



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS  
ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **3 006 014**

⑮ Int. Cl.:

**A61K 31/485** (2006.01)  
**A61P 25/00** (2006.01)  
**A61P 25/02** (2006.01)  
**A61P 25/28** (2006.01)

⑫

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑥ Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.03.2019 PCT/IB2019/051870**

⑦ Fecha y número de publicación internacional: **12.09.2019 WO19171333**

⑨ Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.03.2019 E 19765122 (7)**

⑩ Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.10.2024 EP 3761982**

---

④ Título: **Uso de nalfurafina para el tratamiento de enfermedades desmielinizantes**

⑩ Prioridad:

**08.03.2018 AU 2018900754**

④ Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**17.03.2025**

⑩ Titular/es:

**VICTORIA LINK LTD (50.00%)  
Level 9 Rankine Brown Building, Kelburn Parade  
Kelburn, Wellington 6012, NZ y  
UNIVERSITY OF KANSAS (50.00%)**

⑩ Inventor/es:

**KIVELL, BRONWYN MAREE;  
LA FLAMME, ANNE CAMILLE y  
PRISINZANO, THOMAS EDWARD**

⑩ Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

**ES 3 006 014 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 nalfurafina para el tratamiento de enfermedades desmielinizantes

### 1. DERECHOS DEL GOBIERNO DE LOS ESTADOS UNIDOS

Esta invención se realizó con el apoyo del gobierno en virtud del documento DA018151 otorgado por los Institutos Nacionales de Salud. El gobierno tiene ciertos derechos sobre la invención.

### 2. CAMPO TÉCNICO

La descripción se refiere en general a la nalfurafina (NalF) para su uso en la prevención y el tratamiento de enfermedades desmielinizantes, en particular, la esclerosis múltiple.

### 3. ANTECEDENTES

La vaina de mielina cubre importantes fibras nerviosas del sistema nervioso central y periférico de los mamíferos, lo que ayuda a facilitar la transmisión de los impulsos neuronales. Las enfermedades que afectan a la mielina interrumpen estas transmisiones nerviosas. La vaina de mielina en desarrollo puede verse afectada por trastornos metabólicos congénitos como la fenilcetonuria, la enfermedad de Tay-Sachs, la enfermedad de Niemann-Pick, el síndrome de Hurler y la enfermedad de Krabbe. La desmielinización también puede ocurrir en adultos como resultado de lesiones, trastornos metabólicos, ataques inmunitarios, isquemia y agentes tóxicos.

La desmielinización altera la conducción de las señales a los nervios afectados, lo que provoca una deficiencia de la sensibilidad, el movimiento, la cognición y otras funciones. La desmielinización del sistema nervioso central se asocia con la esclerosis múltiple (EM), la enfermedad de Devic, la encefalomielitis diseminada aguda, la adrenoleucodistrofia, la leucoencefalopatía y la atrofia óptica de Leber. La desmielinización del síntoma nervioso periférico da lugar a enfermedades como el síndrome de Guillain-Barré, la polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica, la enfermedad de Charcot Marie Tooth (CMT) y la neuropatía inflamatoria progresiva.

La esclerosis múltiple (EM) es la enfermedad desmielinizante más conocida y afecta a unos 2,5 millones de personas en todo el mundo. Los pacientes sufren una variedad de síntomas incluyendo fatiga, problemas de visión, entumecimiento, deterioro cognitivo, incontinencia, falta de equilibrio y debilidad muscular, que en última instancia conducen a parálisis. La EM puede seguir cuatro cursos principales de enfermedad, cada uno de los cuales puede ser leve, moderado o grave:

1. Esclerosis múltiple recurrente-remitente (RRMS): ataques claramente definidos (brotes) de empeoramiento de la función neurológica seguidos de una remisión parcial o completa
2. Esclerosis múltiple primaria progresiva (PPMS): empeora lentamente la función neurológica a tasas variables, sin remisión clara
3. Esclerosis múltiple de progresión secundaria (SPMS): un período inicial de EMRR va seguido de un empeoramiento constante, con o sin brotes y remisiones
4. Esclerosis múltiple recidivante progresiva (PRMS): empeoramiento constante de la función neurológica con brotes claros y remisión parcial o nula.

Si bien no existe una cura para la esclerosis múltiple, muchos medicamentos aprobados por la FDA, como el interferón beta y el acetato de glatirámero, se utilizan para reducir las tasas de recaída y la formación de nuevas lesiones. Desafortunadamente, los tratamientos actuales no tienen mucho éxito en la prevención de la discapacidad asociada con la EM y tienen más éxito en el tratamiento de la EMRR que otros tipos. Por ejemplo, los medicamentos actuales no pueden detener o revertir la progresión de la enfermedad y la discapacidad. Es evidente que se necesitan tratamientos alternativos para la EM.

Mei Feng et al., The Journal of Neuroscience, vol. 36, n.º 30 (2016), págs. 7925-7935, describen la identificación del receptor opioide kappa como diana terapéutica para la remielinización de los oligodendrocitos.

Wikström B. et al., Journal of the American Society Nephrology, vol. 16, n.º 12 (2005), págs. 3742-3747, describen un estudio clínico del sistema opioide K en el prurito urémico.

Kumagai H et al., Nephrology Dialysis Transplantation, vol. 25 (2010), págs. 1251 - 1257, describen el efecto del clorhidrato de nalfurafina sobre la picazón intensa en pacientes en hemodiálisis.

