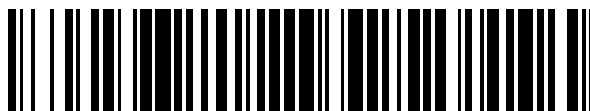


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 853 974**

51 Int. Cl.:

A61K 31/235 (2006.01)

A61P 25/28 (2006.01)

A61P 25/16 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.01.2015 PCT/US2015/011798**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.07.2015 WO15109215**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.01.2015 E 15737329 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.12.2020 EP 3094616**

54 Título: **Uso de una composición que contiene benzoato en trastornos del ciclo de la urea y trastornos neurodegenerativos**

30 Prioridad:

17.01.2014 US 201461928622 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
20.09.2021

73 Titular/es:

**RUSH UNIVERSITY MEDICAL CENTER (100.0%)
1653 W. Congress Parkway
Chicago, IL 60612, US**

72 Inventor/es:

PAHAN, KALIPADA

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 853 974 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

Uso de una composición que contiene benzoato en trastornos del ciclo de la urea y trastornos neurodegenerativos

5 Antecedentes

1. Campo de la invención

10 La presente divulgación se refiere en general a composiciones farmacéuticas útiles para el tratamiento de enfermedades y trastornos. Más particularmente, la divulgación se refiere a composiciones farmacéuticas que contienen tribenzoato de glicerilo y/o dibenzoato de glicerilo para el tratamiento de trastornos del ciclo de la urea y trastornos neurodegenerativos.

2. Descripción de la técnica relacionada

15 La canela, la corteza de color marrón de la canela, es una especia de uso común como aromatizante para postres, caramelos, chocolates, etc. Su uso en la medicina también se remonta a muchos siglos atrás. Los médicos medievales empleaban la canela en las medicinas para tratar distintos trastornos, incluyendo la artritis, la tos, la ronquera, el dolor de garganta, etc. Además de contener manganeso, fibra alimenticia, hierro y calcio, la canela contiene tres ingredientes principales: *cinamaldehído*, *acetato de cinamilo* y *alcohol de cinamilo*. Una vez ingeridos, estos tres compuestos activos
20 se convierten en ácido cinámico por oxidación e hidrólisis, respectivamente. Posteriormente, el ácido cinámico se β -oxida en benzoato en el hígado. Este benzoato existe en forma de sal de sodio (benzoato de sodio) o benzoi-CoA.

25 El benzoato de sodio se utiliza ampliamente para la conservación de alimentos debido a sus propiedades antimicrobianas. También tiene importancia médica como componente del Ucephan™, un fármaco aprobado por la Food and Drug Administration estadounidense (FDA) que se utiliza para el tratamiento de defectos metabólicos hepáticos asociados con la hiperamonemia, como los trastornos del ciclo de la urea. Este inventor exploró un novedoso uso del benzoato de sodio para el tratamiento del proceso de la enfermedad de la encefalomiелitis alérgica experimental (EAE) relapsante-remitente en ratones hembra SJL/J (ver Brahmachari y Pahan, "Sodium benzoate, a food additive and a metabolite of cinnamon, modifies T cells at multiple steps and inhibits adoptive transfer of experimental allergic encephalomyelitis," J. Immunol., 1 de julio de 2007 ;179(1):275-83).

30 El presente inventor también descubrió que el benzoato de sodio suprime el proceso de la enfermedad de la esclerosis múltiple (EM) en ratones. El inventor descubrió asimismo que el benzoato de sodio regula al alza una proteína llamada DJ-1, que es una proteína neuroprotectora beneficiosa que tiene implicaciones en trastornos neurodegenerativos, como la enfermedad de Parkinson (EP) y la enfermedad de Alzheimer (EA) (ver Khasnavis y Pahan, "Sodium Benzoate, a Metabolite of Cinnamon and a Food Additive, Upregulates Neuroprotective Parkinson Disease Protein DJ-1 in Astrocytes and Neurons," Journal of Neuroimmune Pharmacology, junio de 2012, Volumen 7, Número 2, pp. 424-435).

35 Por otra parte, se ha descubierto que el nivel de factores neurotróficos, como el factor neurotrófico derivado del cerebro (FND) y la neurotrofina-3 (NT-3), desciende en el cerebro de pacientes con diferentes trastornos neurodegenerativos, como la EA y la EP. Recientemente, el presente inventor definió que el benzoato de sodio aumenta la producción de FND y NT-3 en las células cerebrales, lo que indica que podría ser beneficioso para los trastornos neurodegenerativos (ver Jana et al., "Up-regulation of neurotrophic factors by cinnamon and its metabolite sodium benzoate: therapeutic implications for neurodegenerative disorders," J. Neuroimmune Pharmacol., junio de 2013; 8(3):739-55).

40 Sin embargo, el benzoato de sodio se metaboliza rápidamente y se excreta del organismo. Por consiguiente, el benzoato de sodio se administra generalmente tres o cuatro veces al día, al menos en relación con los trastornos del ciclo de la urea, con el fin de garantizar la eliminación continua del amoníaco tóxico del torrente sanguíneo. Cabe señalar que Pahan 2011 (Immunopharmacology and immunotoxicology, 33(4) páginas 586- 593) divulga la inmunomodulación de la encefalomiелitis alérgica experimental por el metabolito de la canela benzoato de sodio.

Breve resumen

45 La invención reivindicada proporciona una composición farmacéutica que contiene tribenzoato de glicerilo y/o dibenzoato de glicerilo para el uso en un método para inhibir la progresión de un trastorno neurodegenerativo, donde dicho método comprende la administración a un paciente que pueda necesitarlo de una cantidad efectiva de dicha composición farmacéutica.

60

Breve descripción de las diversas vistas de las figuras

Las Fig. 1A-1C ilustran un análisis gráfico del efecto inhibitor del tribenzoato de glicerol (TBG) en relación con la encefalomiелitis alérgica experimental (EAE).

5 La Fig. 2 ilustra datos que muestran que los ratones que reciben células T cebadas con la proteína básica de la mielina (PBM) de ratones donantes tratados con TBG presentaron síntomas clínicos y gravedad de la enfermedad notablemente reducidos en comparación con los ratones que recibieron células T cebadas con PBM de ratones donantes no tratados o de ratones donantes tratados con un vehículo.

10 Las Fig. 3A-3C ilustran estudios de infrarrojos del cerebro y la médula espinal de ratones de ensayo.

La Fig. 3D ilustra un análisis gráfico de los datos mostrados en las Fig. 3A-3C.

15 La Fig. 4A ilustra imágenes que indican que el TBG inhibe la infiltración de células mononucleares, la inflamación y la desmielinación de la médula espinal en la EAE.

Las Fig. 4B-4C ilustran datos gráficos que indican que el TBG redujo de forma drástica la infiltración y la aparición de vasos afectados, respectivamente, en la médula espinal de ratones EAE.

20 Las Fig. 4D-4F ilustra datos que indican una expresión marcada de moléculas proinflamatorias como iNOS e IL- β en la médula espinal de ratones EAE no tratados en comparación con ratones de control y que también indican que el tratamiento con TBG redujo de forma drástica la expresión de estas moléculas proinflamatorias en la médula espinal de ratones EAE.

25 Las Fig. 5A y 5B ilustran datos que indican zonas de desmielinización extensas en la sustancia blanca de una médula espinal y que el tratamiento con TBG restauró de forma notable el nivel de mielina en la médula espinal de los ratones EAE.

30 Las Fig. 5C-5E se refieren al seguimiento de la expresión de tres genes de la mielina, proteína básica de la mielina (PBM) y proteína proteolípida (PPL), e indican una pérdida marcada de la expresión de ARNm de estos genes en la médula espinal de los ratones EAE no tratados en comparación con los ratones de control. Las figuras ilustran asimismo una restauración significativa de la expresión de ARNm del gen de la mielina de la médula espinal de los ratones EAE que fueron tratados con TBG pero no con el vehículo.

35 La Fig. 6 ilustra un análisis gráfico que muestra un descenso marcado del factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) en suero de ratones EAE en comparación con los ratones de control.

40 Las Fig. 7A-7D ilustran imágenes que muestran que el tratamiento con TBG (pero no con vehículo) de ratones EAE dio lugar al aumento de la población de Foxp3+CD4+ en esplenocitos.

Las Fig. 7E-7F ilustran imágenes que muestran que el tratamiento conjunto de ratones EAE con anticuerpos neutralizantes de TGF- β anuló el enriquecimiento y/o la protección, mediada por TBG, de la población Foxp3+CD4+ de células T.

45 La Fig. 8 ilustra un análisis gráfico de datos que muestran que el tratamiento con TBG mejoró los síntomas clínicos de la EAE-RR transferida adoptivamente, pero que el anticuerpo anti-TGF- β de bloqueo funcional anuló prácticamente por completo el efecto protector mediado por TBG en los ratones EAE.

50 Las Fig. 9A-9B ilustran datos que muestran que la intoxicación por MPTP redujo el nivel de DJ-1 *in vivo* en la sustancia negra, pero el tratamiento oral con TBG (aunque no así con el vehículo) de ratones intoxicados por MPTP protegió la DJ-1 en la sustancia negra.

55 La Fig. 10 ilustra un análisis gráfico que indica que la intoxicación por MPTP provocó una reducción aproximada del 75% de la DA estriatal en comparación con el núcleo estriado de los ratones de control a los que se les inyectó suero salino, pero que el tratamiento con TBG protegió, de manera dependiente de la dosis, la dopamina *in vivo* en el núcleo estriado de los ratones intoxicados por MPTP.

Descripción detallada

60 Esta es una descripción detallada de la presente divulgación y de diversos aspectos de la misma. Solo parte de la presente divulgación se refiere a la invención reivindicada y a sus diversas realizaciones; la invención reivindicada se

expone en las reivindicaciones adjuntas. La relación y el funcionamiento de los distintos elementos de las realizaciones se pueden entender mejor por referencia a la siguiente descripción detallada. Sin embargo, las realizaciones no se limitan a aquellas divulgadas explícitamente en el presente documento. Se entenderá que en determinadas circunstancias es posible que se hayan omitido detalles que no resultan necesarios para entender las realizaciones divulgadas en el presente documento.

Aunque el benzoato de sodio presenta efectos beneficiosos en relación con trastornos del ciclo de la urea, EM, EP, EA y otros trastornos neurodegenerativos, el hecho de que el benzoato de sodio se metabolice rápidamente y se excrete del organismo plantea determinados problemas que solamente se pueden abordar mediante la administración repetida de estos compuestos a los pacientes, por lo general entre tres y cuatro veces al día. Por consiguiente, sería beneficioso obtener una forma de liberación lenta del benzoato de sodio que permita un régimen de administración reducido y un mejor cumplimiento del tratamiento por parte del paciente.

La presente divulgación aborda esta cuestión proporcionando un tratamiento novedoso para trastornos neurodegenerativos que precisa una única administración diaria de una composición farmacéutica. En algunos aspectos, el tratamiento de trastornos neurodegenerativos puede incluir dos administraciones diarias de una composición farmacéutica. En determinados aspectos, la composición farmacéutica divulgada en el presente documento contiene tribenzoato de glicerilo (también conocido como tribenzoína). En otros aspectos, la composición farmacéutica divulgada en el presente documento contiene dibenzoato de glicerilo. En algunos aspectos, la composición farmacéutica contiene tanto tribenzoato de glicerilo como dibenzoato de glicerilo. El dibenzoato y tribenzoato de glicerilo formarán lentamente benzoato de sodio en el organismo, dado que estas moléculas se adherirán al intestino a través de diversas lipasas. Por consiguiente, se plantea la hipótesis de que el dibenzoato y tribenzoato de glicerilo presenten eficacias terapéuticas muy superiores en comparación con el benzoato de sodio.

En un aspecto de la presente divulgación (que no forma parte de la invención reivindicada), se divulga un tratamiento para inhibir la progresión de trastornos del ciclo de la urea. Un trastorno del ciclo de la urea es un trastorno genético causado por una deficiencia de una de las enzimas del ciclo de la urea que es responsable de eliminar el amoníaco del torrente sanguíneo. Existen seis trastornos conocidos del ciclo de la urea. Cada uno se puede clasificar por las iniciales de la enzima que falta. Por consiguiente, los seis trastornos conocidos del ciclo de la urea se pueden referir como N-acetilglutamato sintasa (NAGS), carbamil fosfato sintetasa 1 (CPS1), ornitina transcarbamilasa (OTC), argininosuccinato sintasa (ASS), argininosuccinato liasa (ASL) y arginasa-1 (ARG1). El tratamiento comprende la administración de una cantidad efectiva de una composición farmacéutica que contiene tribenzoato de glicerilo y/o dibenzoato de glicerilo a un paciente que lo necesite. De acuerdo con la presente divulgación, el tratamiento puede ser administrado una vez al día. En algunos aspectos, el tratamiento puede incluir dos administraciones al día.

En otro aspecto de la presente divulgación, se divulga un tratamiento para inhibir la progresión de trastornos neurodegenerativos. El tratamiento comprende la administración de una cantidad efectiva de una composición farmacéutica que contiene tribenzoato de glicerilo y/o dibenzoato de glicerilo a un paciente que lo necesite. En algunos aspectos, los trastornos neurodegenerativos se seleccionan del grupo compuesto por EP, EA, EM, depresión, enfermedad de Huntington, demencia y cualquier trastorno de pérdida de memoria. En algunos aspectos, los trastornos neurodegenerativos se pueden identificar por una disminución en los niveles de FNDC y NT-3 en comparación con los sujetos normales. De acuerdo con la presente divulgación, el tratamiento puede ser administrado una vez al día. En algunos aspectos, el tratamiento puede incluir dos administraciones al día.

