



①9



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

①1 Número de publicación: **2 310 018**

⑤1 Int. Cl.:
A61K 31/65 (2006.01)
C07K 14/515 (2006.01)

①2

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑨6 Número de solicitud europea: **98964764 .9**
⑨6 Fecha de presentación : **17.12.1998**
⑨7 Número de publicación de la solicitud: **1041991**
⑨7 Fecha de publicación de la solicitud: **11.10.2000**

⑤4 Título: **Tetraciclinas no antibacterianas para el tratamiento de la esclerosis múltiple.**

③0 Prioridad: **19.12.1997 US 68296 P**

⑦3 Titular/es: **New York University
70 Washington Square South
New York, New York 10012, US**

④5 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.12.2008

⑦2 Inventor/es: **Amin, Ashok y
Abramson, Steven**

④5 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.12.2008

⑦4 Agente: **Polo Flores, Carlos**

ES 2 310 018 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

Tetraciclinas no antibacterianas para el tratamiento de la esclerosis múltiple.

5 Antecedentes de la invención

Campo de la invención

La presente invención se refiere a la fabricación de medicamentos para el tratamiento de trastornos y enfermedades asociados a actividades elevadas del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), en particular de la esclerosis múltiple.

Descripción de la técnica anterior

Las dos isoformas de la ciclooxigenasa, ciclooxigenasa 1 y 2 (COX-1 y COX-2), también denominadas prostaglandina endoperoxido sintasa 1 y 2, son enzimas claves en la conversión del ácido araquidónico en prostaglandinas, tromboxanos y otros eicosanoides. Se cree que la COX-1 y COX-2 tienen funciones fisiológicas diferentes debido a diferencias llamativas en su expresión y regulación tisular. La COX-1 es una enzima constitutiva que está presente en todo momento en el cuerpo y es responsable de la producción de prostaglandinas citoprotectoras importantes para funciones homeostáticas, tales como el mantenimiento de la integridad de la mucosa gástrica, la mediación en la función plaquetaria normal, y la regulación del flujo sanguíneo renal. Por el contrario, la COX-2 es una forma de ciclooxigenasa rápidamente inducible que da lugar a la producción de prostaglandinas proinflamatorias. Aunque la expresión de la COX-2 está muy restringida en condiciones basales, está drásticamente sobreexpresada durante la inflamación.

Las prostaglandinas se producen a niveles elevados en tejidos inflamados incluyendo la sinovia reumatoide. Las prostaglandinas PGE₁ y PGE₂ contribuyen a la inflamación sinovial incrementando el flujo sanguíneo local y potenciando los efectos de mediadores, tales como la bradiquina y la IL-1 β , que inducen la permeabilidad de los vasos. También se ha demostrado que la PGE₂ estimula la resorción ósea osteoclástica, lo que sugiere que esta molécula puede contribuir a la patofisiología de la erosión articular en la artritis reumatoide. La implicación de la COX-2 y la producción elevada de prostaglandinas están asociadas a una variedad de enfermedades y trastornos, tales como isquemia cerebral y cánceres, así como enfermedades y trastornos en los que están presentes niveles elevados de óxido nítrico.

Hay estudios que indican que el óxido nítrico (NO), un mediador multifuncional identificado recientemente producido por y que actúa sobre diversas células, modula la actividad de la COX-2 (Salvemini y col., 1993) y participa en la destrucción tisular mediada por procesos inflamatorios y autoinmunitarios. El efecto del NO sobre la COX-2 depende de la dosis. Niveles bajos de NO activan la COX-2. Por el contrario, grandes cantidades de NO producidas por la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) pueden inhibir la inducción de la COX-2 y suprimen la formulación de los metabolitos de la COX-2. Salvemini y sus colaboradores han demostrado recientemente la inhibición de la respuesta inflamatoria mediante la modulación de la producción de NO en diversos modelos de inflamación animal. Se ha encontrado que la formación de óxido nítrico se incrementa en enfermedades autoinmunitarias (artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico, colitis ulcerativa, enfermedad de Crohn), y diversos síntomas inflamatorios clásicos (eritema, derrames vasculares) reversion mediante los inhibidores de la NOS. No obstante, aunque los inhibidores de la NOS, tales como el acetato de N^G-monometil-L-arginina (L-NMMA), inhiben la producción de NO, también parecen tener la propiedad de aumentar la producción de PGE₂ debido a la atenuación de la infraregulación de la producción de PGE₂ inducida por NO. Así, la mayoría de los inhibidores de la NOS sobreexpresan la COX-2 y la producción de PGE₂ de manera dependiente del NO.

El factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), una citoquina pleiotrópica, produce un amplio espectro de efectos nocivos que también la convierten en una diana importante para la intervención terapéutica. El TNF- α está involucrado en la patofisiología de la artritis, SIDA, cáncer, enfermedades autoinmunitarias (enfermedades inmunitarias complejas), fibrosis pulmonar, esclerosis múltiple, reacciones DTL de la piel, e infecciones bacterianas y parasitarias. El gen del TNF- α humano codifica una prohormona que se inserta en la membrana celular en forma de polipéptido con un peso molecular de 26 kDa. Esta forma del TNF- α unido a membrana es bioactiva en ensayos de citotoxicidad celular y se la ha implicado en las actividades paracrinas del TNF- α en tejidos. En respuesta al lipopolisacárido (LPS) y a otros estímulos, la forma de 26 kDa del proTNF- α se escinde proteolíticamente (mediante una metaloproteasa denominada TNF- α convertasa) en un polipéptido soluble de 17 kDa. El TNF- α se une a sus receptores análogos (p55 y p75) como un trímero bioactivo, y es señalizado en el interior de la célula.

La exposición sistémica al TNF- α recombinante soluble (en cantidades que podrían ser producidas endógenamente por el hospedador durante la infección) provoca un síndrome de shock agudo y lesiones tisulares que es virtualmente indistinguible del síndrome de shock séptico. A este efecto le sigue el síndrome de derrame capilar, hipoxia, edema pulmonar, y fallo orgánico múltiple. Esas observaciones resaltan la importancia del TNF- α como una diana terapéutica importante para diversas dolencias patofisiológicas.

Estudios en modelos animales de artritis y artritis reumatoide humana indican que el TNF- α puede ser una citoquina fundamental involucrada en estos procesos patológicos. La inyección de anticuerpos anti-TNF- α y/o del receptor del TNF- α soluble ha demostrado ser muy eficaz en la reducción de los signos y síntomas clínicos en estudios controlados. La extensión de estos estudios en ensayos clínicos en fase II y III (en artritis reumatoide) ha proporcionado resultados muy esperanzadores, indicando de nuevo que la neutralización de los efectos del TNF- α puede tener efectos profundos sobre la progresión de la enfermedad en diversas enfermedades inflamatorias, incluyendo la artritis.

Desde hace tiempo se ha identificado que las metaloproteasas de matriz (MMPs) desempeñan un papel importante en la degradación del cartílago tanto en artritis reumatoide (AR) como en artrosis (OA). La sinovia y el cartílago son las fuentes de enzimas degradativas más importantes que contribuyen a la patofisiología de la OA y la AR. Estas enzimas incluyen metaloproteasas, serinoproteasas, proteoglicanasas y tioloproteasas. Las dos familias principales de MMP que se cree que son responsables de la degradación del cartílago son las colagenasas y las proteoglicanasas.

Los primeros estudios de tres grupos independientes han demostrado que los inhibidores de amplio espectro de las metaloproteasas de matriz pueden inhibir específicamente la liberación del proTNF- α de la membrana (pero no la IL-1 β o IL-6) de diversas superficies celulares, incluyendo cultivos celulares de sinovia de artritis reumatoide. Este inhibidor del procesamiento del proTNF- α podría proteger a ratones contra una dosis administrada letal de endotoxina. La actividad de la "TNF- α convertasa" se aisló usando estos inhibidores como ligandos mediante purificación por afinidad que dio como resultado la identificación de una proteína de 80 kDa con la capacidad de escindir la secuencia Gln-Ala-↓-Val-Arg (ID SEQ N°:1) del proTNF- α .

La doxiciclina y la minociclina son miembros de la familia de antibióticos de amplio espectro tetraciclina. Durante los últimos años se ha establecido que las tetraciclinas, que se absorben rápidamente y tienen una semi-vida prolongada, ejercen efectos biológicos independientes de su actividad antimicrobiana (Golub y col., 1991; Golub y col., 1992; Uitto y col., 1994). Tales efectos incluyen la inhibición de las metaloproteasas de matriz, incluyendo la actividad de la colagenasa (MMP-1), de la gelatinasa (MMP-2) y de la estromelisin (MMP-3), y la prevención de la destrucción tisular patológica (Golub y col., 1991). En enfermedades artríticas inflamatorias tales como la artritis reumatoide, estas metaloproteasas de matriz se han identificado en homogeneizados y cultivos de sinovia reumatoide, se han detectado en fluidos sinoviales inflamatorios y se han localizado inmunológicamente y mediante hibridación *in situ* en pannus y sinovia proliferativos (Brinckerhoff, 1991). Se sabe que estas metaloproteasas están reguladas con su aumento en articulaciones afectadas por OA (Greenwald, 1994; Mohtai y col., 1993). De manera interesante, Yu y col. (1992) también han demostrado que la administración profiláctica de doxiciclina reduce notablemente la gravedad de la OA en modelos en perro. Para valorar la seguridad y eficacia de la minociclina (una tetraciclina semisintética) en el tratamiento de la artritis, un ensayo multicéntrico doble ciego aleatorio indicó que el fármaco era seguro y eficaz para pacientes con artritis suave y moderada (Tilley y col., 1995). Además, estudios recientes también han sugerido que las tetraciclinas y los inhibidores de las metaloproteasas inhiben la progresión tumoral (DeClerck y col., 1994), la resorción ósea (Rifkin y col., 1994) y la angiogénesis (Maragoudakis y col., 1994), y pueden tener propiedades anti-inflamatorias (Ramamurthy y col., 1994).