Por lo tanto, un objeto de la presente invención es contribuir al menos en cierta medida a satisfacer esta necesidad en la técnica, proporcionar productos para su uso en el tratamiento de la discapacidad asociada a la EM y/o que puedan detener y/o revertir la progresión y la discapacidad de la enfermedad de la EM y/o al menos proporcionar al público una opción útil.

#### 4. SUMARIO DE LA INVENCIÓN

Todas las referencias a procedimientos de tratamiento en esta especificación deben interpretarse como referencia a los compuestos, composiciones farmacéuticas y medicamentos de la presente invención para su uso en un procedimiento de tratamiento del cuerpo humano o animal mediante terapia.

5 La invención se define en las reivindicaciones.

En un aspecto, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende nalfurafina para su uso en el tratamiento de una enfermedad desmielinizante en un sujeto que la necesite.

10 En otro aspecto, la invención proporciona formas de dosificación unitaria que comprenden de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 5 mg de nalfurafina y al menos un portador o excipiente farmacéuticamente aceptable. En una realización, la forma de dosificación unitaria comprende de 0,05 a aproximadamente 2,0 mg de nalfurafina y al menos un portador o excipiente farmacéuticamente aceptable. En una realización, la forma de dosificación unitaria comprende aproximadamente 0,15 a aproximadamente 0,6 mg de nalfurafina y al menos un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.

15 Se describe un procedimiento para tratar una enfermedad desmielinizante en un sujeto que comprende identificar a un sujeto que se beneficiaría de un nivel reducido de desmielinización y administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente que disminuya el nivel de desmielinización en el sujeto en relación con el nivel de desmielinización antes de administrar el agente, en donde el agente comprende nalfurafina.

20 Se describe además un procedimiento para tratar una enfermedad desmielinizante en un sujeto que lo necesite, que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente que disminuye el nivel de desmielinización en el sujeto en relación con el nivel de desmielinización antes de administrar el agente, en donde el agente comprende nalfurafina.

Se describe además un procedimiento para aumentar la remielinización en un sujeto que lo necesite, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de nalfurafina al sujeto.

25 Se describe además un procedimiento para aumentar la remielinización en un sujeto que comprende identificar un sujeto que se beneficiaría de un mayor nivel de remielinización y administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente que aumenta el nivel de remielinización en el sujeto en relación con el nivel de remielinización antes de administrar el agente, en donde el agente comprende nalfurafina.

30 Se describe además un procedimiento para aumentar la remielinización en un sujeto que lo necesita, que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente que aumenta el nivel de remielinización en el sujeto en relación con el nivel de remielinización antes de administrar el agente, en donde el agente comprende nalfurafina.

Se describe además el uso de la nalfurafina en la fabricación de un medicamento para tratar una enfermedad desmielinizante en un sujeto que lo necesite.

35 Se describe además un uso de nalfurafina en la fabricación de un medicamento para aumentar la remielinización en un sujeto que lo necesita.

La invención también proporciona nalfurafina para su uso en el tratamiento de una enfermedad desmielinizante.

La invención también proporciona nalfurafina para su uso para aumentar la remielinización.

En una realización, la enfermedad es una enfermedad mielinoclástica desmielinizante.

En una realización, la enfermedad es una enfermedad leucodistrófica desmielinizante.

40 En una realización, la enfermedad desmielinizante es una enfermedad desmielinizante del sistema nervioso central. En una realización, la enfermedad desmielinizante del sistema nervioso central se selecciona del grupo que comprende la EM (incluyendo el síndrome clínicamente aislado CIS [clinically isolated syndrome]), la neuritis óptica, la enfermedad de Devic, las enfermedades desmielinizantes inflamatorias, las neuropatías del sistema nervioso central, las mielopatías como la Tabes dorsalis, las leucoencefalopatías, las leucodistrofias o una combinación de las mismas.

45 En una realización, la enfermedad desmielinizante es la EM.

En otra realización, la enfermedad desmielinizante es una enfermedad desmielinizante del sistema nervioso periférico. En una realización, la enfermedad desmielinizante del sistema nervioso periférico se elige del grupo que comprende el síndrome de Guillain-Barré y su homólogo crónico, la polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica, la neuropatía periférica con glicoproteínas asociadas a la antimielina (MAG), la enfermedad de Charcot Marie Tooth (CMT), la deficiencia de cobre y la neuropatía inflamatoria progresiva.

Se describe además un procedimiento para atenuar la desmielinización en un sujeto que lo necesite, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de nalfurafina al sujeto y atenuar así el nivel de desmielinización en el sujeto en relación con el nivel de desmielinización cuando no se administra nalfurafina.

La invención también proporciona nalfurafina para su uso para atenuar la desmielinización en un sujeto que lo necesite.

5 Se describe además un procedimiento para tratar la EM en un sujeto que lo necesite, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de nalfurafina al sujeto.

Se describe además un procedimiento para tratar la EM en un sujeto que lo necesite, que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente que disminuya el nivel de desmielinización en el sujeto en relación con el nivel antes de administrar el agente y/o que aumente el nivel de remielinización en el sujeto en relación con el nivel antes de administrar el agente, en donde el agente comprende nalfurafina.

