005, usando el test de Mann-Whitney; se usó el test t desapareado para el análisis del nivel de IP-10.

4.2 Resultados

- 25 El tratamiento con el Compuesto 1 a 0,5 mg/kg p.o., una dosis bien tolerada por los ratones para un tratamiento de larga duración, inhibió en gran medida el desarrollo de EAE y redujo la incidencia y gravedad de la enfermedad, medido por puntuación clínica diaria, como se muestra también en la Figura 4.

5 El Compuesto 1 redujo en gran medida la infiltración de células inflamatorias y la desmielinización en la médula espinal de ratones con EAE, como se muestra en la Figura 5. Las flechas en dicha Figura muestran áreas de desmielinización e infiltración de células inflamatorias. Se observaron múltiples áreas de desmielinización e infiltración de células inflamatorias en las muestras de control (animales tratados con vehículo), tanto en las muestras cervicales como lumbares, mientras que no se observó infiltración de células inflamatorias ni áreas de desmielinización en las muestras tratadas con el Compuesto 1. La Figura 6 muestra el número medio de placas de desmielinización en las regiones lumbares y cervicales de la médula espinal de animales tratados con el Compuesto 1 o vehículo, demostrando una desmielinización ausente o reducida en gran medida en las secciones cervicales y lumbares de los animales tratados con el Compuesto 1. Estos resultados, como se ilustra también en las Figuras 5 y 6, muestran que el Compuesto 1 reduce la infiltración inmunitaria en la médula espinal y protege la médula espinal de la desmielinización en el modelo EAE de esclerosis múltiple.

15 Como se muestra en la Figura 7, el tratamiento con el Compuesto 1 dio como resultado un aumento significativo en el número de células inmunitarias retenidas en el bazo y ganglios linfáticos de animales tratados, indicando una salida reducida de linfocitos de los tejidos inmunitarios. Además, el tratamiento con el Compuesto 1 modula respuestas inflamatorias y auto-inmunes, como se ilustra en las Figuras 8A a 8E. La citocina antiinflamatoria IL-4 aumentó significativamente en las médulas espinales de los animales tratados con el Compuesto 1, indicativo de respuesta antiinflamatoria Th2 (Figura 8A). Los niveles de las citocinas proinflamatorias IL-6 y IL-1beta en la médula espinal se redujeron con el tratamiento del Compuesto 1 (Figura 8B y 8C). Además, el Compuesto 1 redujo significativamente los niveles de diversas quimiocinas en el órgano diana, incluyendo IP-10 (Figura 8D) y MCP-1 (Figura 8E), que están implicados en el reclutamiento de células Th1 inflamatorias y encefalitogénicas a la médula espinal. Estos resultados confirman además que el Compuesto 1 es particularmente adecuado como agente terapéutico para el tratamiento de la esclerosis múltiple.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto, que es (-) 5-(((trans)-2-(4-(benciloxi)fenil)ciclopropil)amino)metil)-1,3,4-oxadiazol-2-amina o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, para uso en el tratamiento de la esclerosis múltiple.
- 5 2. El compuesto para el uso según la reivindicación 1, en donde la esclerosis múltiple es esclerosis múltiple progresiva crónica.
3. El compuesto para el uso según la reivindicación 1, en donde el compuesto es (-) 5-(((trans)-2-(4-(benciloxi)fenil)ciclopropil)amino)metil)-1,3,4-oxadiazol-2-amina.
4. El compuesto para el uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 3, en donde el compuesto es para ser administrado por vía oral.
- 10 5. El compuesto para el uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1, 3 o 4, en donde el paciente a ser tratado es un ser humano.
6. El compuesto para el uso según la reivindicación 2, en donde el compuesto es (-) 5-(((trans)-2-(4-(benciloxi)fenil)ciclopropil)amino)metil)-1,3,4-oxadiazol-2-amina.
- 15 7. El compuesto para el uso según la reivindicación 2 o 6, en donde el compuesto es para ser administrado por vía oral.
8. El compuesto para el uso según una cualquiera de las reivindicaciones 2, 6 o 7, en donde el paciente a ser tratado es un ser humano.