El laboratorio de los presentes inventores recientemente ha observado que la tetraciclina y las tetraciclinas químicamente modificadas inhiben la producción de óxido nítrico en macrófagos y en cartílago afectado por OA donde la expresión de la NOS está inhibida en el momento de la modificación post-transcripcional de la NOS (Amin y col., 1995b, 1997b). El laboratorio de los presentes inventores recientemente ha observado que el cartílago humano afectado de artritis en condiciones *ex vivo* (en ausencia o en presencia de citoquinas + endotoxinas) libera una cantidad sustancial de NO y PGE₂, y la inhibición específica de la producción de NO aumenta la producción de PGE₂ de manera dependiente del NO (Amin y col., 1997a).

También se ha encontrado que las tetraciclinas son eficaces para el tratamiento de la actividad de la colagenasa en la enfermedad periodontal y en la diabetes (patente de EE.UU. N° 4.666.897 y N° 4.704.383), para la inhibición de la actividad excesiva de la fosfolipasa A₂ (patente de EE.UU. N° 5.523.297), y para la inhibición de la actividad de la elastasa (patente de EE.UU. N° 5.773.430).

No se pretende que la cita de cualquier documento en esta memoria se considere como una admisión de que ese documento pertenece a la técnica anterior, o que se considera material para la patentabilidad de cualquier reivindicación de la presente solicitud. Cualquier afirmación sobre el contenido o la fecha de cualquier documento está basada en la información disponible para el solicitante en el momento de presentación y no constituye una admisión de la corrección de tal afirmación.

Resumen de la invención

La presente invención se refiere al descubrimiento de que tetraciclinas químicamente modificadas (CMT) con actividad antimicrobiana mínima son una nueva clase de fármacos antiinflamatorios no esteroideos (NSAID) que inhiben la actividad del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), en particular de la esclerosis múltiple.

Por consiguiente, es un objeto de la invención proporcionar un uso de un compuesto tetraciclina químicamente modificada sustancialmente sin actividad antimicrobiana para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la esclerosis múltiple.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra el efecto de la CMT-3 y el NMMA sobre la producción de nitrato y PGE₂ en células RAW 264.7 estimuladas con LPS.

La Figura 2 muestra el efecto de la CMT-3 y la tunicamicina sobre la producción de nitrito y PGE₂ en células RAW 264.7. M.Kloppenburger y col., *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Abril 1996, 934-940 y S.Milano y col.,

Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Enero 1997, 117-121 describen tetraciclinas antimicrobianas (minociclina, tetraciclina, doxiciclina) que afectan a la producción y secreción de citoquinas.

La Figura 3 muestra el efecto de la CMT-3 sobre la producción de nitrito y PGE_2 en condrocitos bovinos estimulados con lipopolisacárido.

Las Figuras 4A y 4B muestran las transferencias Western de extractos celulares de macrófagos murinos (Fig. 4A) y condrocitos bovinos (Fig. 4B) para anticuerpos anti-COX-2.

La Figura 5 muestra el efecto de la CMT-8 sobre la producción espontánea de nitrito y PGE_2 por cartílago afectado de OA.

La Figura 6 muestra el efecto de tetraciclinas sobre la liberación de $\text{TNF-}\alpha$ al medio de células HEK 293 humanas permanentemente transfectadas con pro $\text{TNF-}\alpha$ humano.

La Figura 7 muestra el efecto de la CMT-3 sobre la liberación de $\text{TNF-}\alpha$ al medio por células HEK 293 permanentemente transfectadas con pro $\text{TNF-}\alpha$ humano.

La Figura 8 muestra la liberación de $\text{TNF-}\alpha$ de células HEK 293 permanentemente transfectadas con pro $\text{TNF-}\alpha$ silvestre o pro $\text{TNF-}\alpha$ mutante humano.

La Figura 9 muestra el efecto de la CMT-8 sobre la producción de nitrito y PGE_2 en condrocitos bovinos estimulados con lipopolisacárido.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se basa en el descubrimiento de que tetraciclinas químicamente modificadas inhiben el $\text{TNF-}\alpha$. Estas tetraciclinas químicamente modificadas contienen cambios en la estructura básica del sistema anular de la tetraciclina o la sustitución de sustituyentes en las posiciones 1-4 ó 10-12 del sistema anular. Estas tetraciclinas químicamente modificadas, que tienen una actividad antimicrobiana mínima o carecen completamente de ella, se usan en un procedimiento para inhibir el $\text{TNF-}\alpha$.

El laboratorio de los presentes inventores evaluó la acción de tetraciclinas químicamente modificadas sobre la liberación espontánea de PGE_2 de cartílago humano afectado de OA en condiciones *ex vivo* y sobre la COX-2 en macrófagos murinos estimulados con LPS, y se encontró que la tetraciclina químicamente modificada, 6-desmetil-6-desoxi-4-desdimetilaminotetraciclina (CMT-3), que previamente se había demostrado que inhibía la actividad de la NOS, también inhibe la actividad de la COX-2 independientemente de las concentraciones intracelulares de NO.

Además, la adición de una tetraciclina químicamente modificada, la 6- α -desoxi-5-hidroxi-4-desdimetilaminotetraciclina (CMT-8), a cartílago humano afectado de OA que libera espontáneamente NO y PGE_2 inhibe tanto la producción de NO como la de PGE_2 . Sin estar limitado por la teoría, se cree que esta inhibición de la COX-2 se puede deber a la inhibición de la glicosilación de la COX-2, un mecanismo que afecta a la expresión de la COX-2 pero que sería distinto del observado con la iNOS, en el que las tetraciclinas químicamente modificadas bloquean la expresión del ARNm de la iNOS (Amin y col., 1997b). No obstante, también es posible que la inhibición de la COX-2 sea debida al truncamiento de la COX-2 o a una combinación de las dos posibilidades anteriores puesto que hay evidencias (Ejemplo 4) de que, en presencia de tetraciclinas químicamente modificadas, hay una reducción en el peso molecular de la COX-2.

Al igual que el inhibidor NMMA de la NOS, las tetraciclinas comerciales con actividad antimicrobiana, tales como las doxiciclinas y las minociclinas, también inhiben la producción de NO. Se encontró que las tetraciclinas químicamente modificadas, CMT-3 y CMT-8, sin actividad antimicrobiana, comparten con las tetraciclinas la propiedad de inhibir la producción de NO inhibiendo la expresión del ARNm de la iNOS. No obstante, mientras que la doxiciclina y la minociclina, como la mayoría de los otros inhibidores de la NOS, sobrerregulan la expresión de la COX-2 y la producción de PGE_2 de una forma dependiente del NO, se descubrió inesperadamente que CMT-3 y CMT-8 también inhiben la expresión de COX-2 y la producción de PGE_2 . Esta propiedad divergente de las tetraciclinas químicamente modificadas también se observó en otros tipos celulares, tales como condrocitos bovinos y macrófagos murinos.

Los fármacos antiinflamatorios no esteroideos (NSAID) son una clase de fármacos estructuralmente diversa, que incluyen la aspirina y el salicilato sódico, que comparten la propiedad importante de inhibir la biosíntesis de prostaglandinas. No obstante, estas acciones son insuficientes para explicar todos los efectos de los NSAID. Algunos miembros de los NSAID parecen tener propiedades anticarcinógenas como se recoge en estudios epidemiológicos con seres humanos y en estudios de carcinogénesis experimental con animales. Aunque se desconoce el mecanismo del efecto anticarcinógeno de los NSAID, se ha sugerido que están involucrados en la inhibición de la COX-2 y la reducción posterior de los niveles de prostaglandinas en tejidos.

Como inhibidores de la COX-2, los presentes inventores consideran que las tetraciclinas químicamente modificadas son una nueva clase de NSAID que parecen bloquear la actividad de la NOS mediante mecanismo(s) bastante diferente(s) de los inhibidores conocidos de la COX-2, tales como los NSAID convencionales. Los efectos de los NSAID

convencionales generalmente se producen a niveles de dosificación elevados y a veces están asociados a toxicidad gástrica y renal. Las CMT evitan estos efectos secundarios adversos.

Una característica importante de las tetraciclinas químicamente modificadas que inhiben la NOS y la COX-2 es su incapacidad de inhibir completamente la producción de NO o PGE₂. En vez de eso, estas tetraciclinas químicamente modificadas inhiben amortiguando la sobreproducción de NO y PGE₂. Ésta es una propiedad valiosa debido a que tanto el NO como la PGE₂ son moléculas pleiotrópicas con respecto a las funciones celulares, y la inhibición completa de la NOS y la COX-2 puede ser perjudicial, por ejemplo, bajos niveles de PGE₂ y NO pueden ser importantes para la homeostasis y las funciones celulares normales.