En los métodos de tratamiento contemplados por la presente divulgación, el tribenzoato de glicerilo y/o dibenzoato de glicerilo se pueden utilizar de forma aislada o en composiciones junto con un portador o excipiente farmacéuticamente aceptable. A efectos del presente documento, por "portador farmacéuticamente aceptable" se entiende un relleno no tóxico, sólido, semisólido o líquido inerte, diluyente, material de encapsulación o auxiliar de formulación de cualquier tipo. Algunos ejemplos de materiales que pueden actuar como portadores farmacéuticamente aceptables son azúcares como lactosa, glucosa y sacarosa; almidones como almidón de maíz y almidón de patata; celulosa y sus derivados como carboximetilcelulosa sódica, etilcelulosa y acetato de celulosa; tragacanto en polvo; malta; gelatina; talco; excipientes como manteca de cacao y ceras en supositorio; aceites como aceite de cacahuete, aceite de semilla de algodón; aceite de cártamo; aceite de sésamo; aceite de oliva; aceite de maíz y aceite de soja; glicoles como propilenglicol; ésteres como oleato de etilo y laurato de etilo; agar; amortiguadores como hidróxido de magnesio e hidróxido de aluminio; ácido algínico; agua libre de pirógenos; suero fisiológico; solución de Ringer; alcohol etílico y soluciones amortiguadoras de fosfatos, así como otros lubricantes compatibles no tóxicos como laurilsulfato de sodio y estearato de magnesio, y agentes colorantes, agentes de liberación, agentes de recubrimiento, agentes edulcorantes, aromatizantes y perfumantes, conservantes y antioxidantes que también pueden estar presentes en la composición en función del criterio del formulador. Otros excipientes farmacéuticamente aceptables adecuados se describen en "Remington's Pharmaceutical Sciences," Mack Pub. Co., New Jersey, 1991.

El tribenzoato de glicerilo y/o dibenzoato de glicerilo puede administrarse por vía oral a seres humanos y otros animales. El tribenzoato de glicerilo y/o dibenzoato de glicerilo puede ser formulado para la administración y los métodos de formulación son bien conocidos en la técnica (ver, por ejemplo, Remington: *The Science and Practice of Pharmacy*, Mack Publishing Company, Easton, Pa., 19ª edición (1995)). Las composiciones farmacéuticas para el uso de acuerdo con la presente divulgación pueden adquirir la forma de suspensiones o soluciones líquidas estériles no pirogénicas, cápsulas recubiertas, polvo liofilizado u otras formas conocidas en la técnica.

Las formas farmacéuticas sólidas para la administración oral incluyen cápsulas, tabletas, píldoras, polvos y gránulos. En estas formas farmacéuticas sólidas, el compuesto activo se combina con al menos un excipiente o portador inerte farmacéuticamente aceptable como citrato de sodio o fosfato dicálcico y/o a) rellenos o aditivos como almidones, lactosa, sacarosa, glucosa, manitol y ácido silícico; b) aglutinantes como, por ejemplo, carboximetilcelulosa, alginatos, gelatina, polivinilpirrolidona, sacarosa y goma arábica; c) humectantes como glicerol; d) agentes disgregadores como agar-agar, carbonato cálcico, almidón de patata o tapioca, ácido alginico, determinados silicatos y carbonato de sodio; e) agentes retardantes de soluciones como parafina; f) acelerantes de la absorción como compuestos de amonio cuaternario; g) agentes humectantes como, por ejemplo, alcohol de acetilo y monoestearato de glicerol; h) absorbentes como caolín y arcilla bentonítica; e i) lubricantes como talco, estearato de calcio, estearato de magnesio, polietilenglicoles sólidos, laurilsulfato de sodio y combinaciones de los mismos. En el caso de las cápsulas, tabletas y píldoras, la forma farmacéutica también puede comprender agentes amortiguadores.

Composiciones sólidas de un tipo similar también se pueden emplear como rellenos en cápsulas de gelatina blanda o dura utilizando excipientes como lactosa o azúcar lácteo, así como polietilenglicoles de alto peso molecular y similares.

Las formas sólidas de dosificación de comprimidos, grageas, cápsulas, píldoras y gránulos se pueden preparar con recubrimientos y envolturas como recubrimientos entéricos y otros recubrimientos bien conocidos en la técnica de la formulación farmacéutica. Estos pueden contener opcionalmente agentes opacificantes y también pueden tener una composición adecuada para liberar el ingrediente o ingredientes activos solamente, o preferiblemente, en una determinada parte del tracto intestinal, y opcionalmente de forma retardada. Los ejemplos de composiciones integradoras que se pueden utilizar incluyen sustancias poliméricas y ceras.

Los componentes activos también pueden estar en forma microencapsulada con uno o más excipientes como se ha señalado anteriormente. Las formas farmacéuticas sólidas de las comprimidos, grageas, cápsulas, píldoras y gránulos se pueden preparar con recubrimientos y envolturas como recubrimientos entéricos, recubrimientos con control de liberación y otros recubrimientos bien conocidos en la técnica de la formulación farmacéutica. En estas formas farmacéuticas sólidas el compuesto activo se puede mezclar con al menos un diluyente inerte como sacarosa, lactosa o almidón. Estas formas farmacéuticas también pueden comprender, como práctica normal, sustancias adicionales distintas de los diluyentes inertes, como por ejemplo lubricantes para tableteo y otras ayudas para el tableteo como estearato de magnesio y celulosa microcristalina. En el caso de las cápsulas, tabletas y píldoras, las fórmulas farmacéuticas también pueden comprender agentes amortiguadores. Estos pueden contener opcionalmente agentes opacificantes y también pueden tener una composición adecuada para liberar el ingrediente o ingredientes activos solamente, o preferiblemente, en una determinada parte del tracto intestinal, y opcionalmente de forma retardada. Los ejemplos de composiciones integradoras que se pueden utilizar incluyen sustancias poliméricas y ceras.

Las fórmulas farmacéuticas líquidas para la administración oral incluyen emulsiones, microemulsiones, soluciones, suspensiones, jarabes y elixires farmacéuticamente aceptables. Además de los compuestos activos, las formas farmacéuticas líquidas pueden contener diluyentes inertes utilizados habitualmente en la técnica, como por ejemplo agua u otros disolventes, agentes solubilizantes y emulsionantes como alcohol etílico, alcohol isopropílico, carbonato etílico, EtOAc, alcohol bencílico, benzoato bencílico, propilenglicol, 1,3-butilenglicol, dimetilformamida, aceites (en particular, aceite de semilla de algodón, aceite de cacahuete, aceite de maíz, aceite de germen, aceite de oliva, aceite de ricino y aceite de sésamo), glicerol, alcohol tetrahydrofurfurílico, polietilenglicoles y ésteres de ácidos grasos de sorbitán, así como combinaciones de estos. Además de los diluyentes inertes, las composiciones orales también pueden incluir adyuvantes como agentes humectantes, emulsionantes y de suspensión, edulcorantes, aromatizantes y perfumantes.

Las cantidades efectivas de las composiciones de esta divulgación incluyen por lo general cualquier cantidad suficiente para inhibir (por ejemplo, ralentizar o detener) la progresión de un trastorno, tales como trastornos del ciclo de la urea y trastornos neurodegenerativos. La cantidad de ingrediente activo (tribenzoato de glicerilo y/o dibenzoato de glicerilo) que se puede combinar con los materiales portadores para producir una única forma farmacéutica variarán en función del huésped tratado y del modo de administración concreto. Sin embargo, se entenderá que el nivel de dosificación específico para un paciente en particular dependerá de diversos factores, incluyendo la actividad del compuesto específico empleado, la edad, el peso corporal, la salud general, el sexo, la dieta, la hora de administración, la vía de administración, la velocidad de excreción, la combinación de fármacos y la gravedad de la enfermedad o el trastorno.

concreto para el que se administra la terapia. La cantidad terapéuticamente efectiva para una situación dada se puede determinar fácilmente mediante experimentación rutinaria y depende de la competencia y el criterio del médico habitual.

De acuerdo con los métodos de tratamiento de la presente divulgación, la progresión del trastorno se ralentiza o detiene en un paciente, como un ser humano o un mamífero inferior, mediante la administración al paciente de una cantidad efectiva de tribenzoato de glicerilo y/o dibenzoato de glicerilo en las cantidades y durante el tiempo que sean necesarios para alcanzar el resultado deseado. Por una cantidad de un compuesto efectiva para ralentizar o detener la progresión de una enfermedad o trastorno se puede entender una cantidad suficiente del compuesto para tratar la enfermedad o el trastorno con una ratio de beneficio/riesgo razonable aplicable a cualquier tratamiento médico.

Sin embargo, se entenderá que el médico responsable decidirá el uso diario total de los compuestos y las composiciones de la presente divulgación aplicando un criterio médico sensato. El nivel de la dosis efectiva terapéuticamente efectiva para cualquier paciente en particular dependerá de diversos factores, incluyendo la enfermedad o el trastorno a tratar y su gravedad; la actividad del compuesto específico empleado; la composición específica utilizada; la edad, el peso corporal, el estado de salud general, el sexo y la dieta del paciente; la hora de administración, la vía de administración y la velocidad de excreción del compuesto específico empleado; la duración del tratamiento; los fármacos utilizados en combinación o en paralelo con el compuesto específico empleado; así como factores similares bien conocidos en las técnicas médicas.

La "cantidad efectiva" o dosis de un compuesto de la presente divulgación, como tribenzoato de glicerilo y/o dibenzoato de glicerilo, que se administrará a animales de sangre caliente, como seres humanos, podrá variar en función del trastorno a tratar. En relación con los trastornos del ciclo de la urea, en determinados aspectos de esta divulgación, la cantidad efectiva puede oscilar entre aproximadamente tres gramos y 10 gramos al día para una persona de 50 kilos de peso, o cualquier cantidad o subrango. Por ejemplo, la cantidad efectiva puede ser de unos 4 gramos, 5 gramos, 6 gramos, 7 gramos, 8 gramos o 9 gramos. En algunos aspectos, la dosis puede oscilar entre unos 3 y 6 gramos al día para una persona de 50 kilos de peso. En otros aspectos, la cantidad efectiva puede oscilar entre unos 100 mg/kg y unos 200 mg/kg por persona y día. En relación con los trastornos neurodegenerativos, en determinados aspectos de esta divulgación, la cantidad efectiva puede oscilar entre aproximadamente 1 gramo y 5 gramos al día para una persona de 50 kilos de peso, o cualquier cantidad o subrango. Por ejemplo, la cantidad efectiva puede ser de unos 2 gramos, 3 gramos o 4 gramos. En algunos aspectos, la dosis puede oscilar entre aproximadamente 1 gramo y 3 gramos al día para una persona de 50 kilos de peso. En un aspecto concreto, la dosis puede ser de unos 1,25 gramos al día para una persona de 50 kilos de peso. En otros aspectos, la cantidad efectiva puede oscilar entre unos 25 mg/kg y unos 50 mg/kg por persona y día.

Ejemplos

Los siguientes experimentos se han realizado (o se realizarán) para probar la eficacia del tribenzoato de glicerilo (tribenzoína) y/o dibenzoato de glicerilo para el tratamiento de la EM, la EP y trastornos del ciclo de la urea. Cabe señalar que la invención reivindicada se limita a una composición farmacéutica que contiene tribenzoato de glicerilo y/o dibenzoato de glicerilo para el uso en un método para inhibir la progresión de un trastorno neurodegenerativo. Los ejemplos que se exponen a continuación ilustran los experimentos realizados utilizando tribenzoato de glicerilo. Se realizarán experimentos similares utilizando dibenzoato de glicerilo o combinaciones de tribenzoato de glicerilo y dibenzoato de glicerilo.

Encefalomiелitis alérgica experimental (EAE) por transferencia adoptiva. Se adquirieron ratones hembra SJL/J (de 4-5 semanas de vida) a Harlan Sprague-Dawley (Indianapolis, IN). Los ratones donantes se inmunizaron por vía subcutánea con 400 µg de proteína básica de mielina (PBM) y 60 µg de *M. tuberculosis* en adyuvante incompleto de Freund (IFA). Los animales fueron sacrificados 10-12 días después de la inmunización, se extirparon los ganglios linfáticos drenantes y se cultivaron suspensiones de una única célula en RPMI 1640 suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB), 50 µg/mL de PBM, 50 µM de 2-ME, 2 mM de L-glutamina, 100 U/mL de penicilina y 100 µg/ml de estreptomina. El día 4 se recogieron las células y se volvieron a suspender en solución salina equilibrada de Hank (HBSS). Un total de 2×10^7 células viables en un volumen de 200 µL se inyectaron en la vena caudal de ratones no tratados. Se inyectó toxina Pertussis (150 ng/ratón; Sigma-Aldrich) una sola vez por vía intraperitoneal el día 0 post-transferencia (dpt) de las células. Los animales se sometieron a observación diaria para detectar síntomas clínicos. Se utilizaron seis ratones en cada grupo. Las hembras de ratón (de 4-5 semanas de vida) se seleccionaron de forma aleatoria de cualquiera de los grupos. Los animales experimentales fueron calificados por un investigador enmascarado, como sigue: 0, sin enfermedad clínica; 0,5, piloerección; 1, debilidad de la cola; 1,5, parálisis de la cola; 2, debilidad de las patas traseras; 3, parálisis de las patas traseras; 3,5, debilidad de las patas delanteras; 4, parálisis de las patas delanteras; 5, moribundo o fallecido. En las Fig. 1A y 2, el eje y es la puntuación clínica media y el eje x es el número de días post-transferencia. En las Fig. 1B-1C, el eje y es la puntuación clínica media y el eje x es el número de días post-inmunización.

EAE relapsante en ratones Tg 5B6 PLP-TCR. El profesor Vijay Kuchroo (Harvard Medical School, Boston, MA) aportó ratones Tg PLP₁₃₉₋₁₅₁-específico 5B6 TCR. Los ratones hembra Tg (de 4-5 semanas de vida) se inmunizaron con 10 o 25 µg de PLP139-151 en *M. tuberculosis* en IFA como se ha descrito antes. También se les administró toxina Pertussis (150 µg/ratón) en una sola ocasión el día 0 post-inmunización. En el grupo EAE (Fig. 1B), donde los ratones hembra transgénicos PLP-TCR fueron inmunizados con 25 µg de PLP139-151, dos ratones murieron sin intervención humana 17 días después de la inmunización y cuatro ratones moribundos fueron decapitados tras la administración de anestesia. Sin embargo, de acuerdo con el alcance de la enfermedad, los seis ratones de este grupo recibieron una puntuación de 5.