10 La invención también proporciona nalfurafina para su uso en el tratamiento de la EM en un sujeto que la necesite.

En una realización, el sujeto tiene RRMS. En una realización, el sujeto tiene PPMS. En una realización, el sujeto tiene, o se le diagnostica, SPMS. En una realización, el sujeto tiene, o se le diagnostica, PRMS. En una realización, el sujeto tiene, o se le diagnostica que tiene, el síndrome clínicamente aislado (CIS).

15 En una realización, el tratamiento de la EM produce uno o más resultados clínicos en comparación con los sujetos no tratados con nalfurafina seleccionados del grupo que consiste en:

(a) una disminución de la progresión de la EM;

(b) una disminución de la gravedad de la EM;

(c) una disminución de la desmielinización de las células nerviosas;

20 (d) una disminución de la frecuencia o gravedad de los ataques de EM recidivantes;

(e) una disminución de los síntomas clínicos de la EM;

(f) la curación del tejido nervioso dañado (neurorestauración);

(g) un aumento de la remielinización de los nervios desmielinizados del sistema nervioso central (neurorestauración/protección);

25 (h) la protección del tejido nervioso dañado contra una mayor actividad patológica (neuroprotección);

(i) la promoción del crecimiento neuronal (neuroregeneración) en el sistema nervioso central;

(j) una disminución de la discapacidad causada por la EM;

(k) una mejora de la función nerviosa; y

(l) una mayor tasa de remisión.

30 En otra realización, el tratamiento de la EM da como resultado una reducción de uno o más síntomas clínicos de la EM incluidos, entre otros, pérdida de sensibilidad o cambios en la sensibilidad, como hormigueo, alfileres y agujas o entumecimiento, debilidad muscular o parálisis de gravedad variable, reflejos muy pronunciados, espasmos musculares o dificultad para moverse; dificultades de coordinación y equilibrio (ataxia); espasticidad; problemas para hablar o tragar, problemas visuales (nistasmo, neuritis óptica o visión doble), fatiga, dolor agudo o crónico, dolor neuropático, ( neuralgia del trigémino), dificultades vesicales e intestinales, incontinencia, disminución de la capacidad cognitiva, depresión, ansiedad y otras anomalías emocionales, disfunción sexual, fenómeno de Uhthoff (empeoramiento de los síntomas debido a la exposición a temperaturas más altas de lo normal) y signo de Lhermitte (una sensación eléctrica que recorre la espalda al doblar el cuello).

35 Se describe además un procedimiento para acelerar la remisión de la EM en un sujeto que lo necesite, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de nalfurafina al sujeto.

Se describe además un procedimiento para acelerar la remisión de la EM en un sujeto que lo necesite, que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente que disminuya el nivel de desmielinización en el sujeto en relación con el nivel de desmielinización antes de administrar el agente, en donde el agente comprende nalfurafina.

40 Se describe además un procedimiento para acelerar la remisión de la EM en un sujeto que lo necesite, que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente que aumente el nivel de remielinización en el sujeto en relación con el nivel de remielinización antes de administrar el agente, en donde el agente comprende nalfurafina.

Se describe un procedimiento para tratar una enfermedad desmielinizante en un sujeto que comprende identificar a un sujeto que se beneficiaría de un nivel reducido de desmielinización y administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente que disminuya el nivel de desmielinización en el sujeto en relación con el nivel de desmielinización antes de administrar el agente, en donde el agente comprende nalfurafina.

5 Se describe además un procedimiento para aumentar la remielinización en un sujeto que comprende identificar un sujeto que se beneficiaría de un mayor nivel de remielinización y administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente que aumenta el nivel de remielinización en el sujeto en relación con el nivel de remielinización antes de administrar el agente, en donde el agente comprende nalfurafina.

En los procedimientos y compuestos anteriores para su uso:

10 En una realización, la cantidad terapéuticamente eficaz para un sujeto es equivalente a una dosis de aproximadamente 0,003 a aproximadamente 0,3 mg/kg/día en ratones.

15 En una realización, el sujeto es un ser humano. En una realización, el procedimiento comprende administrar de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 5 µg de nalfurafina al día, de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 4 µg, de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 3 µg, de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 2,5 µg, de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 2 µg, de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 1,5 µg, de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 1 µg, de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 0,75 µg, de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 0,5 µg, o aproximadamente 0,25 µg de nalfurafina al día.

En algunas realizaciones, el procedimiento comprende administrar menos de aproximadamente 1 µg de nalfurafina, preferiblemente menos de 1 µg de nalfurafina al día.

20 En algunas realizaciones, el procedimiento comprende una terapia de larga duración.

En algunas realizaciones, la terapia de larga duración comprende la administración de una dosis terapéuticamente eficaz de nalfurafina a un sujeto que la necesite durante al menos 5 días, al menos 6 días o al menos 7 días.

25 En algunas realizaciones, una terapia de larga duración comprende la administración de una dosis terapéuticamente eficaz de nalfurafina a un sujeto que la necesite durante al menos una semana, al menos 2 semanas, al menos 3 semanas, al menos 4 semanas, al menos 6 semanas o al menos 8 semanas.