Aparte de la capacidad para inhibir la COX-2, las tetraciclinas químicamente modificadas, tales como la 4-desdimetilaminotetraciclina (CMT-1), CMT-3 y CMT-8, también tienen la propiedad importante de inhibir el TNF- α . Las células HEK 293 humanas permanentemente transfectadas con un ADNc de proTNF- α liberan espontáneamente TNF- α al medio de cultivo. Se encontró que esta liberación del TNF- α se bloquea con la adición de bajos niveles de tetraciclinas químicamente modificadas, similar a lo que se observó con la cicloheximida. Las tecnologías actuales para el bloqueo de la actividad del TNF están dirigidas a bloquear los receptores para el TNF o a neutralizar la actividad del TNF con anticuerpos. Por el contrario, se cree que las tetraciclinas químicamente modificadas bloquean la liberación de TNF de la superficie celular o bloquean la biosíntesis de proTNF dentro de la célula.

Como una nueva clase de NSAID, las tetraciclinas químicamente modificadas preferentemente son aquellas que carecen del grupo dimetilamino en posición 4 de la estructura anular. Las tetraciclinas químicamente modificadas preferidas incluyen la 4-desdimetilaminotetraciclina (CMT-1), 6-desmetil-6-desoxi-4-desdimetilaminotetraciclina (CMT-3), y 6- α -desoxi-5-hidroxi-4-desdimetilaminotetraciclina (CMT-8). Las CMT se describen en las patentes de EE.UU. N° 4.704.383, N° 4.935.411, N° 4.935.412, N° 5.459.153, N° 5.523.297, N° 5.773.430 y N° 5.789.395.

Según la presente invención, se usa una cantidad eficaz de una tetraciclina químicamente modificada en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad o un trastorno asociado a niveles elevados de TNF- α , que da lugar a, por ejemplo, aumento en la producción de PGE₂. Una cantidad eficaz de una tetraciclina químicamente modificada es una cantidad que es eficaz para inhibir o amortiguar la expresión o la actividad del TNF- α y que es suficiente para reducir el nivel de los productos del TNF- α , por ejemplo, la PGE₂, en el sistema biológico o sujeto tratado.

La patente de EE.UU. N° 5.789.395 describe la inhibición de la NOS usando tetraciclinas químicamente modificadas. Aunque también se puede inhibir la actividad de la NOS, está previsto que las formas de realización de la presente invención se dirijan a la inhibición del TNF- α en enfermedades y trastornos asociados a niveles elevados del mismo, en particular, la esclerosis múltiple. Preferentemente, el presente procedimiento trata enfermedades y trastornos en los que el TNF- α es elevado pero no lo es el nivel de NO.

Los ejemplos de otras enfermedades y trastornos asociados a niveles elevados de TNF- α incluyen shock séptico, enfermedad periodontal, enfermedad de injerto contra hospedador, malaria cerebral y caquexia asociada a cáncer o infección por VIH.

Como se usa en el presente documento, el término “prevención” de una dolencia, en un sujeto que lo necesite, supone la administración de la tetraciclina químicamente modificada como principio activo antes del comienzo clínico de la enfermedad o trastorno. Los términos “tratamiento” o “tratar” suponen la administración del principio activo, preferentemente en una composición, después del comienzo clínico de la enfermedad. Por ejemplo, la administración con éxito de tetraciclinas químicamente modificadas, después del desarrollo de los síntomas, comprende el “tratamiento” de la enfermedad o trastorno. Aunque la invención es particularmente útil en el tratamiento de seres humanos, también está prevista para usos veterinarios.

El principio activo usado en la presente invención se puede administrar por cualquier medio que consiga su propósito previsto, por ejemplo, para tratar enfermedades o trastornos asociados a niveles elevados de PGE₂ y TNF- α .

Por ejemplo, la administración puede ser a través de diversas vías parenterales, tales como vía subcutánea, intravenosa, intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intranasal, transdérmica o bucal. Alternativa o simultáneamente, la administración puede ser por vía oral. La administración parenteral puede ser por inyección de bolo o por perfusión gradual a lo largo del tiempo. La administración perioral puede ser por comprimidos, cápsulas (incluyendo cápsulas de liberación controlada), o una suspensión, jarabe u otra formulación líquida.

Un régimen típico para la prevención, supresión, o tratamiento de una dolencia asociada a niveles elevados de PGE₂ y/o TNF- α , comprende la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de la tetraciclina químicamente modificada administrada durante un período de tiempo, de hasta e incluyendo entre una semana y 12 meses aproximadamente.

Se entiende que la dosificación administrada dependerá de la edad, sexo, estado de salud, y peso del receptor, el tipo de tratamiento simultáneo, si lo hubiera, la frecuencia de tratamiento, y la naturaleza del efecto deseado. Los intervalos de dosis eficaces proporcionados a continuación no se pretende que sean limitantes y representan intervalos de dosificación preferidos. No obstante, la dosificación más preferida se ajustará al sujeto individual, tal como lo

entiende y lo puede determinar alguien con conocimientos en la materia. Véase, por ejemplo, Avery's Drug Treatment: Principles and Practice of Clinical Pharmacology and Therapeutics, 3ª Edición, ADIS Press, LTD., Williams y Wilkins (Baltimore, MD, 1987); Ebadi, Pharmacology, Little, Brown and Co. (Boston, 1985), cuyas referencias se incorporan en su totalidad en el presente documento por referencia.

La dosis total necesaria para cada tratamiento se puede administrar mediante dosis múltiples o en una sola dosis. La tetraciclina químicamente modificada se puede administrar sola o junto con otros compuestos terapéuticos dirigidos a tratar la dolencia, o dirigidos a otros síntomas de la dolencia.

Preferentemente, una CMT se administra en un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable. La frase "farmacéuticamente aceptable" se refiere a entidades moleculares y composiciones que son fisiológicamente tolerables y normalmente no producen una reacción alérgica o una reacción adversa similar, tal como trastornos gástricos, mareos y similares, cuando se administran a un ser humano. Preferentemente, como se usa en el presente documento, el término "farmacéuticamente aceptable" significa aprobado por una agencia reguladora del gobierno federal o estatal o listada en la farmacopea de EE.UU. u otra farmacopea reconocida de manera general para uso en animales, y más particularmente en seres humanos. El término "vehículo" se refiere a un diluyente, adyuvante, excipiente, o portador con el que se administra el compuesto. Esos vehículos farmacéuticos pueden ser líquidos estériles, tales como agua y aceites, incluyendo aquellos de origen petrolífero, animal, vegetal o sintético, tales como aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo y similares. El agua o las disoluciones acuosas salinas y las disoluciones acuosas de dextrosa y glicerol se emplean preferentemente como vehículos, particularmente para disoluciones inyectables. Los vehículos farmacéuticos adecuados se describen en Remington's Pharmaceutical Sciences de F. W. Martin.

Las cantidades terapéuticamente eficaces de las tetraciclinas químicamente modificadas están entre 0,1 aproximadamente y 100 mg/kg de peso corporal/día aproximadamente y cualquier intervalo dentro del anterior, preferentemente entre 1 aproximadamente y 18 mg/kg de peso corporal/día aproximadamente.

Las preparaciones para administración parenteral incluyen disoluciones, suspensiones, y emulsiones acuosas y no acuosas estériles, que pueden contener agentes o excipientes auxiliares que son conocidos en la materia. Según los procedimientos rutinarios también se pueden preparar composiciones farmacéuticas, tales como comprimidos y cápsulas. Las composiciones que se pueden administrar rectalmente incluyen supositorios.

Las composiciones farmacéuticas que comprenden las tetraciclinas químicamente modificadas para su uso según los procedimientos de la presente invención incluyen todas las composiciones en las que una tetraciclina químicamente modificada está contenida en una cantidad eficaz para conseguir su propósito previsto. Además, las composiciones farmacéuticas pueden contener vehículos farmacéuticamente aceptables adecuados que comprenden excipientes y agentes auxiliares que facilitan el procesamiento de los compuestos activos en preparaciones que se pueden usar farmacéuticamente. Las composiciones farmacéuticas en general contienen entre el 0,01 y el 99% aproximadamente, preferentemente entre el 20 y el 75% aproximadamente del principio activo (tetraciclinas químicamente modificadas) junto con el excipiente.

Las formulaciones adecuadas para administración parenteral incluyen disoluciones acuosas de los compuestos activos en formas solubles en agua, por ejemplo, sales solubles en agua. Además, se puede administrar una suspensión de los compuestos activos en forma de suspensiones oleosas adecuadas para inyección. Los disolventes o vehículos lipófilos adecuados incluyen ácidos grasos, por ejemplo, aceite de sésamo, o ésteres de ácidos grasos sintéticos, por ejemplo, oleato de etilo o triglicéridos. Las suspensiones acuosas para inyección que pueden contener sustancias que incrementan la viscosidad de la suspensión incluyen, por ejemplo, carboximetilcelulosa sódica, sorbitol, y/o dextrano. Opcionalmente, la suspensión también puede contener estabilizantes.

Habiendo descrito ahora la invención en general, la misma se entenderá más fácilmente en referencia a los siguientes ejemplos que se proporcionan a modo de ilustración y no está previsto que sean limitantes de la presente invención.