EAE crónica. Se inmunizó a ratones C57BL/6 con 100 µg de MOG35-55 como se ha descrito antes. Los ratones también recibieron dos dosis de toxina pertussis (150 ng/ratón) los días 0 y 2 dpi.

Tratamiento con tribenzoato de glicerilo (TBG). Se mezcló TBG en 0,5% de metilcelulosa (MC) y se administró a los ratones EAE vía sonda 100 µl de TBG mezclados con MC una vez al día utilizando una sonda de aguja. Por consiguiente, los ratones EAE de control recibieron solo MC como vehículo.

Microscopía histológica. El día 14 tras la inmunización (primera fase crónica), cinco ratones de cada uno de los siguientes grupos (control, EAE, EAE+TBG y EAE+vehículo) fueron anestesiados. Tras perfusión con solución tamponada de fosfato (PBS) (pH 7.4) y posteriormente con una solución al 4% (porcentaje en peso) de paraformaldehído en PBS, se diseccionaron y extrajeron el cerebelo y la médula espinal completa de cada uno de los ratones. Los tejidos se fijaron y se dividieron en mitades: una mitad se utilizó para la tinción histológica y la otra mitad para la tinción de mielina. Para el análisis histológico, se realizó una histología rutinaria para obtener el manguito perivascular y detalles morfológicos de tejidos del SNC de los ratones EAE. Los tejidos fijados con paraformaldehído se introdujeron en parafina y se cortaron secciones en serie (4 µm). Las secciones se tiñeron con el método de tinción H y E convencional. Se recogieron imágenes digitales sobre un fondo claro utilizando un objetivo de 40x. Los portaobjetos se evaluaron de forma ciega por tres examinadores para detectar inflamación en diferentes compartimentos anatómicos (meninges y parénquima). La inflamación se puntuó utilizando la siguiente escala tal y como se describe: para meninges y parénquima: 0, sin células de infiltración; 1, pocas células de infiltración; 2, numerosas células de infiltración; y 3, infiltración generalizada. Para los vasos: 0, ningún vaso afectado; 1, uno o dos vasos afectados por sección; 2, tres a cinco vasos afectados por sección; y 3, más de cinco vasos afectados por sección. Al menos seis secciones en serie de cada médula espinal de cada uno de los cinco ratones de cada grupo fueron puntuadas y analizadas estadísticamente por ANOVA.

Tinción para valorar la mielina. Las secciones se tiñeron con Luxol azul rápido para valorar la mielina como se ha descrito anteriormente. Los portaobjetos fueron valorados de forma ciega para la desmielinización por tres examinadores usando la siguiente escala: 0, sustancia blanca normal; 1, pocos focos; 2, algunas áreas de desmielinización; y 3, grandes áreas de desmielinización. Al menos seis secciones en serie de cada médula espinal de cada uno de los cinco ratones de cada grupo fueron puntuadas y analizadas estadísticamente por ANOVA.

Análisis RT-PCR semicuantitativo. Se aisló ARN total de células T esplénicas y médula espinal, utilizando el minikit RNeasy (Qiagen, Valencia, CA), y del bazo y cerebelo, utilizando el reactivo Ultraspec-II RNA (Biotecx Laboratories, Inc., Houston, TX) siguiendo el protocolo del fabricante. Para eliminar cualquier ADN genómico contaminante, el ARN se sometió a digestión con DNasa. Se realizó una RT-PCR semicuantitativa utilizando un kit RT-PCR de Clontech (Mountain View, CA). En resumen, se sometió 1 µg de ARN total a transcripción inversa utilizando oligo(dT)₁₂₋₁₈ como tampón y transcriptasa inversa MMLV (Clontech) en 20 µl de mezcla de reacción. El ADNc resultante se diluyó apropiadamente y el ADNc diluido se amplificó utilizando ADN polimerasa Taq Titanium y los tampones siguientes. Los productos amplificados se sometieron a electroforesis en geles de agarosa al 1,8% y se visualizaron con tinción de bromuro de etidio.

(SEQ ID NO:1) iNOS: Sentido: 5'- CCCTTCCGAAGTTTCTGGCAGCAGC-3'

(SEQ ID NO: 2) Antisentido: 5'- GGCTGTCAGAGCCTCGTGGCTTTGG-3'

(SEQ ID NO:3) IL-1B: Sentido: 5'-CTCCATGAGCTTTGTACAAGG-3'

(SEQ ID NO: 4) Antisentido: 5'-TGCTGATGTACCAAGTTGGGG-3'

(SEQ ID NO: 5) PBM: Sentido: 5'-TGGAGAGATTCACCGAGGAGA-3'

(SEQ ID NO: 6) Antisentido: 5'-TGAAGCTCGTGGACTCTGAG-3'

(SEQ ID NO: 7) GAPDH: Sentido: 5'-GGTGAAGGTCGGTGTGAACG-3'

(SEQ ID NO: 8) Antisentido: 5'-TTGGCTCCACCCTTCAAGTG-3'

- 5 La expresión relativa de cada gen con respecto a la GAPDH se midió tras escanear las bandas con un sistema Fluor Chem 8800 Imaging System (Alpha Innotech, San Leandro, CA).

El análisis de PCR en tiempo real se realizó utilizando el sistema de detección de secuencias ABI-Prism7700 (Applied Biosystems, Foster City, CA). En resumen, las reacciones se realizaron en placas de reacción óptica de 96 pocillos sobre ADNc equivalente a 50 µg de ARN digerido con DNasa en un volumen de 25 µL, que contenía 12,5 µl de mezcla TaqMan Universal Master y concentraciones optimizadas de tampones directos e inversos, sonda etiquetada FAM siguiendo el protocolo del fabricante. Todos los tampones y sondas etiquetadas FAM para genes de ratón y GAPDH se obtuvieron de Applied Biosystems. Las expresiones de ARNm de los respectivos genes fueron normalizados al nivel de ARNm de GAPDH. Los datos se procesaron con el software ABI Sequence Detection System 1.6 y se analizaron por ANOVA.

TGF-β ELISA. La producción de TGF-β en sobrenadante de cultivo se monitorizó por ELISA utilizando un kit de ensayo de eBioscience (San Diego, CA).

20 *Citometría de flujo.* Se realizó una citometría de flujo con dos colores como se ha descrito antes. En resumen, 1 x 10⁶ células de ganglios linfáticos (CGL) o esplenocitos suspendidos en solución tamponada de tinción de flujo se incubaron a 4°C con Ab (anticuerpos) etiquetados FITC debidamente diluidos en CD4 durante 30 minutos, se lavaron y se volvieron a suspender en una solución de fijación y permeabilización. Tras la incubación en oscuridad durante 30 minutos, las células se lavaron, se bloquearon con Fc-block de ensayo (CD16/32 anti-ratón) en solución tamponada de permeabilización, y posteriormente se incubaron en oscuridad con anticuerpos (Abs) etiquetados PE debidamente diluidos en Foxp3 a 4°C. Tras la incubación, la suspensión celular se centrifugó, se lavó tres veces y se volvió a suspender en una solución tamponada de tinción de flujo. Posteriormente las células se analizaron con FACS (BD Biosciences, San Jose, CA). Las células se recogieron en base a características morfológicas. Las células apoptóticas y necróticas no fueron aceptadas para el análisis FACS.

30 *TBG inhibe la transferencia adoptiva de EAE en ratones hembra SJL/J.* El inventor indujo EAE-RR en ratones hembra SJL/J mediante transferencia adoptiva de células T cebadas-PBM. Estos ratones EAE fueron tratados con diferentes dosis de TBG a partir del octavo día post-transferencia, cuando estos ratones presentaron una puntuación clínica de 0,5 o superior. Un grupo adicional de ratones se trató con el vehículo (Fig. 1A). Incluso a una dosis de 25 mg/kg de peso corporal/día, el TBG inhibió de forma significativa los síntomas clínicos (Fig. 1A). Por otra parte, a una dosis de 50 mg/kg de peso corporal/día, se observó una inhibición drástica de los síntomas clínicos en las fases tanto agudas como crónicas de la EAE (Fig. 1A). El vehículo (metilcelulosa al 0,1%) se mostró incapaz de inhibir los síntomas clínicos de la EAE (Fig. 1A), lo que sugiere la especificidad del efecto. Sin embargo, a una dosis de 100 mg/kg de peso corporal/día, el TBG fue menos potente que a 50 mg/kg de peso corporal/día en la supresión de los síntomas clínicos (Fig. 1A), lo que sugiere que a una dosis más elevada puede ser tóxico para los ratones EAE.

45 *TBG inhibe los síntomas clínicos y la gravedad de la enfermedad EAE en ratones hembra transgénicos PLP-TCR.* Después, el inventor examinó si el tratamiento con TBG también era capaz de suprimir la progresión de la EAE en ratones hembra transgénicos (Tg) PLP-TCR. Como se notificó, la inmunización con dosis bajas (10 µg/ratón) de PLP139-151 indujo claramente los síntomas clínicos de EAE en ratones hembra Tg PLP-TCR (Fig. 1B). Los ratones EAE fueron tratados con diferentes dosis de TBG a partir del octavo día post-inmunización. Se observó claramente un efecto inhibitor del TBG en los síntomas clínicos en tan solo unos días de tratamiento (Fig. 1B). Se observó una inhibición mayor en los días de tratamiento posteriores, que se mantuvo durante todo el experimento (Fig. 1B). También en este caso, la inhibición máxima de la EAE se observó a una dosis de 50 mg/kg de peso corporal/día de TBG (Fig. 1B). Por otra parte, el vehículo no tuvo ese efecto inhibitor (Fig. 1B).

55 *TBG inhibe la EAE crónica en ratones macho C57/BL6.* Mientras que se utilizan ratones hembra SJL/J para inducir la EAE-RR, para la forma crónica de la EAE se utilizan modelos de ratones macho C57/BL6 tras la inmunización con MOG35-55. Por consiguiente, el inventor examinó la eficacia de TBG en la supresión del proceso de la enfermedad de la EAE crónica. De forma similar a su efecto sobre la EAE-RR en ratones hembra SJL/J y ratones Tg PLP-TCR, el tratamiento con TBG también inhibió claramente los síntomas clínicos de la EAE en este modelo crónico (Fig. 1C). De nuevo, el vehículo no tuvo ningún efecto sobre la EAE crónica (Fig. 1C), lo que sugiere la especificidad del efecto.

60 El tratamiento con TBG inhibe la generación de células T encefalitogénicas en ratones donantes. Las células T aisladas de ratones donantes inmunizados con PBM son encefalitogénicas y la transferencia adoptiva de estas células T induce la EAE en los ratones receptores. Por consiguiente, el inventor investigó si el tratamiento de ratones donantes con TBG era

capaz de inhibir la producción de células T encefalitogénicas. Para comprobarlo, los ratones donantes fueron tratados con TBG (50 mg/kg de peso corporal/día) por vía oral desde el día de la inmunización con PBM. Las células T aisladas de los ratones donantes inmunizados con PBM tratados con TBG y no tratados se transfirieron adoptivamente a los ratones receptores. Los resultados demostraron que los ratones que reciben células T cebadas con la proteína básica de la mielina (PBM) de ratones donantes tratados con TBG presentaron síntomas clínicos y gravedad de la enfermedad notablemente reducidos en comparación con los ratones que recibieron células T cebadas con PBM de ratones donantes no tratados o de ratones donantes tratados con un vehículo (Fig. 2). Estos resultados sugieren que el tratamiento con TBG inhibe la generación de células T encefalitogénicas *in vivo* en ratones donantes.

El tratamiento con TBG preserva la integridad de la barrera hematoencefálica (BBB) y de la barrera hematoespinal (BSB) en ratones EAE sometidos a transferencia adoptiva. Las barreras BBB y BSB son estructuras de tipo membranoso que actúan principalmente para proteger el cerebro y la médula espinal, respectivamente, de las sustancias químicas de la sangre, al tiempo que permiten la entrada de algunas moléculas esenciales. Se sabe que durante la EM y la EAE activa, las barreras BBB y BSM se rompen en una sección del cerebro y de la médula espinal, debido respectivamente a la inflamación generalizada, permitiendo así que diferentes toxinas y moléculas de la sangre entren en el SNC. Por consiguiente, el inventor investigó si el tratamiento con TBG modulaba la integridad de las barreras BBB y BSB. El inventor inyectó un colorante de infrarrojos (Alexa-680) vía vena caudal y dos horas después de la inyección se examinaron los ratones vivos en un escáner de infrarrojos Odyssey. Tal y como se pone de manifiesto en la Figura 3A (primera banda), las señales de infrarrojos no resultaban visibles en áreas del cerebro y la médula espinal en los ratones de control a los que se les había inyectado HBSS. Por otra parte, en los ratones EAE, las señales de infrarrojos se detectaron en áreas del cerebro y la médula espinal (Fig. 3A, segunda columna), lo que sugiere una posible rotura de las barreras BBB y BSB. Sin embargo, el tratamiento con TBG inhibió claramente la entrada del colorante de infrarrojos en el SNC de los ratones EAE (Fig. 3A; comparar la banda 3 con la banda 2). Por el contrario, el tratamiento con el vehículo no influyó en la entrada del colorante de infrarrojos en el SNC de los ratones EAE, como pone de manifiesto la alineación de las señales de infrarrojos en la médula espinal y el cerebro (Fig. 3A; comparar la banda 4 con la banda 2), lo que sugiere la especificidad del efecto.