Fig 1

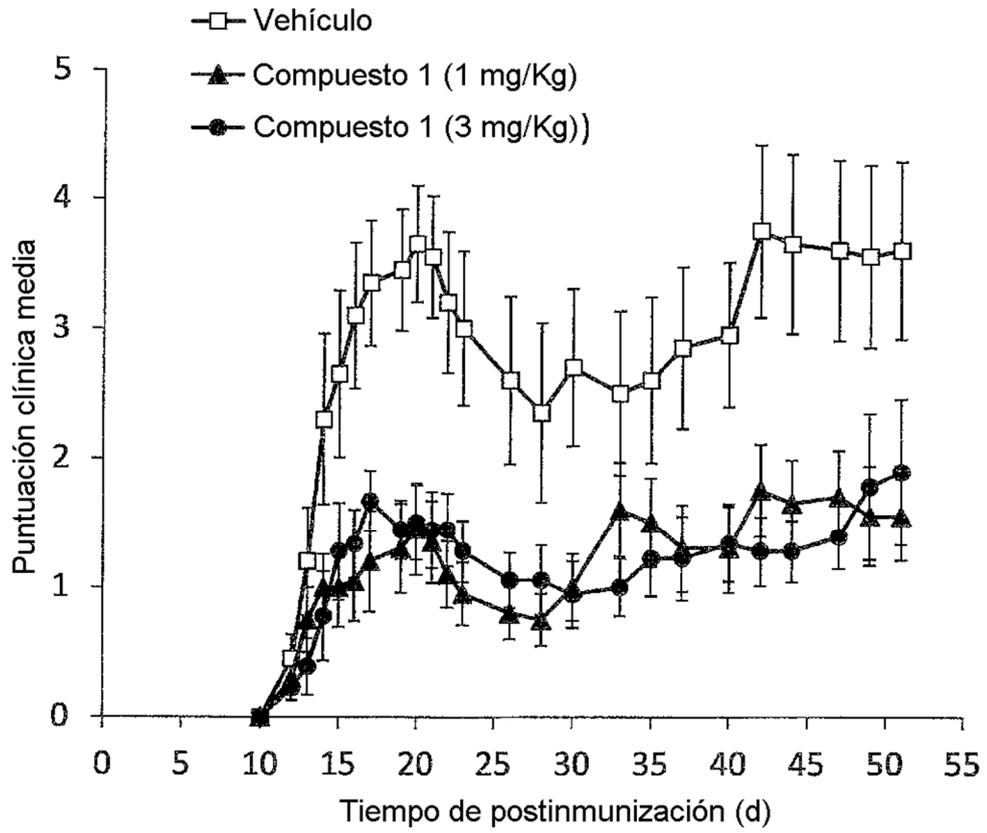


Fig 2

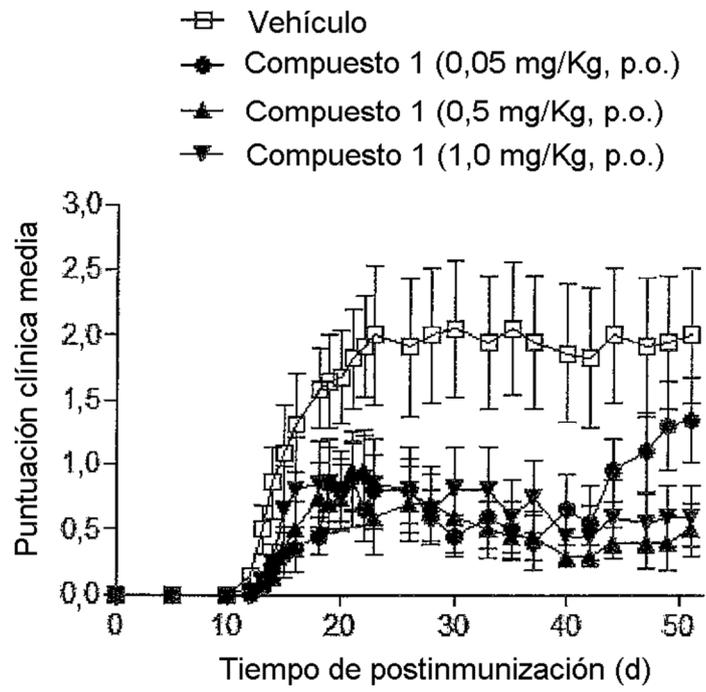


Fig 3