En algunas realizaciones, la terapia de larga duración comprende la administración durante al menos 5 días, al menos 6 días, al menos 7 días, al menos 14 días, al menos 21 días, al menos 28 días, al menos 35 días, al menos 42 días, al menos 45 días, al menos 60 días, al menos 120 días, al menos 240 días o al menos 360 días.

En algunas realizaciones, la terapia de larga duración comprende un intervalo de dosificación de al menos 1 día.

30 Otros aspectos de la invención pueden resultar evidentes a partir de la siguiente descripción, que se proporciona únicamente a modo de ejemplo y con referencia a las figuras adjuntas.

35 En esta memoria descriptiva, cuando se ha hecho referencia a especificaciones de patentes, otros documentos externos u otras fuentes de información, esto es generalmente con el propósito de proporcionar un contexto para analizar las características de la invención. A menos que se indique específicamente lo contrario, la referencia a dichos documentos externos no debe interpretarse como una admisión de que dichos documentos, o dichas fuentes de información, en cualquier jurisdicción, son técnica anterior o forman parte del conocimiento general común en la materia.

40 Se pretende que la referencia a un intervalo de números descrito en esta invención (por ejemplo, del 1 al 10) también incorpore la referencia a todos los números racionales dentro de ese intervalo (por ejemplo, 1, 1,1, 2, 3, 3,9, 4, 5, 6, 6,5, 7, 8, 9 y 10) y también a cualquier intervalo de números racionales dentro de ese intervalo (por ejemplo, 2 a 8, 1,5 a 5,5 y 3,1 a 4,7) y, por lo tanto, todos los subintervalos de todos Los intervalos descritos expresamente en esta invención se describen expresamente por la presente. Estos son solo ejemplos de lo que se pretende específicamente y se debe considerar que todas las combinaciones posibles de valores numéricos entre el valor más bajo y el valor más alto enumerados se indican expresamente en esta solicitud de manera similar.

45 Siempre que se dé un intervalo en la especificación, por ejemplo, un intervalo de temperatura, un intervalo de tiempo o un intervalo de composición, se pretende incluir en la descripción todos los intervalos y subintervalos intermedios, así como todos los valores individuales incluidos en los intervalos dados. En la descripción y las reivindicaciones, "y/o" significa adicional o alternativamente. Además, cualquier uso de un término en singular también abarca formas plurales.

## 50 5. BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La invención se describirá, a modo de ejemplo únicamente, con referencia a los dibujos, donde:

**La Figura 1** es un gráfico que muestra la progresión de la enfermedad en ratones que tienen encefalomielitis

autoinmune experimental (EAE) durante 45 días, en donde los ratones del Ejemplo 1 se trajeron con 0,01, 0,03, 0,1 o 0,3 mg/kg de nalfurafina diariamente desde el inicio (día 17).

5 **La Figura 2** son dos gráficos que muestran la discapacidad total de los ratones con EAE durante (A) 45 días y (B) 18 días en donde los ratones del Ejemplo 2 se trajeron con 0,03, 0,1 o 0,3 mg/kg de nalfurafina diariamente desde el inicio (día 17).

10 **La Figura 3** es un gráfico que muestra el % de cambio de peso de los ratones con EAE en el Ejemplo 3 durante 45 días en donde los ratones se trajeron con 0,03, 0,1 o 0,3 mg/kg de nalfurafina diariamente desde el inicio (día 17).

15 **La Figura 4** son tres gráficos que muestran la infiltración de células inmunitarias en el cerebro de ratones con EAE en el Ejemplo 4 después de 45 días. en donde los ratones se trajeron con 0,03, 0,1 o 0,3 mg/kg de nalfurafina diariamente desde el inicio (día 17).

20 **La Figura 5** es un gráfico que muestra la progresión de la enfermedad en ratones con EAE en el Ejemplo 5 durante 45 días, en donde los ratones que aún no habían desarrollado EAE se trajeron con 0,03, 0,1 o 0,3 mg/kg de nalfurafina diariamente desde el inicio (día 17).

25 **La Figura 6** es una serie de imágenes de microscopio electrónico de transmisión (TEM) de secciones de médula espinal de ratones con EAE en el Ejemplo 6 después de 45 días, en donde los ratones se trajeron con 0,03 mg/kg de nalfurafina diariamente desde el inicio (día 17).

30 **La Figura 7** es un gráfico que muestra el aumento de peso durante 65 días de los ratones del Ejemplo 7 tratados con cuprizona al 0,3 % durante 5 semanas, en donde los ratones se trajeron con 0,1 mg/kg de nalfurafina diariamente a partir de la semana 4.

35 **La Figura 8** es un gráfico que muestra la puntuación de rendimiento en el rotarod de los ratones del Ejemplo 8 a las 9 semanas tratados con cuprizona durante 5 semanas, en donde los ratones se trajeron con 0,1 mg/kg de nalfurafina diariamente a partir de la semana 4.

40 **La Figura 9** es una serie de imágenes TEM del cuerpo caloso de ratones del Ejemplo 9 a las 9 semanas tratados con cuprizona durante 5 semanas, en donde los ratones se trajeron con 0,1 mg/kg de nalfurafina diariamente a partir de la semana 4.

45 **La Figura 10** muestra que la nalfurafina promueve la recuperación funcional de la parálisis cuando se administra terapéuticamente (al inicio de la enfermedad) en el modelo experimental de encefalomielitis autoinmune (EAE) de EM.