Para confirmar todavía más estos resultados, los ratones fueron sacrificados y la médula espinal y diferentes partes del cerebro (corteza frontal, mesencéfalo y cerebelo) se examinaron para detectar señales de infrarrojos en un escáner de infrarrojos Odyssey. De forma consistente con los resultados en ratones vivos, el inventor no apreció una importante señal de infrarrojos en la médula espinal y diferentes partes del cerebro en los ratones de control tratados con HBSS (Fig. 3B-D; banda 1), pero en los ratones EAE una cantidad significativa de colorante de infrarrojos resultaba visible en los tejidos del SNC (Fig. 3B-D; banda 2). Una vez más, el tratamiento de ratones EAE con TBG atenuó de forma significativa la entrada de colorante de infrarrojos en la médula espinal y diferentes partes del cerebro (Fig. 3B-D; comparar la banda 3 con la banda 2). Conjuntamente estos resultados sugieren que el tratamiento con TBG preserva la integridad de las barreras BBB y BSB en los ratones EAE. En la Fig. 3C, la fila superior se refiere a la corteza frontal, la fila del medio se refiere al mesencéfalo y la última al cerebelo. En la Fig. 3D, la primera columna se refiere al control, la segunda a EAE, la tercera a EAE + TBG, la cuarta a EAE + vehículo, y el eje y es la densidad de la señal de infrarrojos.

TBG inhibe la infiltración de células mononucleares, la inflamación y la desmielinación de la médula espinal en la EAE. La infiltración de células T autorreactivas y células mononucleares asociadas es una característica distintiva de la EAE y la EM. El inventor examinó si el tratamiento con TBG atenuaba la infiltración e inflamación en ratones EAE sometidos a transferencia adoptiva. Los ratones que recibieron TBG a partir del octavo día dpt (inicio de la fase aguda) fueron sacrificados el día 16 dpt. La tinción H y E demostró una infiltración generalizada de células inflamatorias en la médula espinal (Fig. 4A) de los ratones EAE. Por otra parte, el tratamiento con TBG inhibió de forma notable la infiltración de células inflamatorias en la médula espinal de los ratones EAE (Fig. 4A). Por el contrario, el vehículo no fue capaz de inhibir la infiltración de células inflamatorias (Fig. 4A). La cuantificación del nivel relativo de células inflamatorias puso de manifiesto que el TBG (pero no el vehículo) redujo de forma drástica la infiltración (Fig. 4B) y la aparición de vasos afectados (Fig. 4C) en la médula espinal de los ratones EAE.

A continuación, el inventor examinó si el TBG era capaz de inhibir la expresión de moléculas proinflamatorias en la médula espinal de los ratones EAE. Se observó una marcada expresión de moléculas proinflamatorias, como iNOS e IL-1 β , en la médula espinal de ratones EAE no tratados en comparación con los ratones de control (Fig. 4D-F). Sin embargo, el tratamiento con TBG redujo de forma drástica la expresión de estas moléculas proinflamatorias en la médula espinal de los ratones EAE (Fig. 4D-F).

La desmielinización es la característica patológica más importante de la EM, que también se modela en animales EAE. Por consiguiente, el inventor examinó si el TBG protegía a los ratones EAE frente a la desmielinización. El inventor tiñó secciones de la médula espinal con Luxol azul rápido (LFB) para mielina y observó las zonas de desmielinización generalizadas en la sustancia blanca (Fig. 5A-B). Sin embargo, el tratamiento con TBG restauró de forma significativa el

nivel de mielina en la médula espinal de los ratones EAE (Fig. 5A-B). Por el contrario, el vehículo no fue capaz de recuperar el nivel de mielina en la médula espinal de los ratones EAE (Fig. 5A-B). Para confirmar esta conclusión, el inventor realizó un seguimiento de la expresión de tres genes de mielina, proteína básica de la mielina (MBP) y proteína proteolípida (PLP), y observó una pérdida marcada de la expresión de ARNm de estos genes en la médula espinal de ratones EAE no tratados en comparación con los ratones de control (Fig. 5C-E). Sin embargo, se observó una restauración significativa de la expresión de ARNm del gen de mielina de la médula espinal de los ratones EAE que fueron tratados con TBG pero no con el vehículo (Fig. 5C-E).

El tratamiento con TBG protege las células Treg en ratones EAE vía TGF- β . Dado que se sabe que el TGF- β protege a los ratones de la EAE, el inventor examinó el nivel de TGF- β en suero de los ratones EAE tratados con TBG y no tratados por ELISA. Los ratones que recibieron TBG o el vehículo a partir del octavo día dpt fueron sacrificados el día 16 dpt para analizar el nivel de TGF- β en suero. El inventor observó un descenso marcado de TGF- β en suero de ratones EAE en comparación con los ratones de control (Fig. 6). Sin embargo, el tratamiento de los ratones EAE con TBG (pero no con el vehículo) protegía el TGF- β .

Dado que el TGF- β está implicado en la diferenciación de las células no Treg de las Treg, el inventor analizó la situación de Treg en ratones EAE. Una gran población de Treg se caracteriza por un factor de transcripción FoxP3. Durante los brotes autoinmunes, las Treg se vuelven defectuosas tanto numérica como funcionalmente. Por consiguiente, tal y como se esperaba, el inventor observó una reducción significativa de la población Foxp3+CD4+ de células T en esplenocitos EAE, como se pone de manifiesto en el gráfico de puntos de FACS (Fig. 7A-B). Sin embargo, de forma similar a lo ocurrido con el incremento de TGF- β , el tratamiento con TBG (pero no con vehículo) de ratones EAE dio lugar al aumento de la población de Foxp3+CD4+ en esplenocitos (Fig. 7A-D).

A continuación, para entender si TBG enriquece las Treg en ratones EAE vía TGF- β , el inventor empleó anticuerpos neutralizantes de TGF- β y los ratones EAE fueron tratados tanto con TBG como con anticuerpos neutralizantes de TGF- β . Es interesante señalar que el co-tratamiento de ratones EAE con anticuerpos neutralizantes de TGF- β anuló el enriquecimiento y/o la protección mediada por TBG de la población Foxp3+CD4+ de células T (Fig. 7A-F). Por otra parte, la IgG de control no tuvo este efecto de anulación, lo que sugiere la especificidad del efecto. Estos resultados demuestran claramente que el tratamiento con TBG protege las Treg en ratones EAE vía TGF- β .

TBG suprime la EAE en ratones vía TGF- β . A continuación, con el fin de testar de nuevo la importancia funcional del aumento de TGF- β mediado por TBG, el inventor examinó si TBG protegía a los ratones de los síntomas clínicos de EAE vía TGF- β . Por consiguiente, durante el tratamiento con TBG se bloqueó la función del TGF- β *in vivo* en ratones EAE mediante un anticuerpo neutralizador anti-TGF- β . Como se expone en la Figura 8, el tratamiento con TBG mejoró los síntomas clínicos de la EAE-RR transferida adoptivamente. Sin embargo, el anticuerpo anti-TGF- β de bloqueo funcional prácticamente anuló por completo el efecto protector mediado por TBG en ratones EAE (Fig. 8). El resultado fue específico, dado que la IgG de control no tuvo este efecto (Fig. 8). Conjuntamente, estos resultados sugieren que el TBG protege de EAE vía TGF- β .

En resumen, la administración oral de TBG suprimió los síntomas clínicos de la EAE relapsante-remitente (RR) transferida adoptivamente en ratones receptores y suprimió la generación de células T encefalíticas en ratones donantes. TBG también inhibió los síntomas clínicos de EAE-RR en ratones hembra transgénicos PLP-TCR y de EAE crónica en ratones macho C57/BL6. El estudio del efecto dependiente de la dosis demostró que TBG a una dosis de 25 mg/kg de peso corporal/día o superior suprimía de forma significativa los síntomas clínicos de EAE en ratones. Por consiguiente, TBG también inhibió el manguito perivascular, mantuvo la integridad de la barrera hematoencefálica y hematoespinal, suprimió la inflamación, normalizó la expresión de genes de mielina, y bloqueó la desmielinización en el SNC de los ratones EAE. Es interesante señalar que el tratamiento con TBG reguló al alza el TGF- β y las células T reguladoras (Treg). Además, se ha demostrado que el bloqueo de TGF- β mediante anticuerpos neutralizadores anuló la protección mediada por TBG de Treg y EAE. Conjuntamente, estos resultados sugieren que la administración oral de TBG puede ser beneficiosa en pacientes de EM.

También se realizaron experimentos para testar TBG en relación con la enfermedad de Parkinson (EP).

Animales e intoxicación por MPTP. Se adquirieron ratones C57BL/6 de seis a ocho semanas de vida en Harlan (Indianapolis, IN). Para la intoxicación aguda por MPTP, los ratones recibieron cuatro inyecciones intraperitoneales (i.p) de MPTP-HCl (18 mg/kg de base libre; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) en suero salino a intervalos de 2 horas. Los animales de control recibieron solo suero salino.

Tratamiento con tribenzoato de glicerilo (TBG). Se mezcló TBG en 0,5% de metilcelulosa (MC) y, después de tres horas desde la última inyección de MPTP, se administró a los ratones por sonda 100 μ l de TBG mezclados con MC una vez al día utilizando una sonda de aguja. Por consiguiente, los ratones MPTP de control recibieron solo MC como vehículo.

Análisis Western blot. Se realizó un análisis inmunoblot para DJ-1 y tirosina hidroxilasa (TH). En resumen, los homogeneizados celulares se sometieron a electroforesis, las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa y se visualizaron las bandas con un escáner de infrarrojos Odyssey tras el inmunoetiquetado con los respectivos anticuerpos primarios, seguido del anticuerpo secundario marcado con un fluoróforo de infrarrojos (Invitrogen).

Análisis HPLC. El nivel estriatal de dopamina se cuantificó en Complete Stand-Alone HPLC-ECD System EiCOMHTEC-500 (JM Science Inc., Grand Island, NY). En resumen, los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical, 7 días después de la intoxicación con MPTP, y se recogieron los núcleos estriados que fueron congelados de inmediato en hielo seco y almacenados a -80 °C hasta el análisis. El día del análisis, los tejidos se sonicaron en 0,2M de ácido perclórico que contenía isoproterenol, y los homogeneizados resultantes se centrifugaron a 20.000 x g durante 15 minutos a 4 °C. Tras el ajuste del pH y el filtrado, se inyectaron 10µl de sobrenadante en una columna Eicompak SC-30DS (Complete Stand-Alone HPLC- ECD System EiCOMHTEC-500 de JM Science Inc., Grand Island, NY) y se analizó siguiendo el protocolo del fabricante.

La regulación al alza y/o el mantenimiento de proteína beneficiosa relacionada con EP como DJ-1 en la sustancia negra durante brotes neurodegenerativos puede tener eficacia terapéutica en la EP. Como se esperaba, la intoxicación con MPTP redujo el nivel de DJ-1 *in vivo* en la sustancia negra (Fig. 9A-B). Sin embargo, el tratamiento oral de ratones intoxicados con MPTP con TBG (pero no con el vehículo, metilcelulosa al 0,1%) protegió la DJ-1 en la sustancia negra (Fig. 9A-B). El efecto protector de TBG fue dependiente de la dosis y la protección máxima se observó a una dosis de 50 o 100 mg/kg de peso corporal/día (Fig. 9A-B).

Dado que el TBG protegió la DJ-1 en la sustancia negra de los ratones intoxicados con MPTP, a continuación el inventor investigó si la DJ-1 protegía el nigroestriado del daño de la MPTP. La tirosina hidroxilasa (TH), la principal enzima responsable de la producción de dopamina, está presente en las neuronas dopaminérgicas. La intoxicación con MPTP provocó aproximadamente un 60% de pérdida de TH nigral (Fig. 9A-B) en comparación con los controles inyectados con suero salino. Sin embargo, TBG protegió la TH nigral de manera dependiente de la dosis (Fig. 9A-B). Aunque la protección mediada por TBG resultó evidente a una dosis de 25 mg/kg de peso corporal/día, la protección máxima de la TH nigral se observó a una dosis de 50 o 100 mg/kg de peso corporal/día (Fig. 9A-B).

A continuación, con el fin de determinar si TBG protege frente a déficits bioquímicos causados por la MPTP, el inventor cuantificó los niveles de dopamina (DA) en el núcleo estriado 7 días después del tratamiento con MPTP. Como se expone en la Figura 10, la intoxicación con MPTP provocó una reducción aproximada del 75% de la DA estriatal en comparación con el estriado de los ratones de control inyectados con suero salino. Por el contrario, el tratamiento con TBG protegió, de forma dependiente de la dosis, la dopamina *in vivo* en el estriado de los ratones intoxicados con MPTP (Fig. 10). También en este caso, la protección máxima de la dopamina estriatal se observó a una dosis de 50 o 100 mg/kg de peso corporal/día de TBG (Fig. 10). Los animales que recibieron TBG a una dosis de 50 mg/kg de peso corporal/día presentaron solo un descenso del 25% de la dopamina estriatal (Fig. 10).

El inventor no apreció ningún efecto secundario relacionado con el fármaco (por ej., pérdida de pelo, pérdida de peso, infección adversa, etc.) en ninguno de los ratones utilizados durante el estudio, lo que sugiere que es posible que TBG no presente efectos secundarios.

En resumen, el inventor demostró que TBG protege la DJ-1 y la TH en la sustancia negra y que preserva la dopamina en el estriado del modelo de ratón MPTP en la EP. Estos resultados ponen de manifiesto un novedoso papel neuroprotector de TBG y sugieren que este aditivo alimenticio indirecto se puede explorar para la intervención terapéutica en la EP.

En el futuro, el inventor determinará si el tratamiento con tribenzoína mejora las funciones motoras de los ratones intoxicados con MPTP. Se intoxicará con MPTP a ratones macho C57/BL6 y a partir de las 6 horas tras la última inyección de MPTP, los ratones recibirán tribenzoína (25 y 50 mg/kg de peso corporal/día) vía sonda. Se testarán las funciones motoras de los ratones (A, rodillo (rotarod); B, tiempo de movimiento; C, número de movimientos; D, tiempo de descanso; E, actividad horizontal; F, distancia total; G, cría; y H, estereotipia) 7 días después de la última inyección de MPTP. Los datos serán las medias + desviación estándar (SEM) de seis ratones por grupo.