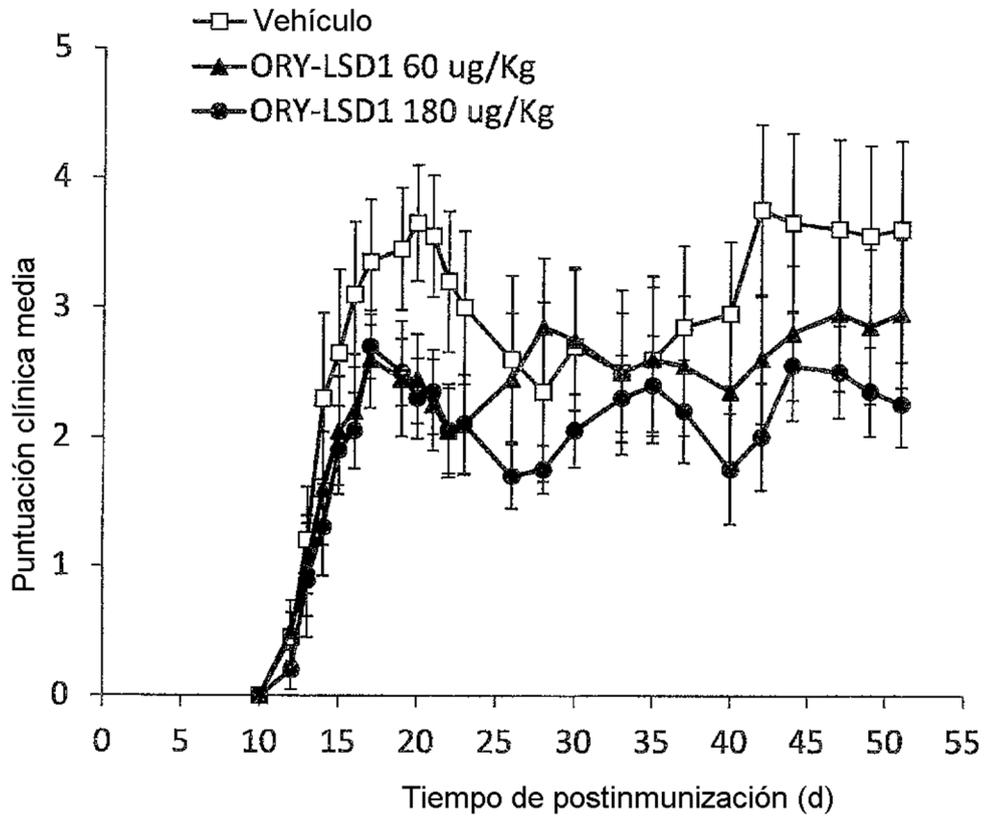


Fig 4

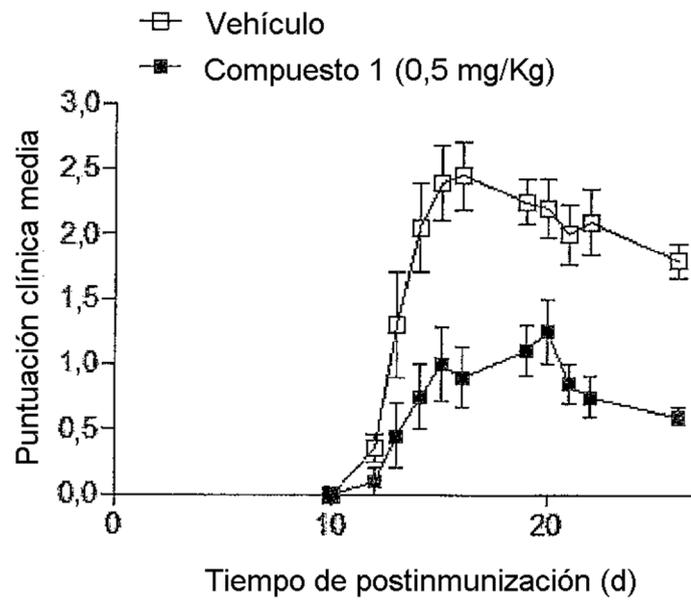


Fig 5