50 **La Figura 11** muestra que la nalfurafina no es eficaz cuando se administra terapéuticamente como un ciclo corto de 4 días que comienza con el inicio de la enfermedad en el modelo EAE de la EM.

**La Figura 12** muestra que la nalfurafina no altera el pico de la enfermedad cuando se administra terapéuticamente en el modelo EAE de EM.

55 **La Figura 13** muestra que la nalfurafina promueve la recuperación total de la parálisis inducida por EAE cuando se administra terapéuticamente.

**La Figura 14** muestra que la nalfurafina promueve la recuperación total de la parálisis inducida por EAE cuando se administra terapéuticamente con una EC50 para un % de recuperación de <0,001 mg/kg.

60 **La Figura 15** muestra que la nalfurafina promueve la recuperación sostenida de la parálisis inducida por EAE cuando se administra terapéuticamente.

**La Figura 16** muestra que la nalfurafina también promueve la recuperación funcional de la parálisis en ratones machos cuando se administra terapéuticamente en el modelo EAE de EM.

65 **La Figura 17** muestra que la nalfurafina también promueve la recuperación total en ratones machos cuando se administra terapéuticamente en el modelo EAE de EM.

70 **La Figura 18** muestra que la nalfurafina promueve la recuperación sostenida en ratones machos de la parálisis inducida por EAE cuando se administra terapéuticamente.

75 **La Figura 19** muestra que la nalfurafina reduce la infiltración de células inmunitarias en el cerebro cuando se administra terapéuticamente en el modelo EAE de la EM (A), mientras que U 50488 no lo hace (B).

80 **La Figura 20** muestra que la mielinización mejora en ratones tratados con nalfurafina después del inicio de la parálisis en el modelo EAE de EM.

La Figura 21 muestra que la nalfurafina no altera la proporción de las principales poblaciones de linfocitos en el bazo durante la fase crónica de EAE.

La Figura 22 muestra que la nalfurafina no altera el número total de células T auxiliares CD4 en el bazo, sino que desplaza las células T CD4 de un fenotipo efector a un fenotipo de memoria, lo que sugiere una resolución inmunitaria durante la fase crónica de la EAE.

La Figura 23 muestra que la nalfurafina reduce la enfermedad pero no permite la recuperación completa cuando el receptor opioide kappa (KOR) está bloqueado.

La Figura 24 muestra que la activación del KOR es necesaria para la recuperación completa de la parálisis mediada por la nalfurafina.

La Figura 25 muestra que la mielinización mejora en ratones tratados con nalfurafina después del inicio de la parálisis en el modelo EAE de EM.

La Figura 26 muestra que el tratamiento con nalfurafina disminuye la infiltración celular en la médula espinal cuando se administra terapéuticamente en el modelo EAE de la EM.

La Figura 27 muestra que el tratamiento con nalfurafina reduce el nivel de astrocitos activados en la médula espinal cuando se administra terapéuticamente en el modelo EAE de EM.

La Figura 28 muestra que el tratamiento con nalfurafina mejora la recuperación de la pérdida de peso cuando se administra terapéuticamente en el modelo de cuprizona de la EM.

La Figura 29 muestra que el tratamiento con nalfurafina mejora la remielinización en el cerebro cuando se administra después de la desmielinización en el modelo de enfermedad de desmielinización por cuprizona de la EM.

La Figura 30 muestra que la nalfurafina es más eficaz para promover la recuperación funcional que el fumarato de clemastina, un fármaco remielinizante conocido.

La Figura 31 muestra que la nalfurafina promueve una recuperación mayor y más sostenida que el fumarato de clemastina, un fármaco remielinizante conocido.

La Figura 32 muestra que la nalfurafina promueve la recuperación del umbral del dolor cuando se administra después de la desmielinización en el modelo de enfermedad por desmielinización por cuprizona de la EM.

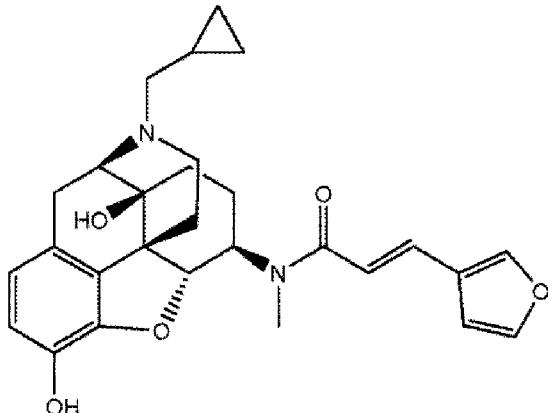
## 6. DESCRIPCIÓN DETALLADA

Todas las referencias a procedimientos de tratamiento en esta especificación deben interpretarse como referencia a los compuestos, composiciones farmacéuticas y medicamentos de la presente invención para su uso en un procedimiento de tratamiento del cuerpo humano o animal mediante terapia.

### 6.1 Nalfurafina

La nalfurafina es un medicamento que se receta comúnmente para el tratamiento del prurito urémico en personas con enfermedad renal crónica. Es un opioide no narcótico con actividad agonista selectiva del receptor opioide  $\kappa$  (KOR). Los inventores han descubierto ahora que la nalfurafina es un tratamiento sorprendentemente eficaz para las enfermedades desmielinizantes.