En el futuro, el inventor describirá si el tratamiento con tribenzoína protege las neuronas del hipocampo y mejora la memoria y el aprendizaje en ratones 5XFAD, un modelo animal para la enfermedad de Alzheimer. En resumen, los ratones macho 5XFAD de seis meses de vida recibirán tribenzoína (25 y 50 mg/kg de peso corporal/día) vía sonda. Tras 30 días de tratamiento, los ratones se someterán a pruebas del laberinto de Barnes, laberinto T y reconocimiento de objetos nuevos. Se extraerán las conclusiones del análisis de al menos seis ratones por grupo. Las secciones del hipocampo también se etiquetarán para NeuN (marcador de neurona) y TUNEL (marcador de apoptosis). Los resultados representarán el análisis de dos secciones del hipocampo de cada uno de los seis ratones por grupo.

El inventor también confirmará la eficacia de la tribenzoína en los trastornos del ciclo de la urea. La hiperamonemia es una condición asociada a todos los trastornos del ciclo de la urea. Por consiguiente, se creará un modelo de ratón de hiperamonemia alimentando a los ratones con una dieta estándar suplementada con acetato de amonio (20% en peso) durante 3 meses. Después, los ratones serán tratados con diferentes dosis de tribenzoína (unos 100, 200 o 300 mg/kg de peso corporal/día) vía sonda, durante 30 días. Tras el tratamiento, se estudiarán los niveles de amonio, glutamina, urea y glicina en suero.

Todas las composiciones y métodos divulgados en el presente se pueden realizar y ejecutar sin experimentación indebida a la luz de la presente divulgación. Mientras que la invención reivindicada se puede materializar de muchas formas diferentes, en el presente documento se describen en detalle las realizaciones preferibles específicas de la invención. La presente divulgación es una ejemplificación de los principios de la invención y no pretende limitar la invención a las realizaciones particulares ilustradas. Además, salvo que se indique expresamente lo contrario, el uso del término "un" pretende incluir "al menos un" o "uno o más". Por ejemplo, "un compuesto" incluirá "al menos un compuesto" o "uno o más compuestos".

Todos los rangos indicados en términos absolutos o de forma aproximada pretenden abarcar ambos, y cualesquiera definiciones empleadas en el presente documento tienen por objeto aclarar y no limitar. Con independencia de que los intervalos y parámetros numéricos que explican el amplio alcance de la invención sean aproximaciones, los valores numéricos indicados en los ejemplos específicos se proporcionan de la forma más precisa posible. No obstante, cualquier valor numérico contiene de forma inherente ciertos errores resultantes necesariamente de la desviación estándar encontrada en sus respectivas mediciones de ensayo. Asimismo, se entenderá que todos los rangos divulgados aquí abarcan todos y cada uno de los subrangos (incluyendo todos los valores fraccionarios y enteros) incluidos en los mismos.

Asimismo, la invención abarca todas y cada una de las posibles combinaciones de parte o la totalidad de las diversas realizaciones descritas aquí. También debe entenderse que serán evidentes para los expertos en la técnica diversos cambios y modificaciones a las realizaciones preferidas descritas aquí. Estos cambios y modificaciones se podrán realizar sin desviarse del alcance de la invención, como se establece en las reivindicaciones adjuntas, y sin disminución de ventajas previstas.

LISTA DE SECUENCIAS

[0067]

5 <110> Pahan, Kalipada
<120> USO DE UNA COMPOSICIÓN QUE CONTIENE
BENZOATO EN TRASTORNOS DEL CICLO DE LA UREA
Y TRASTORNOS NEURODEGENERATIVOS

10 <130> 14904-87

<150> US 61/928,622

<151> 2014-01-17

15 <160> 8

<170> Versión patente 3.5

<210> 1

<211> 25

20 <212> DNA

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Tampón

25 <400> 1

cccttccgaa gtttctggca gcagc 25

<210> 2

<211> 25

30 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

35 <223> Tampón

<400> 2

ggctgtcaga gcctcgtggc tttag 25

<210> 3

<211> 21

40 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

45 <223> Tampón

<400> 3

ctccatgagc ttgtacaag g 21

50 <210> 4

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

55 <220>

<223> Tampón

<400> 4

60 tgctgatgta ccagttgggg 20

5 <210> 5
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Tampón
 10 <400> 5
 tggagagatt caccgaggag a 21
 <210> 6
 <211> 21
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Tampón
 20 <400> 6
 tgaagctcgt cggactctga g 21
 <210> 7
 <211> 20
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Tampón
 30 <400> 7
 ggtgaaggtc ggtgtgaacg 20
 <210> 8
 35 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 40 <223> Tampón
 <400> 8
 ttggctccac ccttcaagtg 20

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición farmacéutica que contiene tribenzoato de glicerilo y/o dibenzoato de glicerilo para el uso en un método para inhibir la progresión de un trastorno neurodegenerativo, donde dicho método comprende la administración a un paciente que pueda necesitarlo de una cantidad efectiva de dicha composición farmacéutica.
- 10 2. La composición farmacéutica para el uso de acuerdo con la reivindicación 1, donde en dicho método la composición farmacéutica se administra al paciente una vez al día.
3. La composición farmacéutica para el uso de acuerdo con la reivindicación 1, donde la composición farmacéutica está formulada junto con un portador o excipiente farmacéuticamente aceptable.
- 15 4. La composición farmacéutica para el uso de acuerdo con la reivindicación 1, donde en dicho método la composición farmacéutica se administra por vía oral.
- 20 5. La composición farmacéutica para el uso de acuerdo con la reivindicación 1, donde la composición farmacéutica está diseñada para ser utilizada en un método para inhibir la progresión de un trastorno neurodegenerativo y la cantidad efectiva oscila entre aproximadamente 1 y 5 gramos al día, para un paciente de 50 kilos de peso.
6. La composición farmacéutica para el uso de acuerdo con la reivindicación 1, donde la composición farmacéutica está diseñada para ser utilizada en un método para inhibir la progresión de un trastorno neurodegenerativo y la cantidad efectiva es aproximadamente de 1,25 gramos al día, para un paciente de 50 kilos de peso.
- 25 7. La composición farmacéutica para el uso de acuerdo con la reivindicación 1, donde el trastorno neurodegenerativo se selecciona del grupo compuesto por esclerosis múltiple, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Huntington, demencia, trastorno de pérdida de memoria y cualquier combinación de estos.