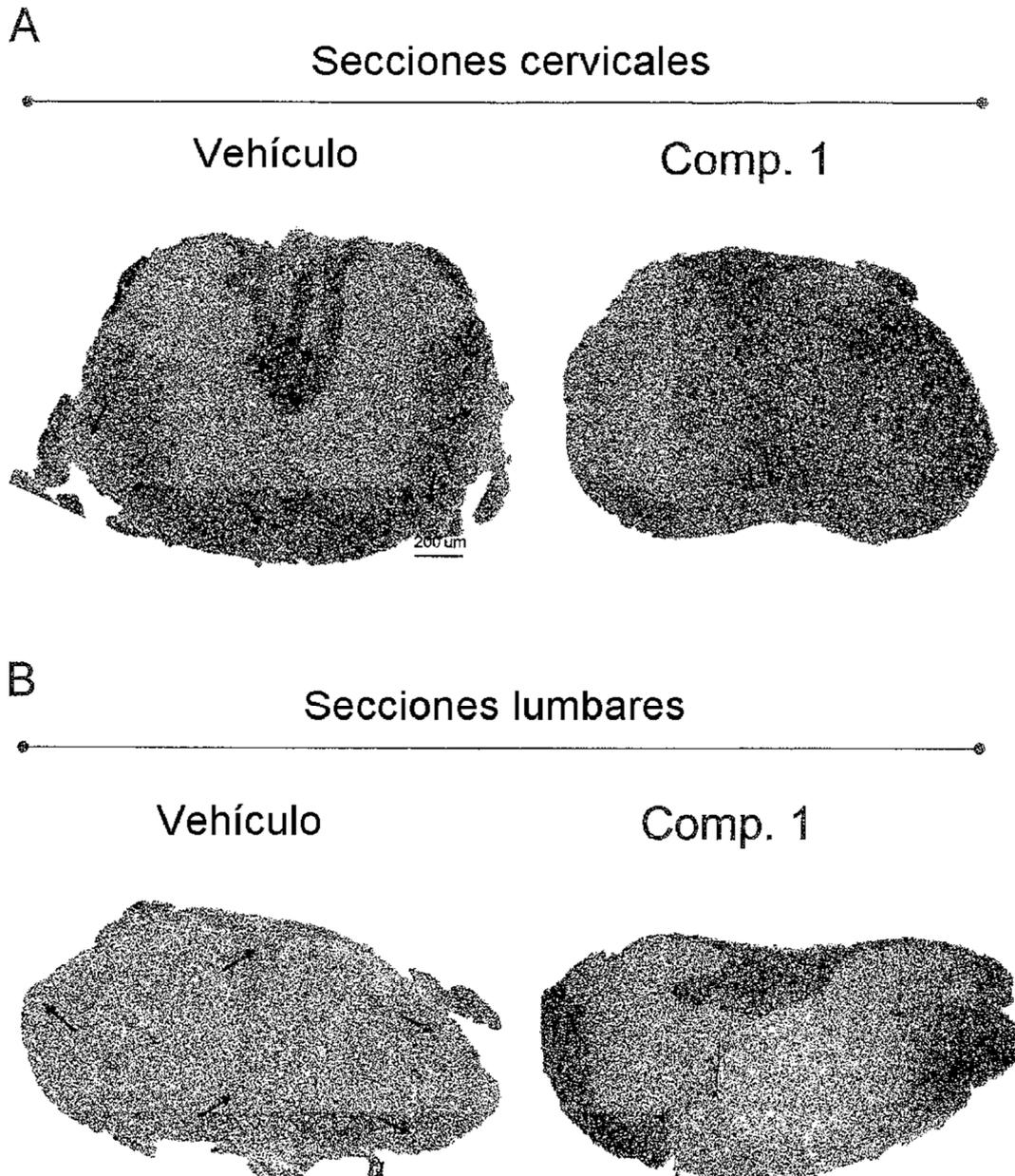


Fig 6

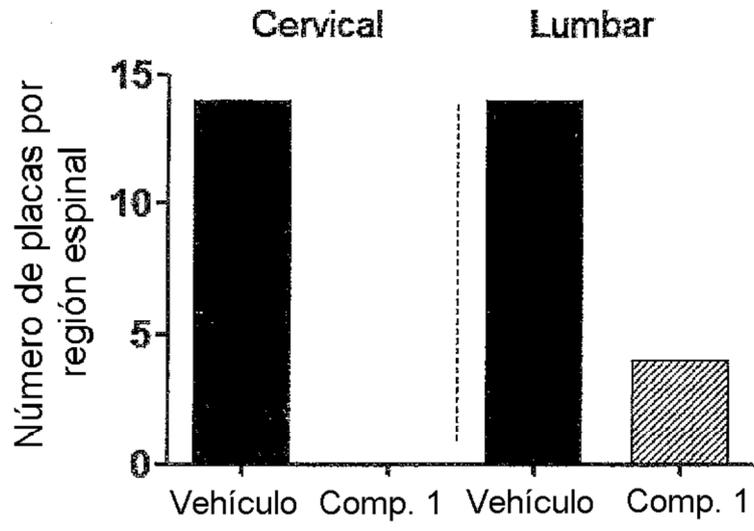


Fig 7

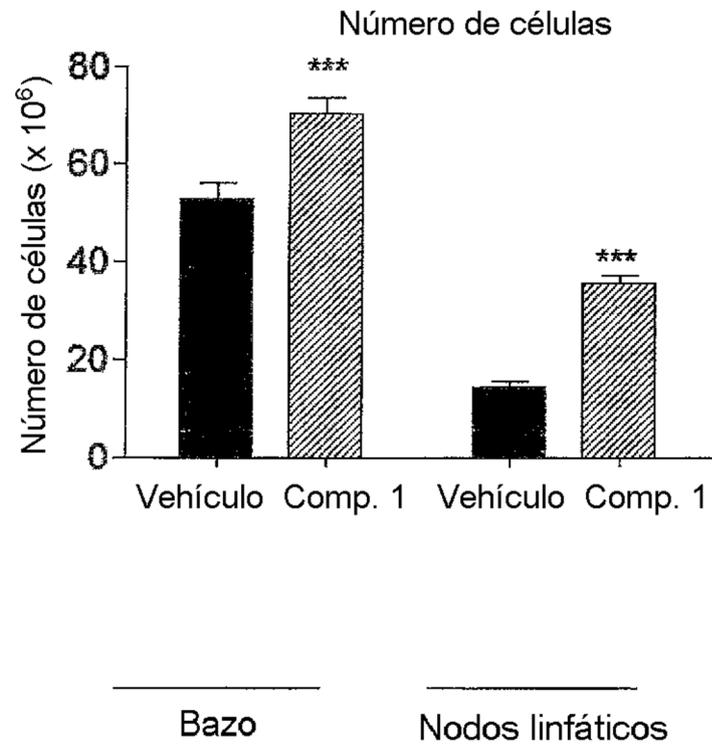