Ejemplo 1

Efecto de la CMT-3 y el NMMA sobre la producción de nitrito y PGE₂ en células RAW 264.7 estimuladas con LPS

Macrófagos murinos (células RAW 264.7) crecidos en medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) conteniendo suero fetal bovino al 10%, glutamina 2 mM, 50 U/ml de penicilina y 50 µg/ml de estreptomycin, se estimularon con 100 ng/ml de LPS para inducir tanto la NOS como la COX-2 en 16 horas. La adición de N-monometilarginina (L-NMMA), un inhibidor competitivo de la NOS, a las 0 horas bloquea la producción de NO pero aumenta la producción de PGE₂ como se observa a las 16 horas después de la estimulación tal y como se muestra la Figura 1. La adición de CMT-3 bloquea la producción de ambos NO y PGE₂. La adición de ambas (CMT-3 + L-NMMA) bloquea el aumento de PGE₂ inducido por L-NMMA, que indica que la CMT-3 bloquea la producción de PGE₂ inducida por L-NMMA (Figura 1). La CMT-3 y la L-NMMA comparten la propiedad de inhibir la producción de NO, pero son distintos en sus propiedades de modulación de la producción de PGE₂. Los datos representados en la Figura 1 representan la media ± DE según se examina mediante el test t donde n = 3.

Los efectos de las CMT 1, 2, 3, 5 y 8 sobre la acumulación de PGE₂ y NO en células RAW 264.7 se evaluó adicionalmente como se ha descrito anteriormente para la CMT-3. Los resultados se presentan en la Tabla 1.

Tabla 1

Efecto de las CMT1s sobre la acumulación de PGE ₂ en macrófagos murinos estimulados con LPS									
	EXPERIMENTO I					EXPERIMENTO II			
	PGE ₂ ng/ml	% inhib. o (increm.)	Nitrito (μM)	% de inh.		PGE ₂ ng/ml	% inhib. o (increm.)	Nitrito (μM)	% de inh.
Control		-	-	-			-	-	-
LPS (100 ng/ml)	25,6 ± 4,8	-	50,5 ± 2,3	-		19,5 ± 5,0	-	22,3 ± 0,9	-
+ CMT-1 (10 μg/ml)	31,5 ± 2,5 ^a	-	50,8 ± 1,8 ^a	-		30,2 ± 8,0 ^b	-	20,3 ± 0,4 ^b	-
+ CMT-2 (10 μg/ml)	26,8 ± 8,8 ^a	-	NR	-		22,9 ± 5,0 ^a	-	23,3 ± 3,5 ^a	-
+ CMT-3 (10 μg/ml)	8,7 ± 2,4 ^a	66	24,7 ± 1,9 ^a	48		6,5 ± 0,5 ^a	67	11,7 ± 0,5 ^e	46
+ CMT-5 (10 μg/ml)	31,5 ± 4,5 ^b	-	NR	-		20,2 ± 4,0 ^b	-	23,1 ± 3,0 ^b	-
+ CMT-8 (10 μg/ml)	27,2 ± 3,4	-	36,0 ± 2,0 ^c	28		24,3 ± 4,5 ^a	-	NR	-
+ Minociclina (40 μg/ml)	43,7 ± 8,6 ^c	(172)	4,8 ± 0,4 ^e	90		49,1 ± 10,0 ^c	(257)	12,9 ± 2,0 ^d	41
+ Hidrocortison a (10 μg/ml)	12,3 ± 2,6	52	34,3 ± 1,3 ^e	32		9,5 ± 0,5 ^e	50	12,9 ± 0,2 ^d	40

Los macrófagos murinos (células RAW 264.7) se estimularon con LPS (100 ng/ml) en presencia de 40 μ g/ml de minociclina, hidroclortisona 10 μ M y 10 μ g/ml de CMT por triplicado durante 16 horas. Los datos se expresan en forma de PGE₂ o nitrito acumulado en determinantes triplicados (n = 3). Los resultados estadísticos (entre células estimuladas con LPS y los experimentos) se obtuvieron usando el test t de Student desapareado. P = ^a $\leq$ 0,4; ^b $\leq$ 0,1; ^c $\leq$ 0,01; ^d $\leq$ 0,01; ^e $\leq$ 0,00001. NR = No realizado.

Ejemplo 2

Efecto de la CMT-3 y la tunicamicina sobre la producción de óxido nítrico y PGE₂ en células RAW 264.7

Se hicieron crecer células RAW 263.7 como se ha descrito previamente (Amin y col., 1995b). Macrófagos murinos estimulados con 100 ng/ml de LPS se incubaron con CMT-3 o tunicamicina (un inhibidor de la glicosilación). Como se muestra en la Figura 2, la tunicamicina y la CMT-3 inhiben tanto la expresión de la NOS/COX-2 como la producción de NO/PGE₂. El nitrito y la PGE₂ se estimaron como se ha descrito previamente (Amin y col., 1995b). Es bastante posible que la CMT-3 pueda inhibir la producción de COX-2 y PGE₂ mediante modificación post-traduccional de la COX-2 que puede ser similar a la inhibición de la tunicamicina. Los datos representan la media $\pm$ DE evaluada mediante el test t (n = 3).

Ejemplo 3

Efecto de la CMT-3 sobre la producción de nitrito y PGE₂ en condrocitos bovinos estimulados con LPS

Los condrocitos bovinos se aislaron mediante el procedimiento normal de Aydelotte y col. (1988) con pequeñas modificaciones. Resumiendo, el cartílago bovino normal se lavó en RPMI-1640 y se cortó en piezas pequeñas y se digirió con enzimas. Las piezas de cartílago se incubaron con tripsina (0,25%) en RPMI-1640 (Gibco BRL, Gaithersburg, MD) durante 30 minutos a 37°C antes de que se lavasen y se volviesen a incubar en hialuronidasa (0,2%) y colagenasa (0,2%), y se disolvió en RPMI-1640 conteniendo suero fetal bovino al 5% (FBS) durante 16 horas a 37°C con agitación continua (100 rpm). Las células se pasaron a través de una red de nailon de 75 μ m y se lavaron dos veces con PBS para retirar los restos celulares. Las células liberadas se suspendieron en RPMI-1640 + FBS al 10% + antibióticos y se pusieron en placa. Después de 48 horas el medio se cambió y las células se incubaron con CMT-3 o N-monometil arginina (NMMA) durante 2 horas antes de estimularlas con 100 μ g/ml de LPS. Se usó DMSO como vehículo para los moduladores y la concentración de DMSO se mantuvo (<0,01% en v/v) en los cultivos. También se añadieron cantidades equivalentes de DMSO a los cultivos control. Los niveles de liberación de PGE₂ dependientes de la COX-2 se sometieron a ensayo después de 72 horas por radioinmunoensayo. Como se observa con las células de macrófago murino, el L-NMMA aumenta la producción de PGE₂ e inhibe la producción de NO. La CMT-3 y la CMT-8 inhiben ambas la producción de NO y PGE₂ (Figuras 3 y 9). Los resultados en las Figuras 3 y 9 también demuestran que la CMT-3 y la CMT-8 inhiben la regulación del aumento de la PGE₂ inducida por L-NMMA en condrocitos bovinos, un efecto que también se observó en macrófagos murinos. Los datos representan la media $\pm$ DE que se evaluó mediante el test t donde n = 3.

Ejemplo 4

Modificación de la COX-2 por la CMT-3

Se cultivaron células de macrófago murino como se ha descrito previamente (Amin y col., 1995b). Se estimularon células RAW 267.3 con 100 ng/ml de LPS en presencia de CMT-3, CMT-5 y un inhibidor de la glicosilación, la tunicamicina. Las células se crecieron durante 16 horas y se recogieron. Los extractos celulares libres se prepararon como se ha descrito previamente (Amin y col., 1995b). En la Figura 4A, se cargaron 50 μ g de proteína en cada pocillo y se corrió sobre geles SDS-PAGE y se transfirieron sobre geles de transferencia Western usando un anticuerpo específico anti-COX-2 como se ha descrito previamente (Amin y col., 1997a). El control positivo es una COX-2 patrón. En las células tratadas con CMT-3, hay un descenso en el tamaño de la COX-2. El tamaño es aproximadamente 2000 Da más pequeño (forma de la CMT-3) que la COX-2 nativa presentada como patrón. La CMT-5 no tiene un efecto significativo mientras que las células tratadas con tunicamicina eran mucho más pequeñas que la forma nativa (forma de la tunicamicina). Estos experimentos indican que la CMT-3 induce la modificación de la proteína COX-2. El análisis de la SDS-PAGE y la transferencia Western de la COX-2 se llevó a cabo como se ha descrito anteriormente.

Los condrocitos bovinos se aislaron como en el Ejemplo 3. Después de 48 horas, el medio se cambió y las células se incubaron con CMT-3 durante 2 horas antes de estimularlas con 100 μ g/ml de LPS. Se usó DMSO como vehículo para los moduladores y la concentración de DMSO se mantuvo (<0,01% en v/v) en los cultivos. También se añadieron cantidades equivalentes de DMSO a los cultivos control. Se examinó la expresión de COX-2 mediante análisis de transferencia Western (Figura 4B) como se ha descrito anteriormente.

Ejemplo 5

Efecto de la CMT-8 sobre la liberación espontánea de óxido nítrico y PGE₂ producida por cartílago afectado de OA

El cartílago humano afectado de artrosis libera espontáneamente óxido nítrico (NO) y PGE₂ al medio como se ha informado previamente (Amin y col., 1995a; 1997a). Se acondicionaron cultivos de órganos con artrosis como se ha

descrito (Amin y col., 1995a; 1997a). Resumiendo, se extrajo todo el cartílago articular de la rodilla procedente de la meseta tibial y el cóndilo femoral de pacientes afectados de artrosis. El cartílago se mezcló y se cortó en discos de 3 mm y 4-6 discos se pusieron por triplicado o cuadruplicado, en una placa de 24 pocillos en 2,0 ml de medio F-12 de Ham suplementado con el 0,2% de albúmina humana exenta de endotoxina, Hepes 10 mM, pH 7,4 y antibióticos en presencia de diversos moduladores, como se ha descrito previamente (Amin y col., 1995a; 1997a). Se usó CMT-8 a concentraciones farmacológicamente relevantes en DMSO (< 0,01% de la concentración final) como vehículo. También se añadió una cantidad equivalente de DMSO a los cultivos control.