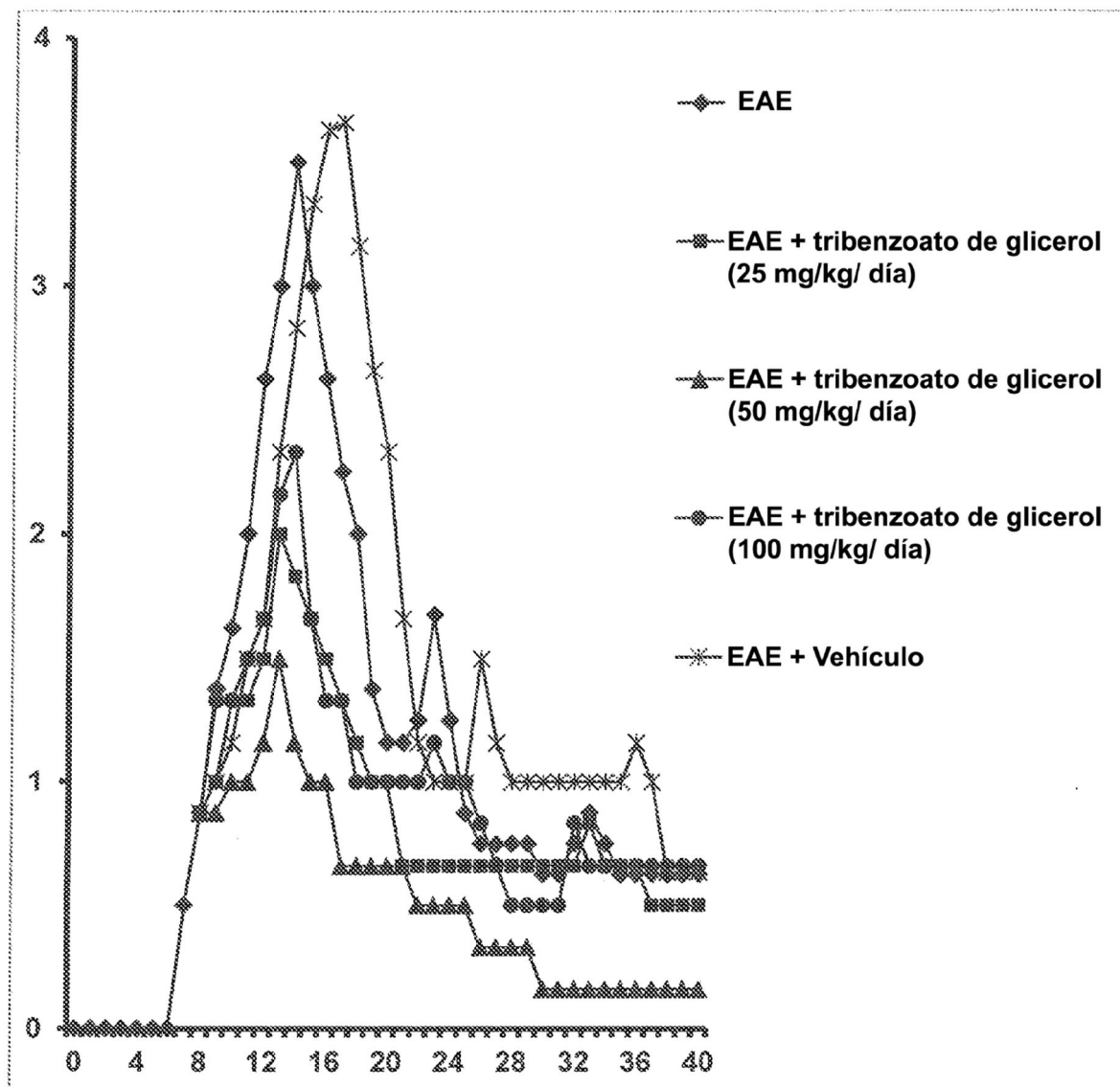


FIG. 1A

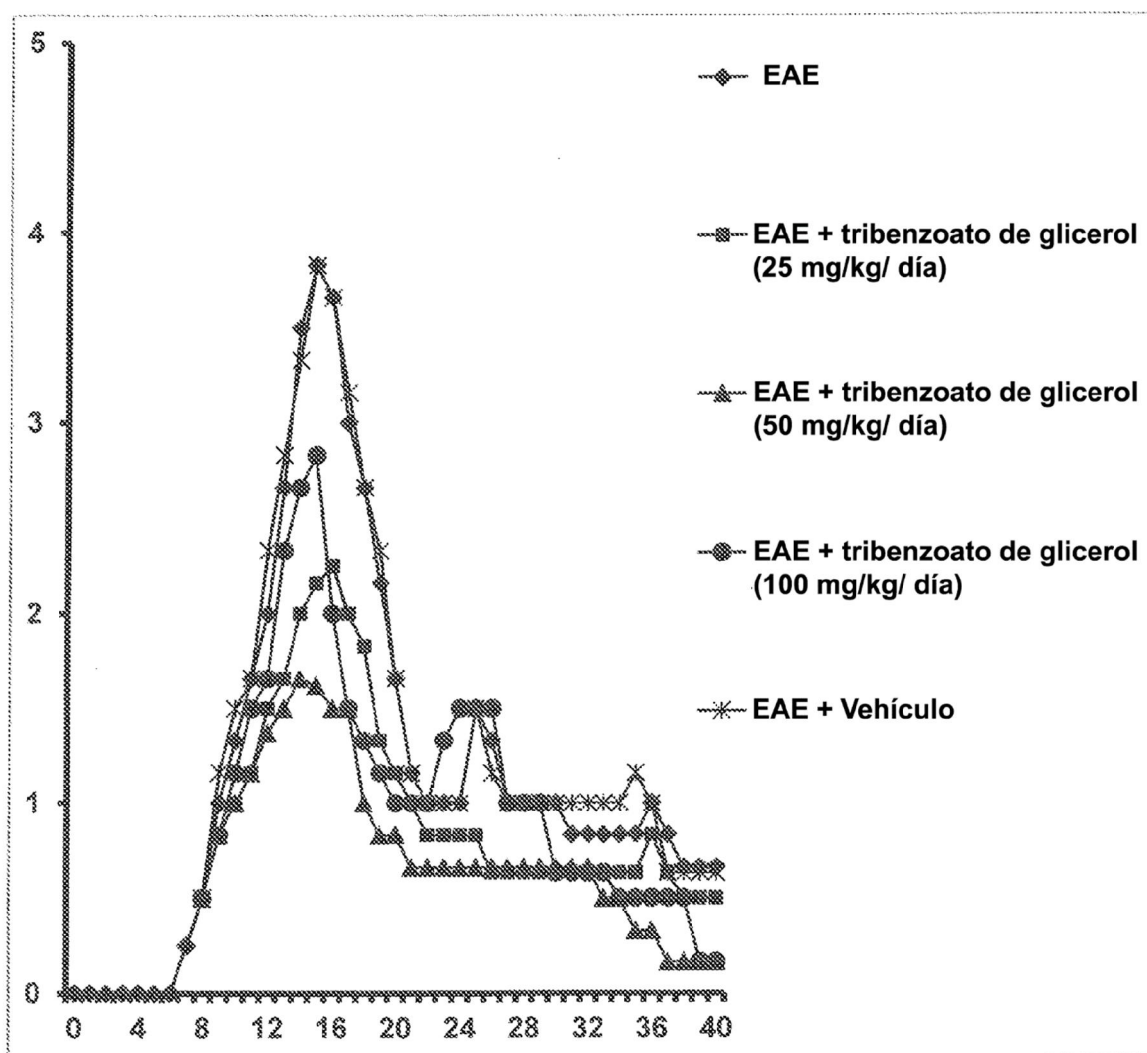


FIG. 1B

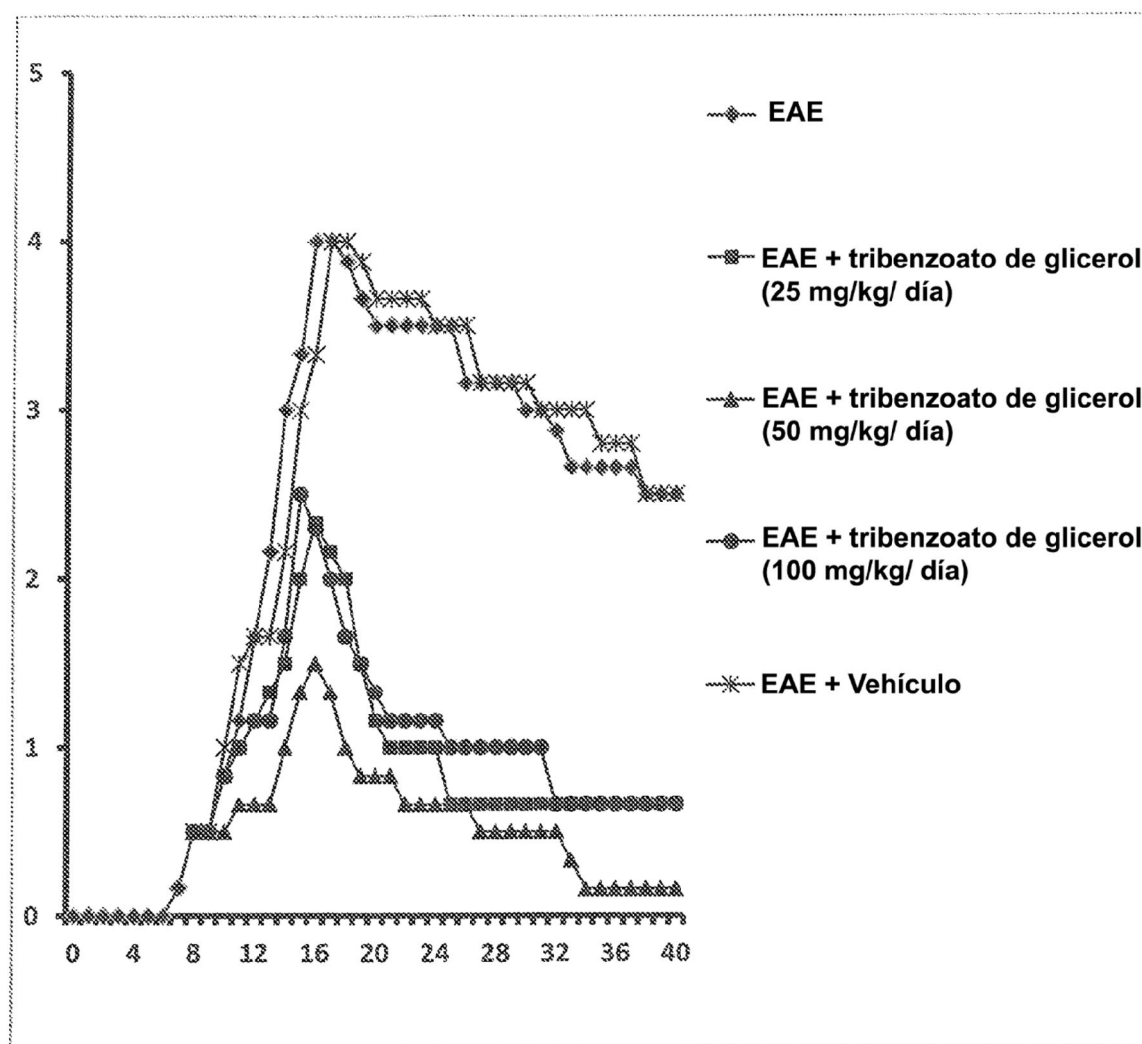


FIG. 1C

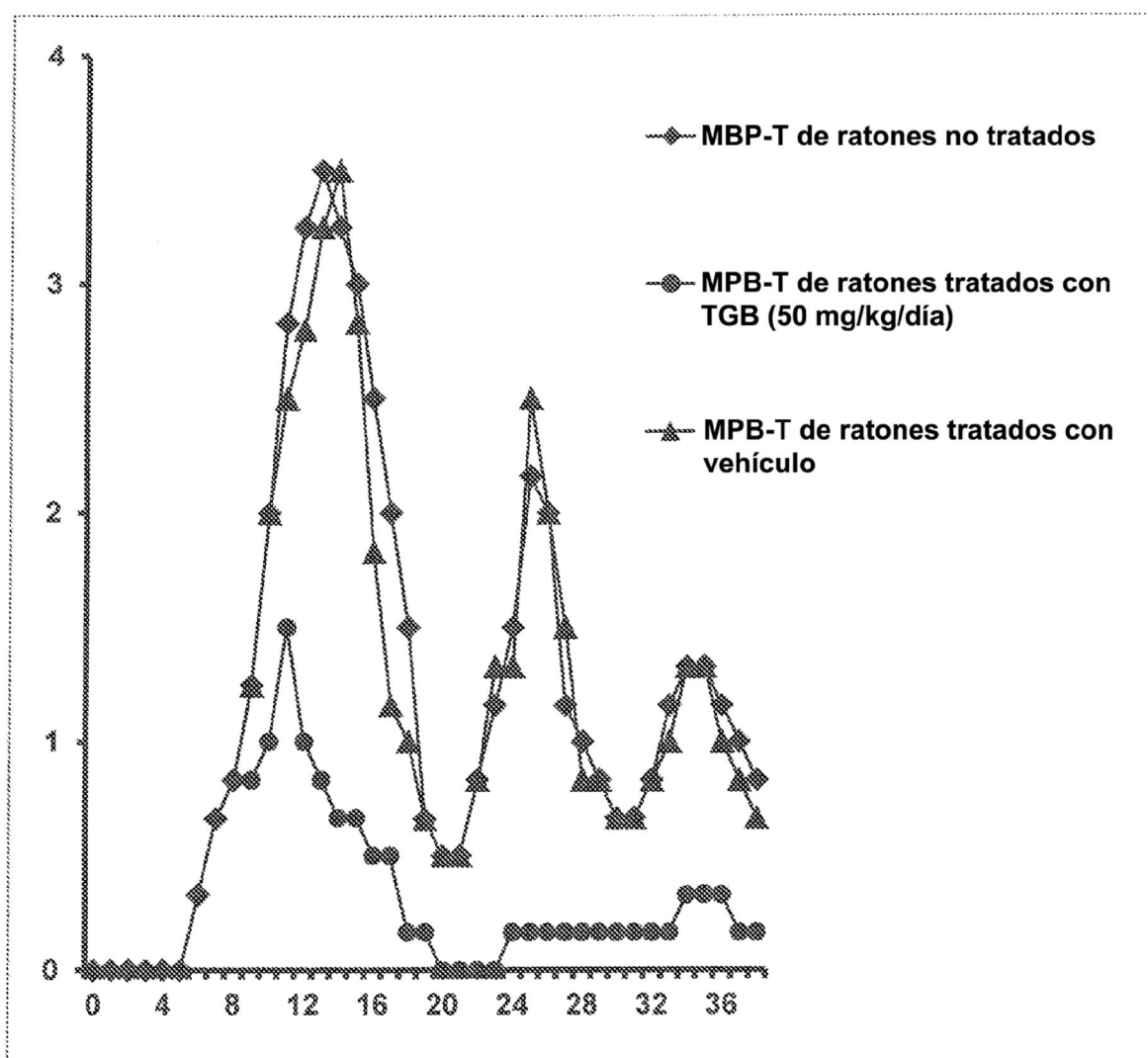


FIG. 2

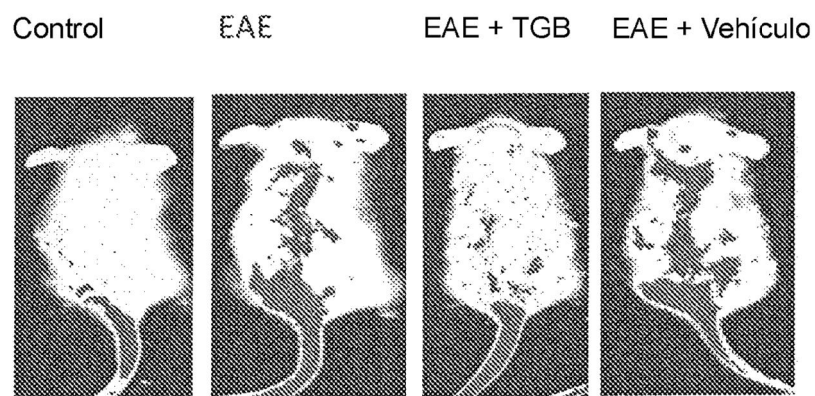


FIG. 3A

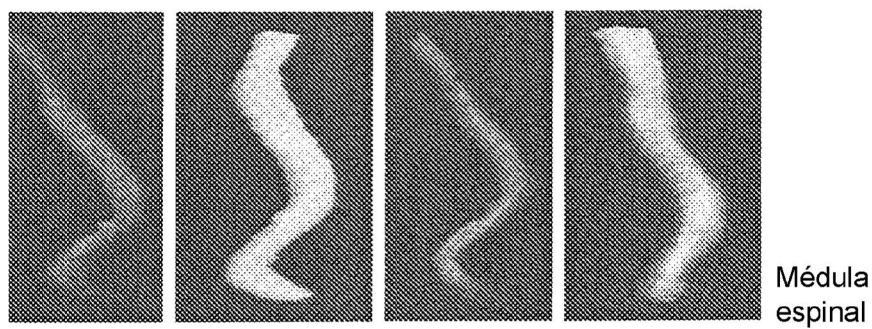


FIG. 3B

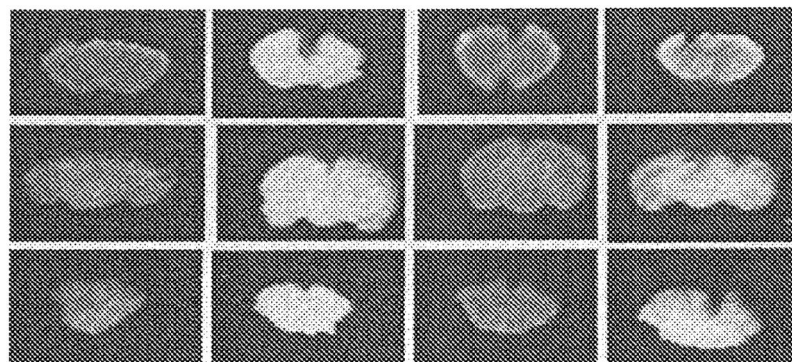


FIG. 3C

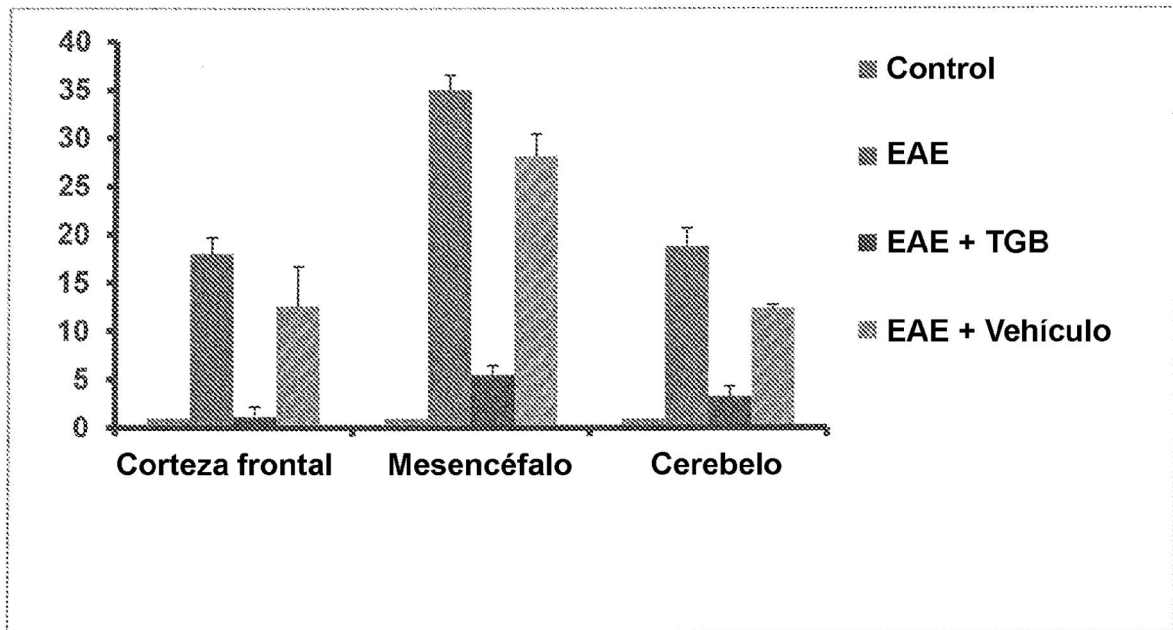
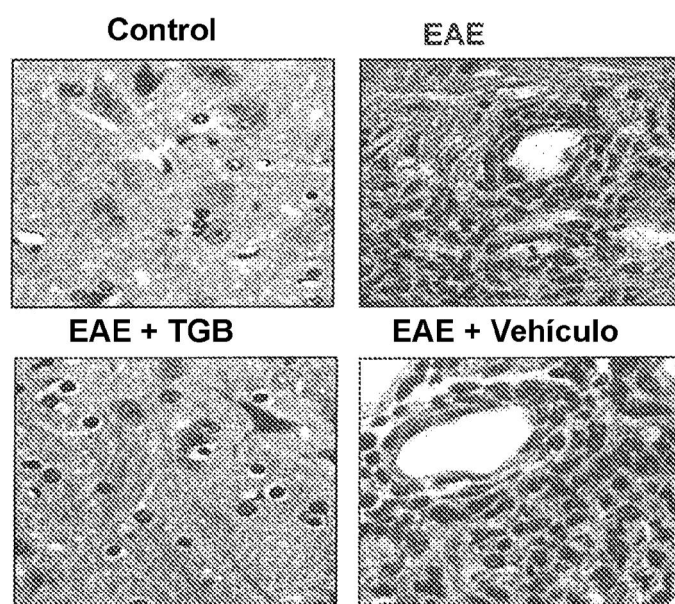