El nombre genérico "nalfurafina" se refiere al compuesto:



El nombre IUPAC de la nalfurafina es (E)-N-[(4R,4aS,7R,7aR,12bS)-3-(ciclopropilmetil)-4a,9-dihidroxi-1,2,4,5,6,7,7a,13-octahidro-4,12-metanobenzofuro[3,2-e]isoquinolin-7-il]-3-(furan-3-il)-N-metilprop-2-enamida. Su número CAS es 152657-84-6. Nalfurafina HCl también puede denominarse clorhidrato de 17-ciclopropilmetil-3,14-beta-dihidroxi-4,5-alfa-epoxi-6beta-(N-metil-trans-3-(3-furil)acrilamido)morfina, TRK 820, AC-820 y MT-9938.

5 Tal como se usa en esta invención, el término "nalfurafina" se refiere al compuesto identificado anteriormente, así como a sus sales y solvatos farmacéuticamente aceptables.

El término "sales farmacéuticamente aceptables" se refiere a sales preparadas a partir de bases o ácidos no tóxicos farmacéuticamente aceptables incluidas las bases inorgánicas u orgánicas y los ácidos inorgánicos u orgánicos. Las sales derivadas de bases inorgánicas incluyen sales de aluminio, amonio, calcio, cobre, férricas, ferrosas, litio, magnesio, mangánicas, manganosas, potasio, sodio, zinc y similares. Se prefieren particularmente las sales de amonio, calcio, magnesio, potasio y sodio. Las sales en forma sólida pueden existir en más de una estructura cristalina y también pueden estar en forma de hidratos. Las sales derivadas de bases no tóxicas orgánicas farmacéuticamente aceptables incluyen sales de aminas primarias, secundarias y terciarias, aminas sustituidas incluyendo aminas sustituidas de origen natural, aminas cíclicas y resinas de intercambio iónico básicas, tales como arginina, betaina, cafeína, colina, N,N'-dibenciletilendiamina, dietilamina, 2-dietilaminoetanol, 2-dimetilaminoetanol, etanolamina, etilendiamina, N-etilmorfolina, N-etilpiperidina, glucamina, glucosamina, stidina, hidrabamina, isopropilamina, lisina, metilglucamina, morfolina, piperazina, piperidina, resinas de poliamina, procaína, purinas, teobromina, trietilamina, trimetilamina, tripropilamina, trometamina y similares. Cuando la nalfurafina es básica, las sales se pueden preparar a partir de ácidos no tóxicos farmacéuticamente aceptables, incluidos los ácidos inorgánicos y orgánicos. Dichos ácidos incluyen ácido acético, bencenosulfónico, benzoico, canforsulfónico, cítrico, etanosulfónico, fumárico, glucónico, glutámico, bromhídrico, clorhídrico, isetónico, láctico, maleico, mágico, mandélico, etanosulfónico, mágico, nítrico, pamoico, pantoténico, fosfórico, succínico, sulfúrico, tartárico, ácido p-toluenosulfónico y similares. Se prefieren particularmente los ácidos cítrico, bromhídrico, clorhídrico, maleico, fosfórico, sulfúrico, fumárico y tartárico.

25 El término "solvato" se refiere a un agregado que consiste en un ion o molécula de soluto con una o más moléculas de disolvente. Los "solvatos" incluyen hidratos, es decir, agregados de un compuesto de interés con agua.

La nalfurafina se puede comprar en proveedores de moléculas pequeñas como Med Chem Express, Monmouth Junction y Nueva Jersey, EE. UU.; AdooQ BioScience, Irvine California, EE. UU.

## 6.2 Composiciones farmacéuticas de nalfurafina

30 Faltan tratamientos eficaces para las enfermedades desmielinizantes, incluida la esclerosis múltiple y, en particular, hay pocos agentes eficaces que actúen para reducir la desmielinización y/o aumentar la remielinización. Sorprendentemente, los inventores han descubierto que las composiciones farmacéuticas que contienen nalfurafina pueden usarse para tratar enfermedades de desmielinización incluyendo, pero sin limitarse a, la EM al actuar para aumentar la remielinización y/o disminuir la desmielinización.

35 Consecuentemente, en un aspecto, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende nalfurafina para su uso en el tratamiento de una enfermedad desmielinizante en un sujeto que la necesite.

En otro aspecto, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende nalfurafina y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable para su uso en el tratamiento de una enfermedad desmielinizante en un sujeto que lo necesite.

40 Este término "composición farmacéutica", tal como se usa en esta invención, abarca un producto que comprende uno o más agentes activos y excipientes farmacéuticamente aceptables que comprenden ingredientes inertes, así como cualquier producto que resulte, directa o indirectamente, de la combinación, complejación o agregación de dos o más de los ingredientes, o de la disociación de uno o más de los ingredientes, o de otros tipos de reacciones o interacciones de uno o más de los ingredientes. En general, las composiciones farmacéuticas se preparan asociando el ingrediente activo con un portador líquido, un portador sólido finamente dividido, o ambos, y a continuación, si es necesario, conformando el producto en la formulación deseada. Dichas composiciones se preparan según procedimientos convencionales de mezcla, granulación o recubrimiento, respectivamente, y contienen un porcentaje (%) del ingrediente activo y pueden determinarse por un experto en la materia.