El inhibidor de la óxido nítrico sintasa (NOS), L-NMMA, inhibe la producción de NOS y NO pero aumenta la producción de PGE₂ (Amin y col., 1997a). Por el contrario, otro inhibidor de la NOS, la CMT-8, no sólo inhibe la producción de NOS y NO, sino que también inhibe la PGE₂ de una forma dependiente de la dosis (Figura 5 y Tabla 2, a continuación). El valor de p entre los valores control y los valores tratados con la CMT-8 para la PGE₂ fueron ≤ 0,1 (no significativo) mientras que los valores de p entre el cartílago tratado con NMMA y el cartílago tratado con CMT-8 fueron ≤ 0,001 (significativo). Los datos están representados como la media ± DE según se examina mediante el test t cuando n = 3. Los resultados para la CMT 1, 2, 3, 5 y 8 se muestran en la Tabla 2 a continuación. Los datos representan la media ± el valor de la DE según se determina mediante el test t de Student para n = 4. Los valores de p descritos se comparan con el cartílago artroscópico control sin estimular. Los datos representan uno de los dos experimentos similares. Los valores de p para la PGE₂ y el nitrito = ^a ≤ 0,5; ^b ≤ 0,1; ^c ≤ 0,05; ^d ≤ 0,01.

TABLA 2

Cartílago OA	Nitrito (μ M)	% de inhibición	PGE ₂ (ng/ml)	% de inhibición
Sin diluir	94,0 ± 25,0	-	221,8 ± 70,3	-
+ CMT-1 (5 μ g/ml)	82,0 ± 33,0 ^a	-	131,8 ± 37,7 ^b	-
+ CMT-2 (5 μ g/ml)	84,0 ± 20,0 ^a	-	145,2 ± 61,6 ^b	-
+ CMT-3 (5 μ g/ml)	75,0 ± 25,0 ^b	-	88,0 ± 21,4 ^d	60
+ CMT-5 (5 μ g/ml)	111,0 ± 8,0 ^a	-	162,6 ± 65,3 ^a	-
+ CMT-8 (5 μ g/ml)	47,0 ± 22,0 ^d	40	94,7 ± 39,2 ^c	58
+ Minociclina (10 μ g/ml)	66,0 ± 17,0 ^c	30	314,6 ± 58,4 ^b	-

Los datos en la Tabla 2 anterior demuestran la capacidad de la CMT-3 y la CMT-8 para inhibir significativamente la generación espontánea de NO y PGE₂ por el cartílago humano afectado de artrosis. Los datos demuestran la superioridad de las CMT sobre la minociclina, que suprime la producción de NO, pero estimula la producción de PGE₂.

Ejemplo 6

Liberación de TNF- α por células HEK 293 permanentemente transfectadas con proTNF- α silvestre y proTNF- α mutante humano

Se hicieron crecer células HEK 293 humanas (ATCC 1573-CRL) en medio esencial mínimo (Gibco-BRL), FCS al 10%, glutamina 2 mM, penicilina (50 μ M/ml) y estreptomycin (50 μ g/ml) como se describe por la American Type Culture Collection (ATCC). Las células HEK 293 se transfectaron con el ADNc del proTNF- α (silvestre) para preparar una línea celular estable. Las células HEK se transfectaron usando el método del fosfato de calcio según describe el proveedor (Gibco BRL, Cat. N° 18306-019). La secuencia de escisión de la TNF- α convertasa, Ala-Gln-Ala-Val-Arg-Ser (ID SEQ N°: 2), se eliminó del proTNF- α parental para generar un proTNF- α mutante. Una forma mutante

del ADNc del proTNF- α que no se podía escindir mediante la TNF- α convertasa endógena (TACE) para liberar el TNF- α soluble también se transfectó en células HEK 293 humanas distintas. El TNF- α soluble se estimó mediante ELISA de las células transfectadas de tipo silvestre y mutante procedentes del medio (Figura 8). Las células control sin transfectar no liberaron cantidades detectables de TNF- α soluble al medio. El proTNF- α unido a membrana del tipo silvestre transfectado en células HEK 293 escindió el proTNF- α al TNF- α soluble y lo liberó al medio. No obstante, el proTNF- α mutante, que estaba expresado en células HEK 293 no pudo ser reconocido por la TNF- α convertasa endógena y por tanto no se pudo observar una cantidad detectable de TNF- α en el medio. Estas líneas celulares son herramientas excelentes para seleccionar compuestos que inhiben la actividad TACE endógena estimando el TNF- α soluble en el medio.

Ejemplo 7

Efecto de la CMT-3 sobre la liberación de TNF- α al medio mediante células HEK 293 transfectadas permanentemente con proTNF- α humano

Se hicieron crecer células HEK 293 como se ha descrito previamente por la American Type Culture Collection (ATCC). Estas células se transfectaron permanentemente con el ADNc del proTNF- α y estas células permanentemente transfectadas liberaron espontáneamente TNF- α al medio que se estimó por ELISA. Las células HEK 293 se incubaron con CMT-3 para examinar los efectos de la CMT-3 sobre la liberación de TNF- α al medio. La Figura 7 muestra que la CMT-3 inhibe la liberación de TNF- α al medio de manera dependiente de la dosis. La cicloheximida, como se esperaba, también inhibió la liberación de TNF- α al medio.

Ejemplo 8

Efectos de las CMT/tetraciclina sobre la liberación de TNF- α

Se hicieron crecer células HEK 293 en las condiciones descritas previamente por la ATCC. Diversos compuestos, incluyendo la CMT-3 y doxiciclina/minociclinas se incubaron con células HEK 293 transfectadas con proTNF- α que liberan TNF- α al medio en 16 horas. La liberación espontánea de TNF- α por las células HEK 293 proTNF- α permanentemente transfectadas se muestra la Figura 6-8 como control en este experimento. El TNF- α soluble se estimó por ELISA del medio. Como se esperaba, se demostró que la cicloheximida inhibe la liberación de TNF- α (Figura 6). En la Figura 6, la CMT-3, CMT-8 y CMT-1, pero no la CMT-2 y CMT-5, inhiben la liberación espontánea de TNF- α . De manera similar, la doxiciclina y la minociclina también inhiben la liberación de TNF- α . Este experimento demuestra que un número seleccionado de CMT tienen la propiedad de inhibir la liberación de TNF- α o la actividad de la enzima TNF- α convertasa (TACE).

Ejemplo 9

Efecto de las CMT sobre la actividad específica de la COX-2 in vitro

Se estimularon células RAW 264.7 con LPS y se prepararon extractos exentos de restos celulares de la manera siguiente. Las células RAW 264.7 se indujeron con LPS (100 ng/ml) en presencia o ausencia de tetraciclinas o hidrocortisona durante 14-20 horas. Después de la inducción, las células se dejaron en reposo a 4°C y se resuspendieron en tampón Tris: 10 mM, pH 7,4 que contiene 10 μ g/ml cada uno de quimostatina, antipaina, leupeptina y pepstatina, DDT 1 mM y PMSF 1 mM. Las células se lisaron en un homogeneizador Polytron PA 1200 (Kinematica AG, Suiza) con el cóctel de inhibidores de la proteasa después de tres ciclos de congelación-descongelación rápida. El lisado se centrifugó a 18.000 rpm a 4°C en una centrífuga Eppendorf, y el sobrenadante resultante se usó como extracto exento de restos celulares. La proteína se midió mediante el reactivo del ensayo BCA (Pierce, Rockford, IL) usando BSA como patrón. El ensayo enzimático exento de restos celulares se llevó a cabo como se ha descrito previamente por Vane y col. (1994) usando extractos celulares totales sin fraccionar, y la cantidad de PGE₂ se estimó mediante RIA. La actividad enzimática específica se definió como ng de PGE₂ liberados/mg de proteína/37°C durante 20 minutos.

La adición de 10 μ g/ml de CMT-3 (27 μ M) y CMT-8 (27 μ M), al igual que aspirina (56 μ M) e indometacina (28 μ M), a los extractos exentos de restos celulares inhibió significativamente la actividad específica de la COX-2, mientras que el análogo inactivo de las CMT (CMT-5) no tuvo un efecto significativo (Tabla 3). Estos experimentos sugieren que la CMT-3 y la CMT-8 interfieren con la actividad enzimática de la COX-2 en extractos exentos de restos celulares, y su capacidad para inhibir la producción *in vitro* de PGE₂ mediada por COX-2 fue similar a la de aspirina e indometacina. Estos experimentos también muestran un nuevo mecanismo de acción de las CMT sobre la COX-2 y las separan de las tetraciclinas genéricas. La posibilidad de unión de estas CMT a la COX-2 (como la aspirina) no se puede descartar. Aunque hay un incremento significativo en la acumulación de la proteína COX-2 sobre el total, estos experimentos también pueden explicar el descenso neto en la acumulación de PGE₂ en células tratadas con CMT.