Fig 8A

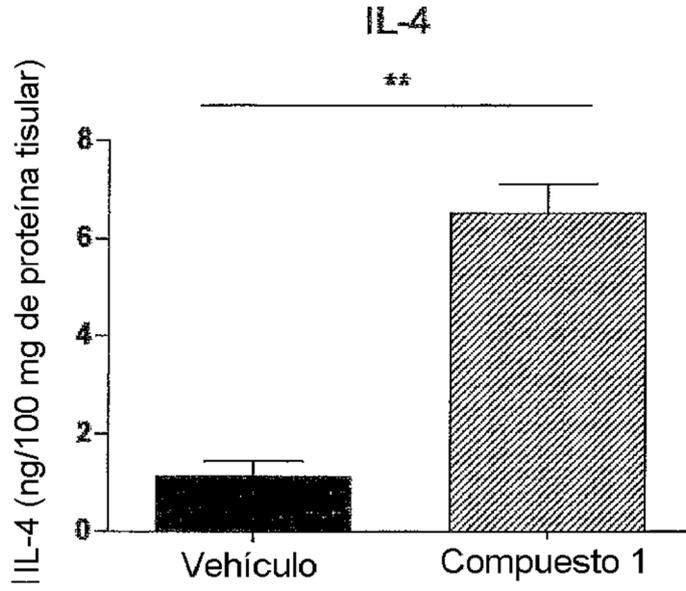


Fig 8B

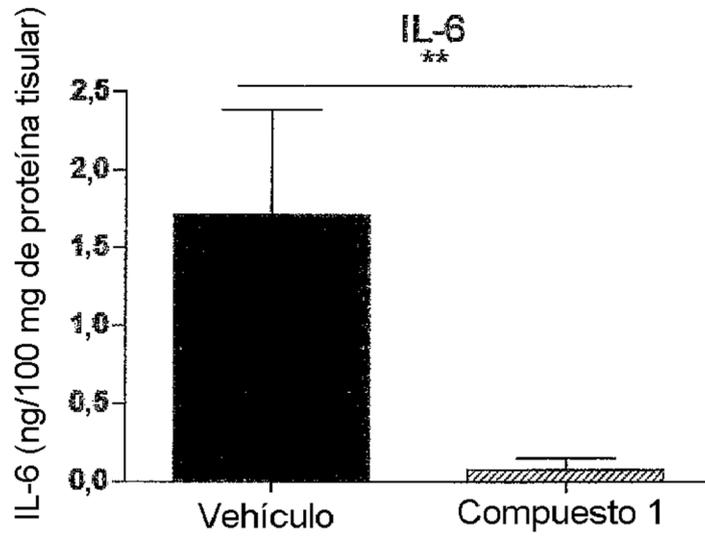