45 El término "que comprende", tal como se usa en esta invención, significa "que consiste al menos en parte en". Al interpretar cada afirmación de esta especificación que incluye el término "que comprende", también pueden estar presentes características distintas de esa o las precedidas por el término. Los términos relacionados, tales como "comprender" y "comprende", deben interpretarse de la misma manera.

50 El término "que consiste esencialmente en", tal como se usa en esta invención, significa los materiales o etapas especificados y aquellos que no afectan materialmente a las características básicas y novedosas de la invención reivindicada.

55 El término "que consiste en", tal como se usa en esta invención, significa los materiales o etapas especificados de la invención reivindicada, excluyendo cualquier elemento, etapa o ingrediente no especificado en la reivindicación.

Por "excipiente farmacéuticamente aceptable" o "portador farmacéuticamente aceptable" se entiende que el excipiente o portador debe ser compatible con los demás ingredientes de la formulación y no ser perjudicial para el sujeto al que se administra la composición.

5 Las composiciones farmacéuticas tal como se describen en esta invención se pueden administrar por vía tópica, oral o parenteral.

Por ejemplo, las composiciones farmacéuticas se pueden administrar por vía oral, incluso por vía sublingual, en forma de cápsulas, comprimidos, elixires, soluciones, suspensiones o bolos formulados para disolverse, por ejemplo, en el colon o el duodeno. Las formulaciones pueden comprender excipientes tales como almidón o lactosa o agentes aromatizantes, conservantes o colorantes.

10 Las composiciones farmacéuticas se pueden inyectar por vía parenteral, por ejemplo, por vía intravenosa, intramuscular o subcutánea. Para la administración parenteral, las composiciones se pueden formular en una solución o suspensión acuosa estéril que comprende opcionalmente otras sustancias, tales como sal o glucosa.

15 Las composiciones se pueden administrar por vía tópica, en forma de cremas estériles, geles, formulaciones para verter o untar, suspensiones, lociones, pomadas, polvos para espolvorear, apósitos con fármacos incorporados, champús, collares o parches transdérmicos. Por ejemplo, las composiciones descritas en esta invención pueden incorporarse a una crema que comprende una emulsión acuosa u oleosa de polietilenglicoles o parafina líquida; una pomada que comprende una base de parafina blanda de cera blanca; un hidrogel con derivados de celulosa o poliacrilato u otros modificadores de la viscosidad adecuados; un polvo seco; un aerosol con propulsores de butano, propano, HFA o CFC; un apósito, tal como un apósito de tul, con parafina blanda blanca o apósitos de gasa impregnados con polietilenglicol o con apósitos de película de hidrogel, hidrocoloide o alginato. Las composiciones también se pueden administrar por vía intraocular como un colirio con tampones, modificadores de la viscosidad (por ejemplo, derivados de celulosa) y conservantes (por ejemplo, cloruro de benzalconio) apropiados.

20 25 Las composiciones farmacéuticas descritas en esta invención también se pueden incorporar en un parche transdérmico que comprende nalfurafina. Los detalles de dichos parches se pueden encontrar, por ejemplo, en los documentos WO2015/025766, WO2015/025767, WO2016/208729, WO2017/094337 y WO2017/170933.

Para la administración oral, las cápsulas, bolos o comprimidos se pueden preparar mezclando las composiciones farmacéuticas tal como se describen en esta invención con un diluyente o portador finamente dividido adecuado, que contiene adicionalmente un agente disgregante y/o aglutinante tal como almidón, lactosa, talco o estearato de magnesio.

30 Para la administración parenteral, las formulaciones inyectables se pueden preparar en forma de una solución o emulsión estéril.

35 Las composiciones descritas en esta invención pueden presentarse en forma de dosificación unitaria y pueden prepararse mediante cualquiera de los procedimientos bien conocidos en la técnica de la farmacia. El término "forma de dosificación unitaria" significa una dosis única en donde todos los ingredientes activos e inactivos se combinan en un sistema adecuado, de manera que el paciente o la persona que administra el medicamento pueda abrir un único recipiente o paquete con la dosis completa contenida en él y no tenga que mezclar ningún componente de dos o más recipientes o paquetes. Los ejemplos típicos de formas de dosificación unitaria son comprimidos o cápsulas para administración oral o parches transdérmicos que comprenden la dosificación unitaria. Estos ejemplos de formas de dosificación unitaria no pretenden ser limitantes de ninguna manera, sino simplemente representar ejemplos típicos 40 en la técnica farmacéutica de formas de dosificación unitaria.

45 En otro aspecto, la invención proporciona formas de dosificación unitaria que comprenden de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 5 mg de nalfurafina y al menos un portador o excipiente farmacéuticamente aceptable. En una realización, la forma de dosificación unitaria comprende de 0,05 a aproximadamente 2,0 mg de nalfurafina y al menos un portador o excipiente farmacéuticamente aceptable. En una realización, la forma de dosificación unitaria comprende aproximadamente 0,15 a aproximadamente 0,6 mg de nalfurafina y al menos un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.