TABLA 3

Efecto de las CMT sobre la actividad específica de la COX-2 <i>in vitro</i>			
Tratamiento	Actividad específica de la COX-2 (ng de PGE ₂ /mg de proteína)	P ≤	% de inhibición
Control + sustrato	8,6 ± 0,3		
CMT-3 (10 µg)	2,8 ± 4,0	0,005	70
CMT-5 (10 µg)	9,8 ± 0,4	0,02	-
CMT-8 (10 µg)	4,3 ± 0,1	0,001	54
Aspirina (µg)	2,1 ± 0,1	0,004	77
Indometacina (10 µg)	2,6 ± 0,1	0,005	72

Se estimularon células RAW 264.7 con 1 µg/ml de LPS durante 16 horas y los extractos exentos de restos celulares se prepararon como se ha descrito anteriormente. Los extractos se incubaron con diferentes moduladores durante 20 minutos a 37°C antes de añadir el sustrato para iniciar la reacción enzimática, que se detuvo después de 30 minutos por inactivación térmica. Los datos representan uno de los dos experimentos, el análisis de la PGE₂ de cada muestra se realizó por triplicado, n = 3. El valor de p es una comparación entre el control y los experimentos.

Referencias

- Amin y col., *J. Exp. Med.* 182:2097-2102 (1995a)
- Amin y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:14014-14019 (1995b)
- Amin y col., *J. Clin. Inv.* 99:1231-1237 (1997a)
- Amin y col., *FEBS* 410:259-264 (1997b)
- Aydelotte y col., *Conn. Tissue* 18:205 (impreso en 1998)
- Brinckerhoff, C.E., *Arthritis Rheum.* 34:1073-1075 (1991)
- DeClerck y col., *Annals N.Y. Acad. Sci.* 732:222-232 (1994)
- Golub y col., *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* 2:297-322 (1991)
- Golub y col., *Curr. Opin. Dent.* 2:80-90 (1992)
- Greenwald, R.A., *Annals N.Y. Acad. Sci.* 732:181-198 (1994)
- Maragoudakis y col., *Annals N.Y. Acad. Sci.* 732:280-293 (1994)
- Mohtai y col., *J. Clin. Inv.* 92:179-185 (1993)
- Ramamurthy y col., *Annals N.Y. Acad. Sci.* 732:427-430 (1994)
- Rifkin y col., *Annals N.Y. Acad. Sci.* 732:165-180 (1994)
- Salvemini y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:7240-7244 (1993)
- Tilley y col., *Ann. Intern. Med.* 122:81-89 (1995)

Uitto y col., *Annals N.Y. Acad. Sci.* 732:140-151 (1994)

Vane y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:2046-2050 (1994)

5 Yu y col., *Arthritis Rheum.* 35:1150-1159 (1992).

Referencias citadas en la descripción

10 Esta lista de referencias citadas por el solicitante solamente es para comodidad del lector. No forma parte del documento de patente europea. A pesar de que se ha tenido mucho cuidado en la recopilación de las referencias, no se pueden descartar errores u omisiones y la EPO rechaza toda responsabilidad en este aspecto.

Documentos de patente citados en la descripción

- 15
- US 4666897 A [0012]
 - US 4935412 A [0025]
 - US 4704383 A [0012] [0025]
 - US 5459153 A [0025]
 - 20 • US 5523297 A [0012] [0025]
 - US 5789395 A [0025] [0027]
 - US 5773430 A [0012] [0025]
 - US 60068296 B [0057] [0058]
 - US 4935411 A [0025].
- 25

Bibliografía no de patentes citada en la descripción

- M. KLOPPENBURG y col. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Abril 1996, 934-940 [0016]
- 30 • S. MILANO y col. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Enero 1997, 117-121 [0016]
- Avery's Drug Treatment: Principles and Practice of Clinical Pharmacology and Therapeutics. *ADIS Press, LTD.*, Williams y Wilkins, 1987 [0033]
- 35 • EBADI. *Pharmacology*. Little, Brown and Co, 1985 [0033]
- F. W. MARTIN. *Remington's Pharmaceutical Sciences* [0035]
- GOLUB y col. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.*, 1991, vol. 2, 297-322 [0056]
- 40 • GOLUB y col. *Curr. Opin. Dent.*, 1992, vol. 2, 80-90 [0056]
- GREENWALD, R.A. *Annals N.Y. Acad. Sci.*, 1994, vol. 732, 181-198 [0056]
- 45 • MARAGOUDAKIS y col. *Annals N.Y. Acad. Sci.*, 1994, vol. 732, 280-293 [0056]
- MOHTAI y col. *J. Clin. Inv.*, 1993, vol. 92, 179-185 [0056]
- RAMAMURTHY y col. *Annals N.Y. Acad. Sci.*, 1994, vol. 732, 427-430 [0056]
- 50 • RIFKIN y col. *Annals N.Y. Acad. Sci.*, 1994, vol. 732, 165-180 [0056]
- AMIN y col. *J. Exp. Med.*, 1995, vol. 182, 2097-2102 [0056]
- 55 • AMIN y col. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1995, vol. 93, 14014-14019 [0056]
- AMIN y col. *J. Clin. Inv.*, 1997, vol. 99, 1231-1237 [0056]
- AMIN y col. *FEBS*, 1997, vol. 410, 259-264 [0056]
- 60 • AYDELOTTE y col. *Conn. Tissue*, 1998, vol. 18, 205 [0056]
- BRINCKERHOFF, C.E. *Arthritis Rheum.*, 1991, vol. 34, 1073-1075 [0056]
- 65 • DECLERCK y col. *Annals N.Y. Acad. Sci.*, 1994, vol. 732, 222-232 [0056]
- SALVEMINI y col. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1993, vol. 90, 7240-7244 [0056]

ES 2 310 018 T3

- **TILLEY** y col. *Ann. Intern. Med.*, 1995, vol. 122, 81-89 [0056]
- **UITTO** y col. *Annals N.Y. Acad. Sci.*, 1994, vol. 732, 140-151 [0056]
- 5 • **VANE** y col. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1994, vol. 91, 2046-2050 [0056]
- **YU** y col. *Arthritis Rheum.*, 1992, vol. 35, 1150-1159 [0056].

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

5 1. Uso de un compuesto de tetraciclina químicamente modificada sustancialmente sin actividad antimicrobiana para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la esclerosis múltiple.

2. Un uso según la reivindicación 1, en el que el compuesto de tetraciclina químicamente modificada sustancialmente sin actividad antimicrobiana se selecciona del grupo constituido por CMT-1, CMT-3, y CMT-8.

10 3. Un uso según la reivindicación 1, en el que el compuesto de tetraciclina químicamente modificada sustancialmente sin actividad antimicrobiana se selecciona del grupo constituido por CMT-3 y CMT-8.

4. Un uso según la reivindicación 1, en el que el compuesto de tetraciclina químicamente modificada sustancialmente sin actividad antimicrobiana es CMT-3.

15 5. Un uso según la reivindicación 1, en el que el compuesto de tetraciclina químicamente modificada sustancialmente sin actividad antimicrobiana es CMT-8.