Fig 8C

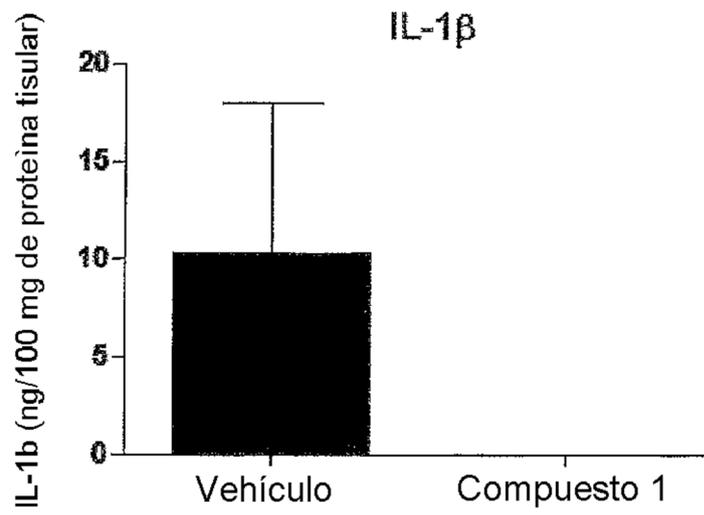


Fig 8D

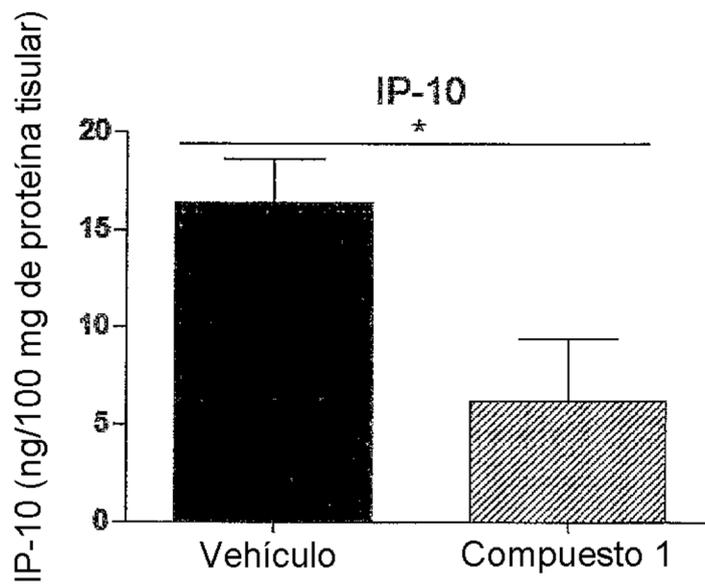


Fig 8E