FIG. 3D



EAE	~	+	+	+
TGB	~	~	+	~
Vehículo	~	~	~	+

FIG. 4A

FIG. 4B

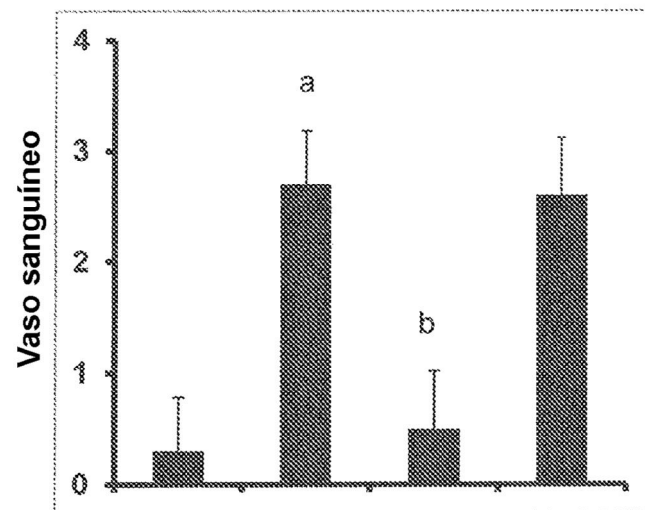
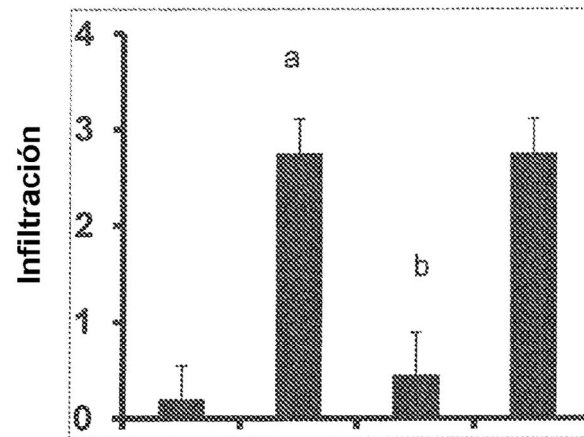
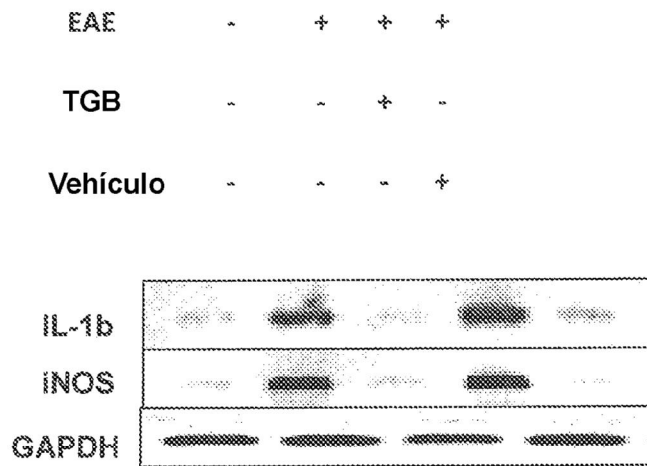


FIG. 4C

FIG. 4D



Expresión de ARNm en tiempo real

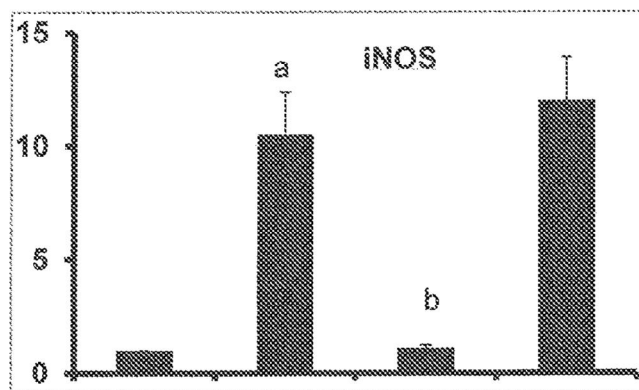
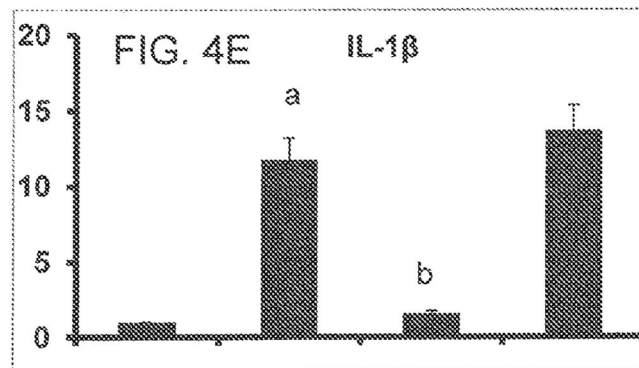


FIG. 4F

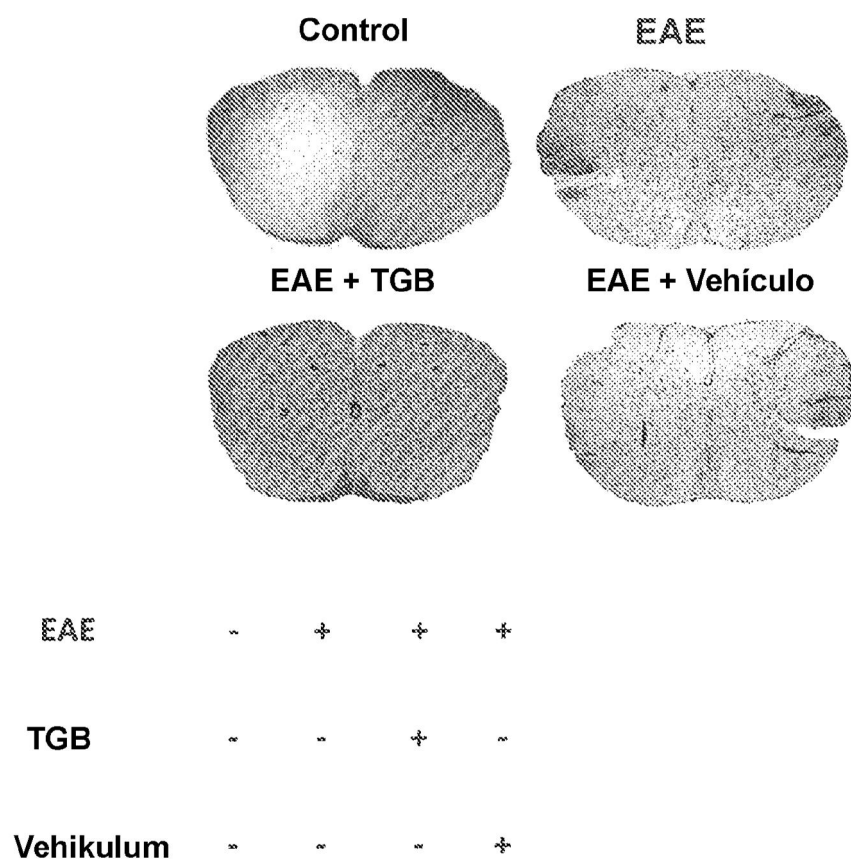


FIG. 5A

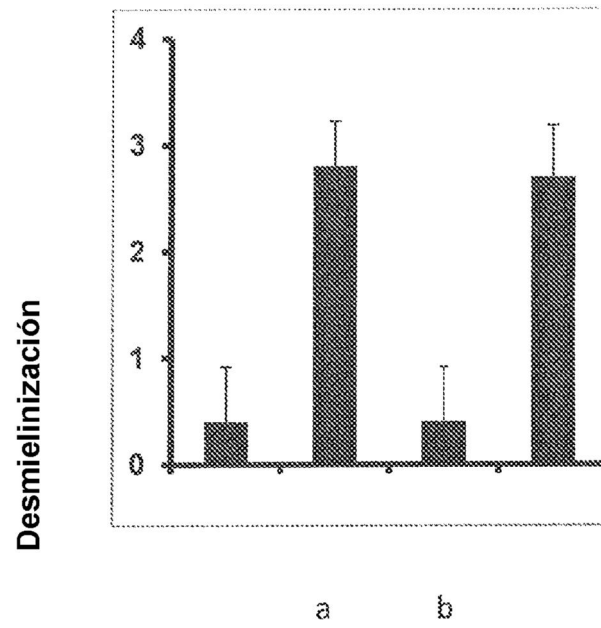


FIG. 5B

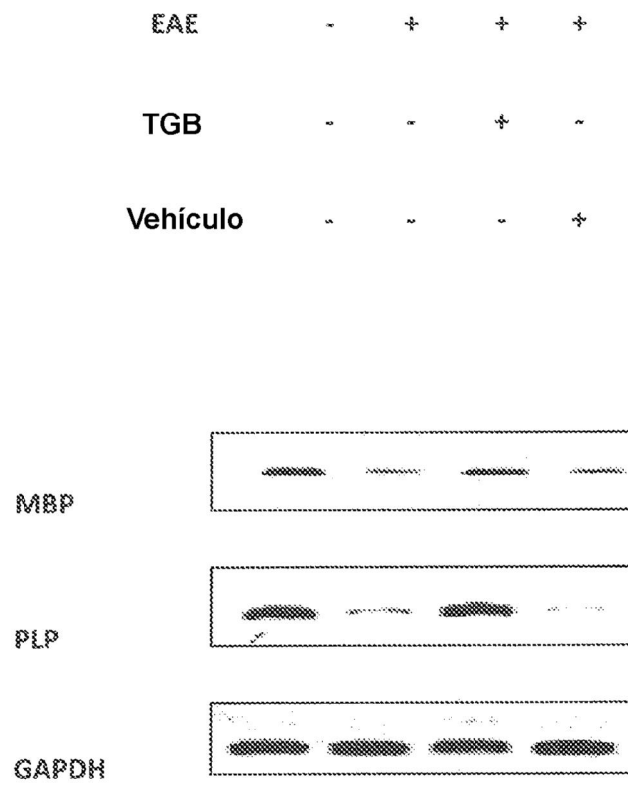
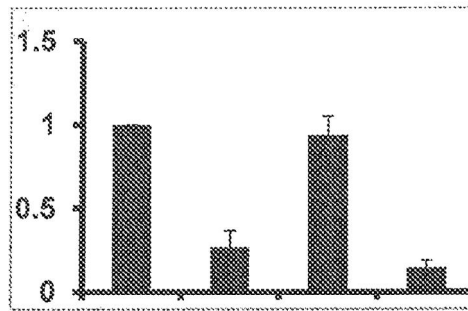