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

FIG. 1

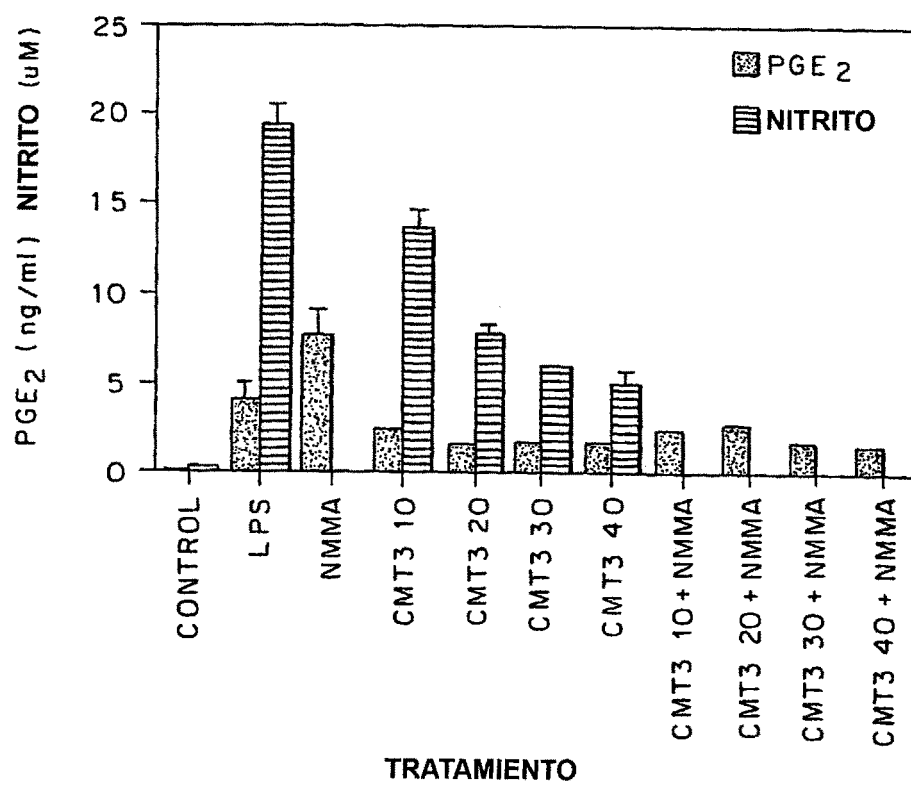


FIG. 2

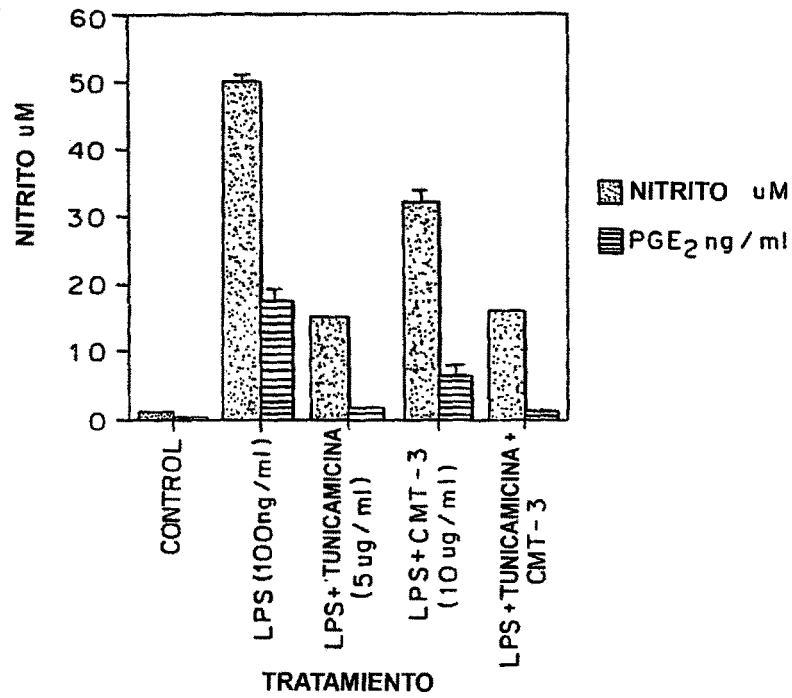


FIG. 3

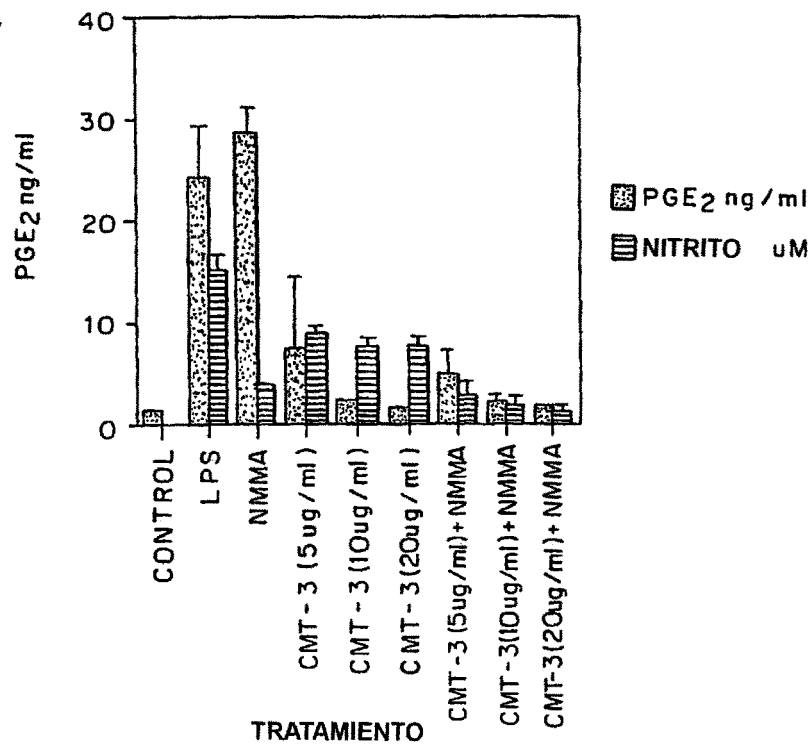


FIG. 4A Macrófagos murinos

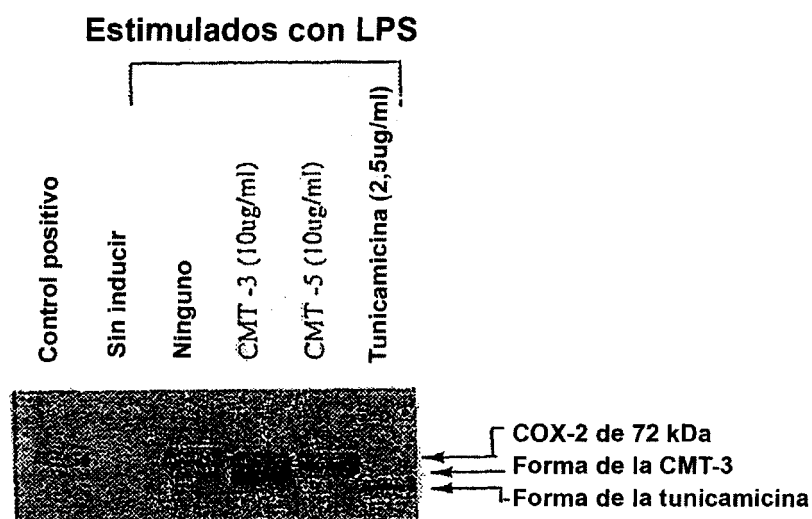


FIG 4B Condrocitos bovinos

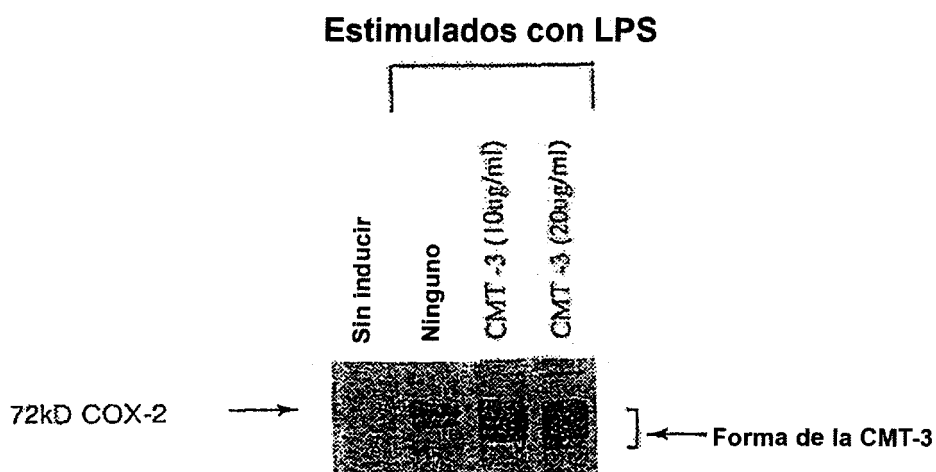


FIG.5

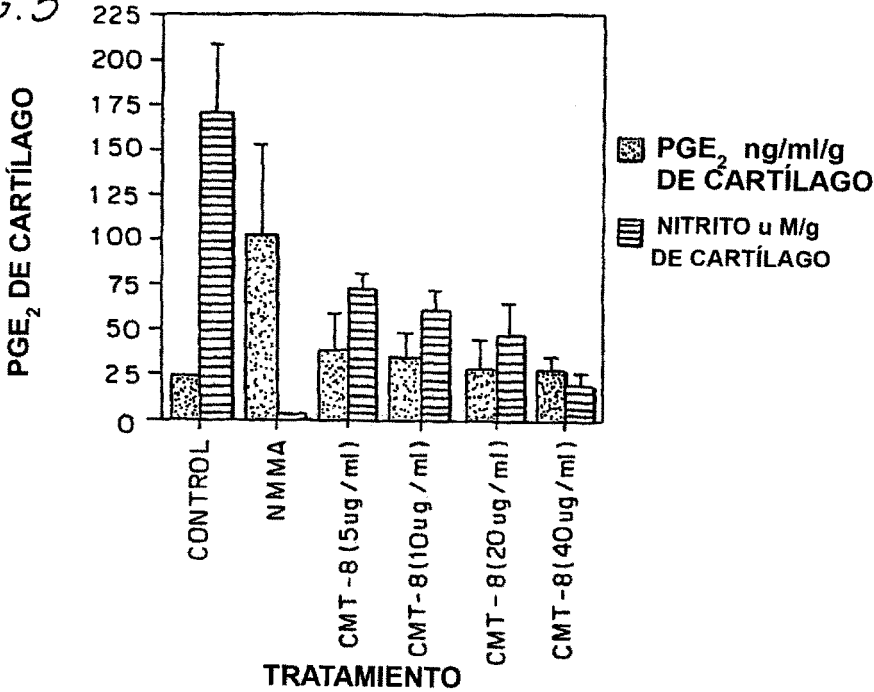


FIG.6

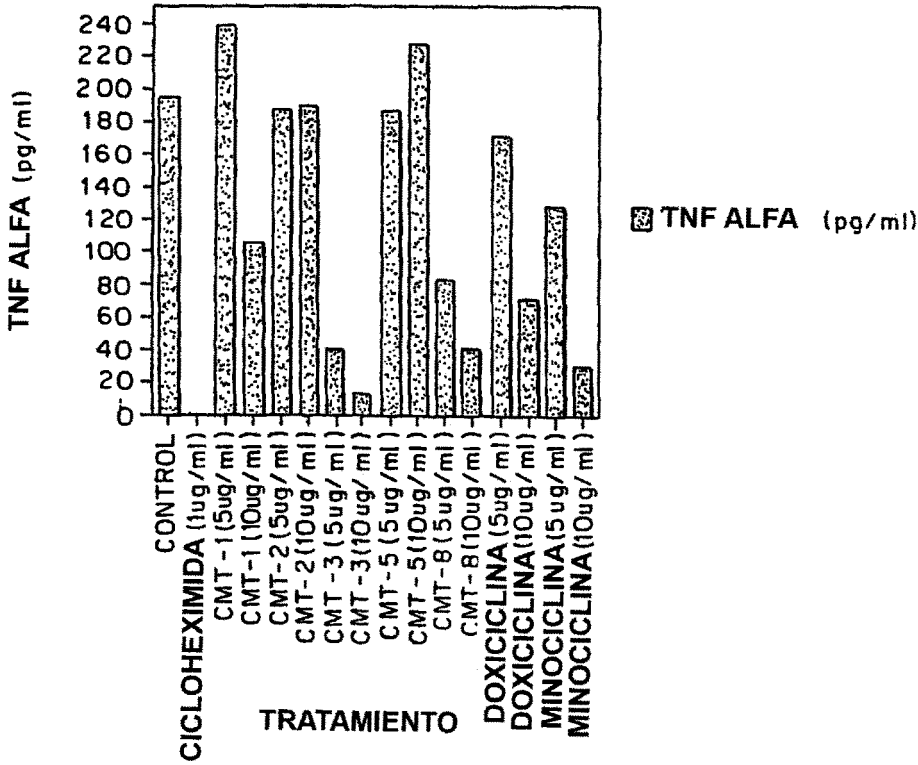


FIG. 7

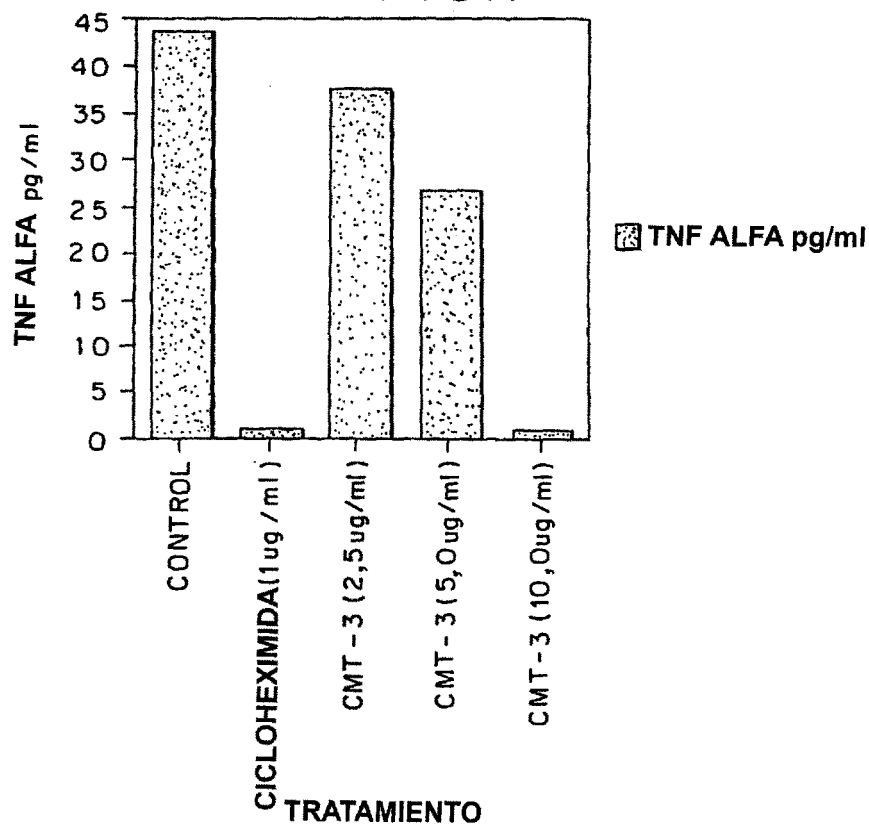


FIG. 8

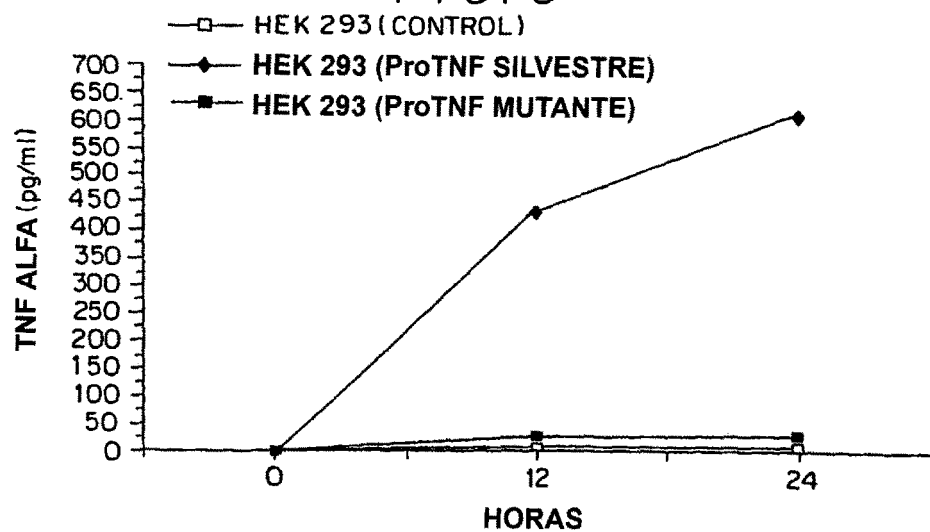
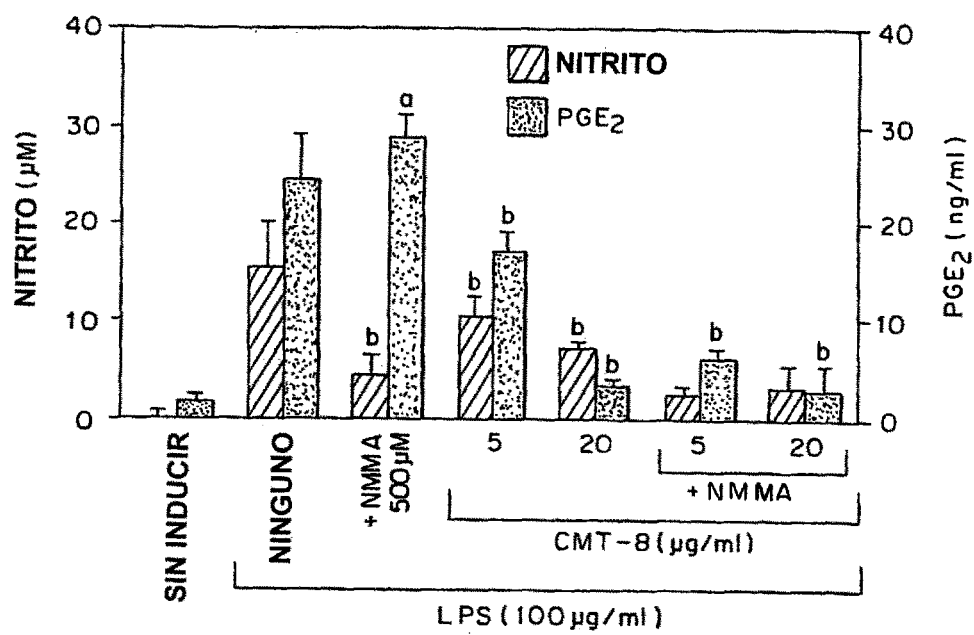


FIG. 9



ES 2 310 018 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> AMIN, Ashok
ABRAMSON, Steven
5 <120> PROCEDIMIENTO PARA INHIBIR LA CICLOOXIGENASA-2 Y EL FACTOR ALFA DE NECROSIS
TUMORAL
<130> amin2.seq
<140> aún no recibido
10 <141> 18-12-1998
<150> 60/068.296
<151> 19-12-1997
15 <160> 2
<170> PatentIn Ver. 2.0
<210> 1
<211> 4
20 <212> PRT
<213> Desconocida
<220>
25 <221> PÉPTIDO
<222> (1)..(4)

<400> 1
30 **Gln Ala Val Arg**
 1

 <210> 2
35 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Desconocida
40 <220>
 <221> PÉPTIDO
 <222> (1)..(6)

45 <400> 2
 Ala Gln Ala Val Arg Ser
 1 5

LISTADO DE SECUENCIAS

55 <110> AMIN, Ashok
ABRAMSON, Steven
 <120> PROCEDIMIENTO PARA INHIBIR LA CICLOOXIGENASA-2 Y EL FACTOR ALFA DE NECROSIS
TUMORAL
60 <130> amin2.seq
 <140> aún no recibido
 <141> 18-12-1998
 <150> 60/068.296
65 <151> 19-12-1997
 <160> 2
 <170> PatentIn Ver. 2.0

ES 2 310 018 T3

<210> 1
 <211> 4
 <212> PRT
 5 <213> Desconocida
 <220>
 <221> PÉPTIDO
 10 <222> (1)..(4)
 <400> 1
 Gln Ala Val Arg
 15 **1**
 <210> 2
 <211> 6
 20 <212> PRT
 <213> Desconocida
 <220>
 <221> PÉPTIDO
 25 <222> (1)..(6)
 <400> 2
 30 **Ala Gln Ala Val Arg Ser**
 1 5
 35
 40
 45
 50
 55
 60
 65