FIG. 5C

FIG. 5D

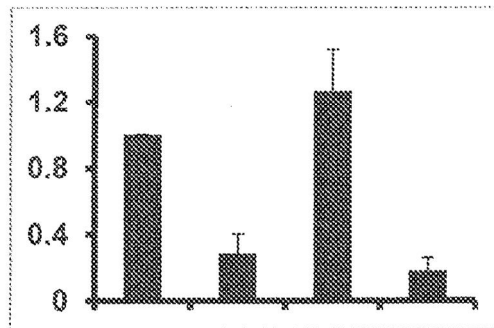
MBP

Expresión de ARNm en tiempo real



a

b



a

b

PLP

FIG. 5E

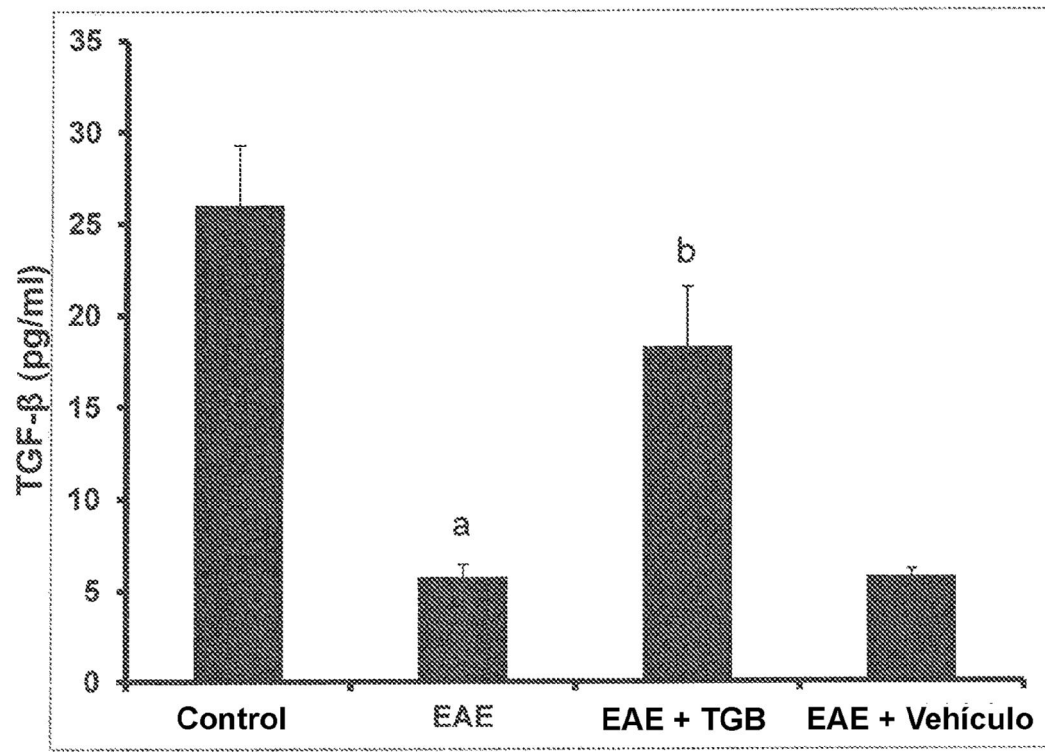


FIG. 6

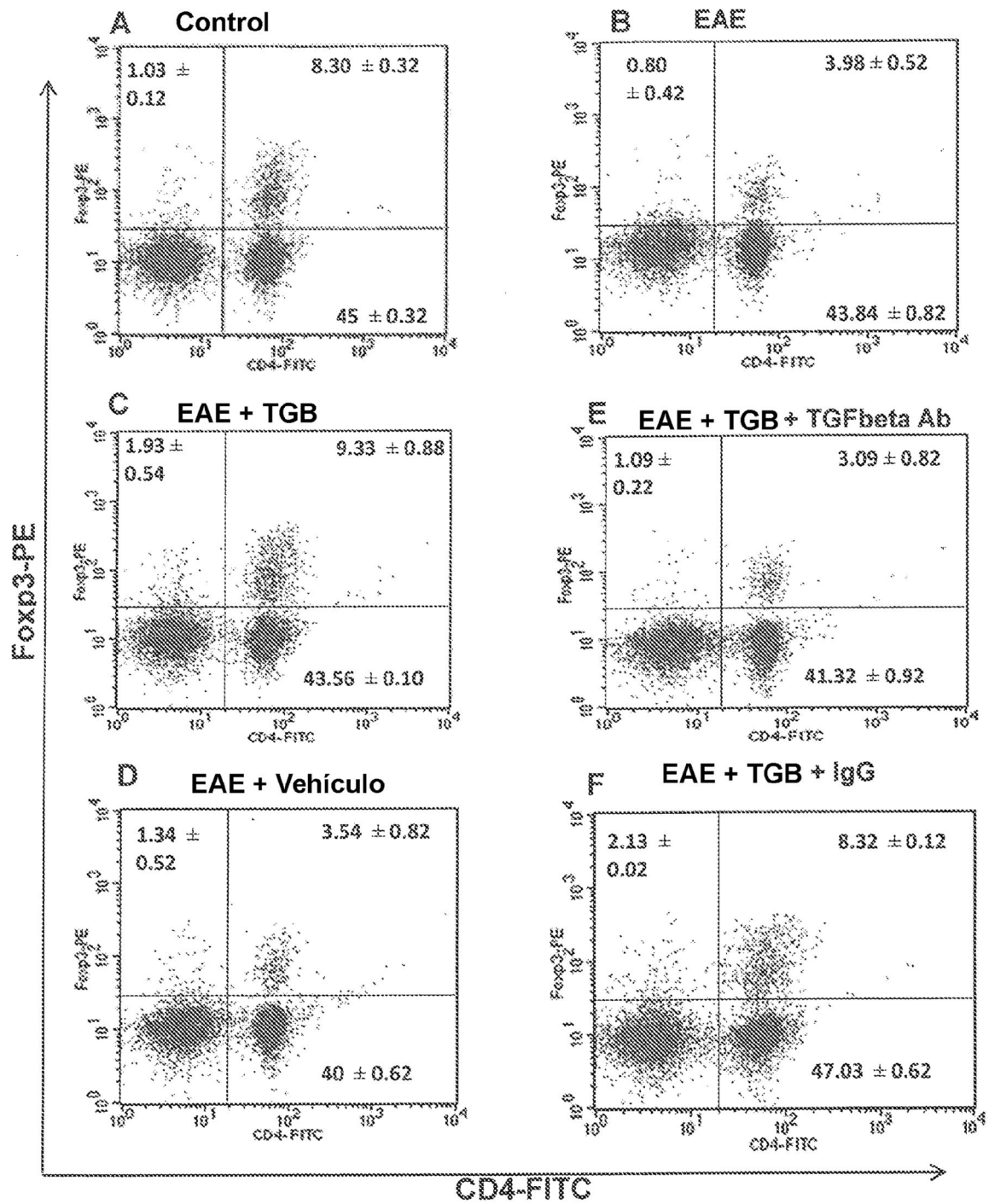


FIG. 7

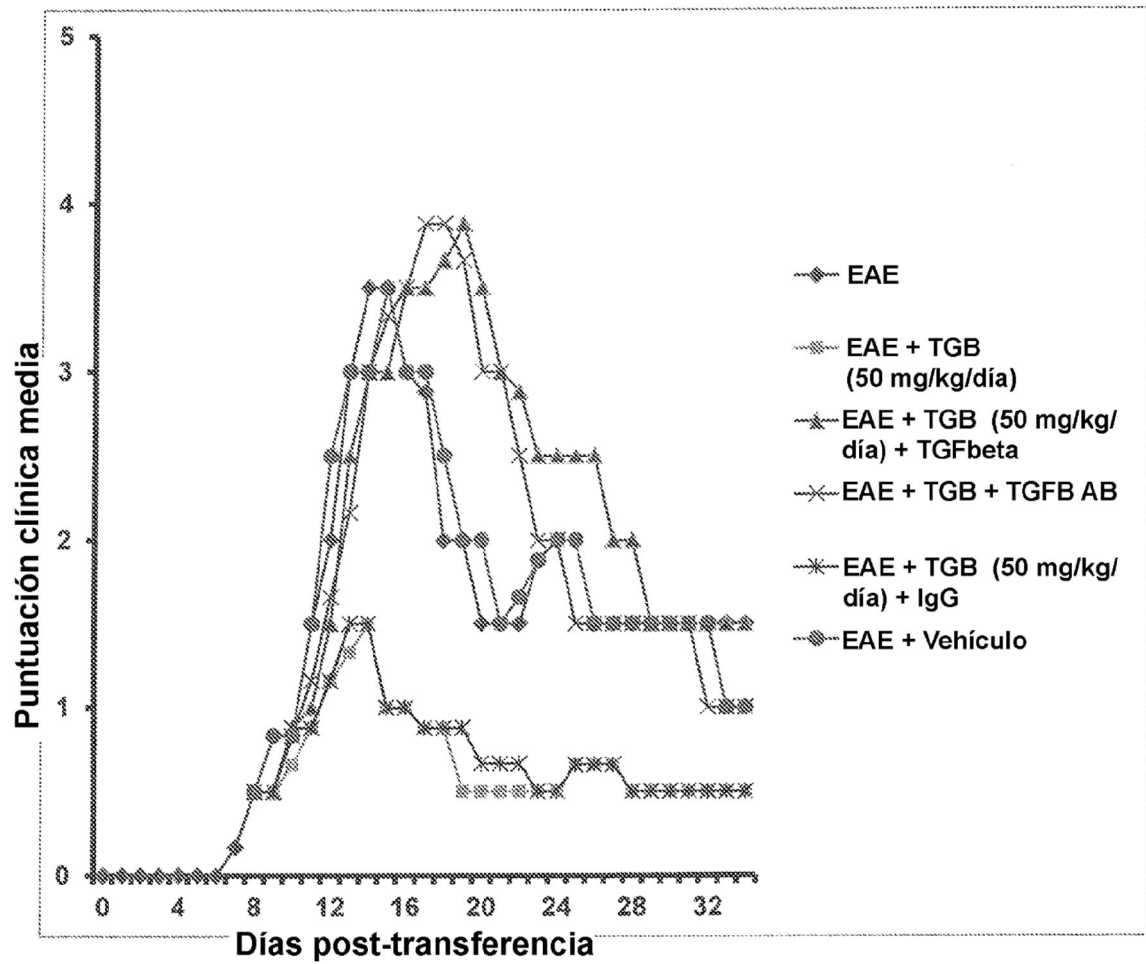


FIG. 8

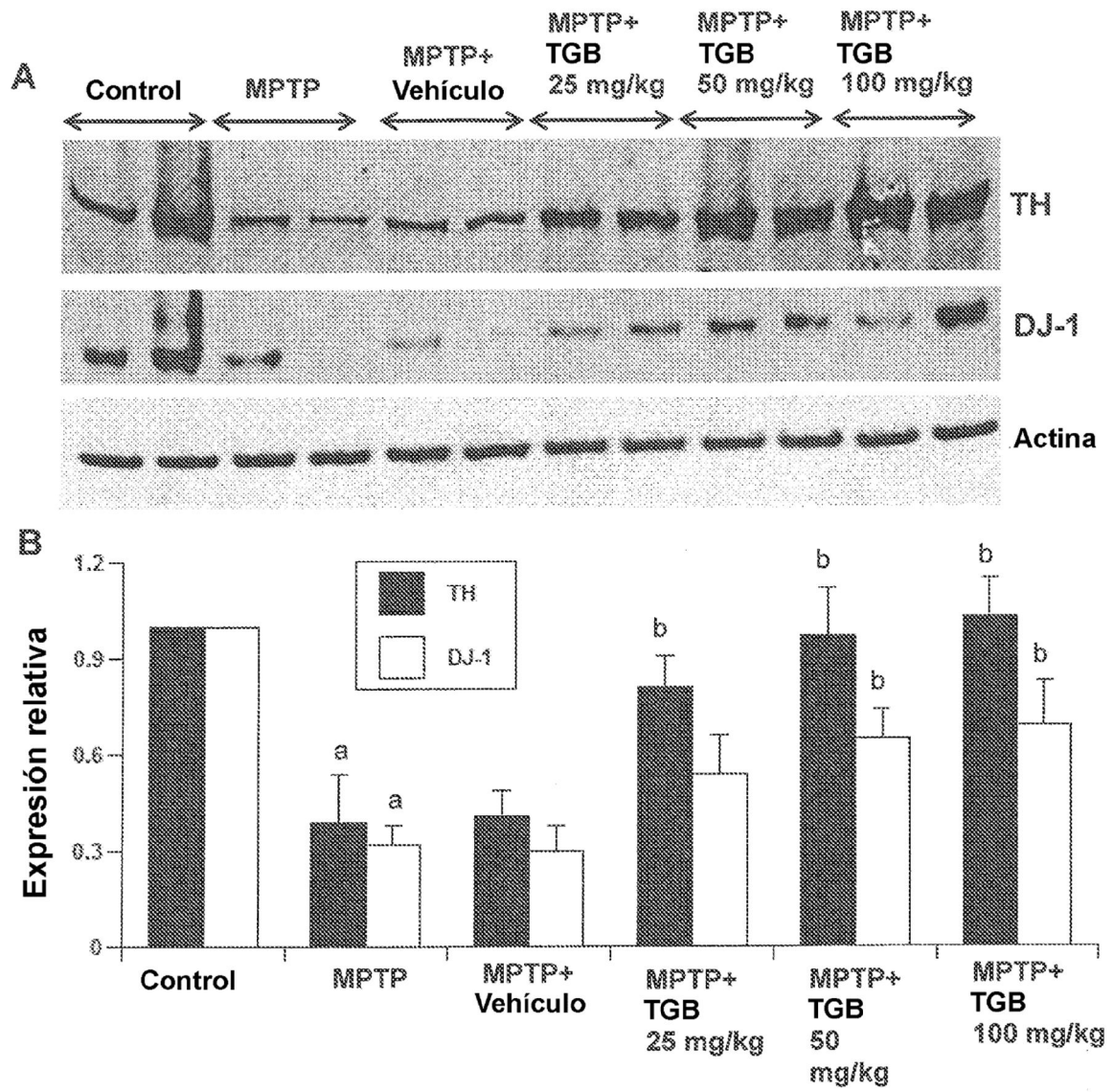


FIG. 9

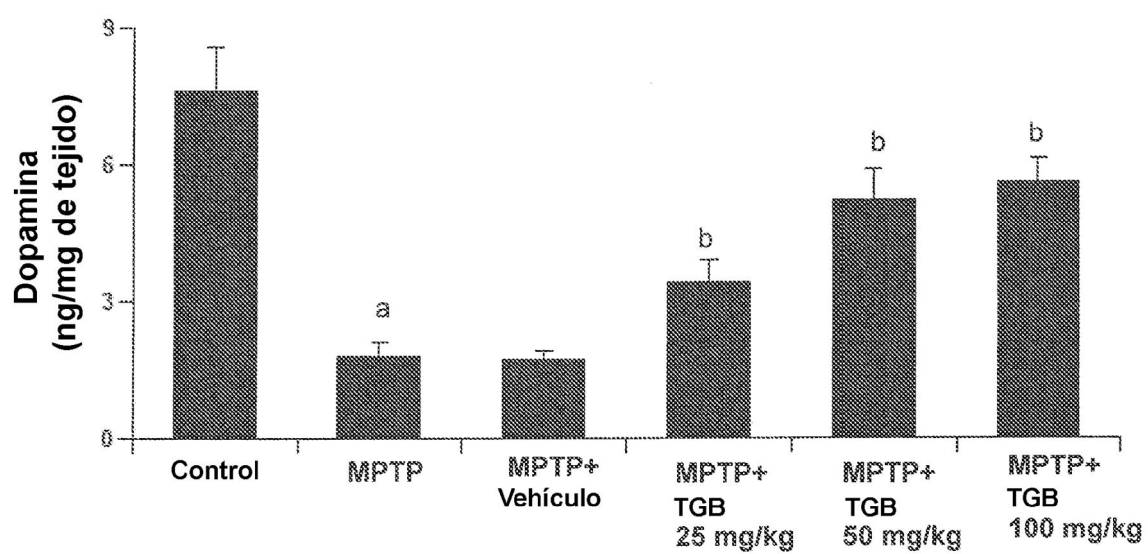


FIG. 10