50 En otro aspecto, la invención proporciona una dosis unitaria que comprende de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 10 µg de nalfurafina y al menos un portador o excipiente farmacéuticamente aceptable. En una realización, la forma de dosificación unitaria comprende de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 7,5 µg de nalfurafina, de aproximadamente 0,75 a aproximadamente 5 µg de nalfurafina, de aproximadamente 1 a 4 µg de nalfurafina, aproximadamente 2-3 µg de nalfurafina, aproximadamente 2 µg de nalfurafina, aproximadamente 3 µg de nalfurafina, aproximadamente 4 µg de nalfurafina o aproximadamente 5 µg de nalfurafina.

En una realización, la forma de dosificación unitaria comprende menos de aproximadamente 2 µg, 1,5 µg, 1,0 µg, 0,5 µg, 0,25 µg o 0,1 µg, preferiblemente menos de 2 µg, 1,5 µg, 1,0 µg, 0,5 µg, 0,25 µg o 0,1 µg.

En otra realización, la forma de dosificación unitaria es para tratar una enfermedad desmielinizante en un sujeto que lo necesite, preferiblemente en donde el sujeto tiene EM. En otra realización, la forma de dosificación unitaria es formulada para tratar una enfermedad desmielinizante en un sujeto que lo necesite. En una realización, la enfermedad desmielinizante es la EM.

5 En otra realización, la dosis unitaria se formula para aumentar la remielinización en un sujeto que lo necesite, preferiblemente en donde el sujeto tiene EM.

En una realización, la forma de dosificación unitaria es para administración oral, preferiblemente la forma de dosificación unitaria se formula para administración oral. En otra realización, la forma de dosificación unitaria es un parche transdérmico.

10 El término "aproximadamente", tal como se usa en esta invención, significa una cantidad razonable de desviación del término modificado de manera que el resultado final no cambie significativamente. Por ejemplo, cuando se aplica a un valor, el término debe interpretarse como incluida una desviación de +/- 5 % del valor.

Las composiciones farmacéuticas de nalfurafina se pueden usar en combinación con otras terapias para tratar enfermedades de desmielinización.

### 15 6.3 Usos terapéuticos de la nalfurafina

Sorprendentemente, los inventores han descubierto que la nalfurafina produce muchos efectos positivos en la desmielinización en modelos de ratones con EM. Por ejemplo, los inventores han descubierto que la nalfurafina es eficaz para tratar la desmielinización en modelos murinos de EAE y la desmielinización inducida por cuprizona, resultados que se pueden traducir al tratamiento de enfermedades desmielinizantes como la EM en humanos. Los inventores también han descubierto que la nalfurafina es inesperadamente eficaz para aumentar la remielinización en sujetos que la necesitan. En consecuencia, este fármaco, que tiene un historial de seguridad comprobado, podría ser muy beneficioso en el tratamiento de las enfermedades de desmielinización y/o para aumentar la remielinización.

Como se expone en los Ejemplos 1, 10 y 12-18, la nalfurafina promueve la recuperación funcional (incluida la recuperación total y sostenida) de la parálisis inducida por la EAE en ratones machos y hembras. La nalfurafina también reduce la discapacidad total inducida por la EAE (véase el Ejemplo 2) y promueve la recuperación de la pérdida de peso inducida por la EAE (véase el Ejemplo 3). Es importante destacar que la puntuación de la enfermedad se reduce por completo en los ejemplos descritos en esta invención a  $<0.5$ , lo que se considera que representa una "recuperación total" de la parálisis en la técnica, con una excepción. Un ciclo breve de 4 días que comenzara desde el inicio de la enfermedad no fue eficaz para promover la recuperación (Ejemplo 11), lo que demuestra la eficacia de una terapia de larga duración como se describe en esta invención.

30 La nalfurafina reduce la infiltración de células inmunitarias en el cerebro en el modelo EAE de la EM (véase el Ejemplo 4) y es más eficaz que el comparador U-50488, que no lo hace (Ejemplo 19). Cuando se administra antes del inicio, la nalfurafina promueve la recuperación funcional de la parálisis, en el modelo EAE de la EM (véase el Ejemplo 5). La mielinización también mejora en ratones tratados con nalfurafina tras el inicio de la parálisis en el modelo EAE de EM (Ejemplos 6, 20 y 25).

35 Mediante los ejemplos descritos en esta invención, los inventores muestran claramente que la nalfurafina induce y/o aumenta la remielinización en el modelo de EAE. En el Ejemplo 6, las imágenes TEM de la médula espinal de ratones con EAE tratados con nalfurafina se parecen a las del control sano.

40 Los resultados de la EAE se confirmaron mediante los estudios de cuprizona descritos en los Ejemplos 7 - 9 y 11. En los Ejemplos 7 y 28, la nalfurafina mejoró el aumento de peso cuando se administró después de la desmielinización inducida por cuprizona. En el Ejemplo 8, la nalfurafina mejoró la recuperación funcional de la coordinación y el equilibrio en ratones desmielinizados. La remielinización del cuerpo caloso se produjo cuando a los ratones tratados con cuprizona se les administró nalfurafina (véanse los Ejemplos 9 y 29).

45 En el Ejemplo 15, la demostración de una recuperación sostenida es digna de mención y muestra la capacidad bastante inesperada de la nalfurafina para revertir, de manera sostenida, los síntomas de la desmielinización. Este sorprendente resultado indica que la nalfurafina puede mediar en la recuperación sostenida de las enfermedades desmielinizantes incluyendo MS.

50 En el Ejemplo 21, la nalfurafina no agota las principales poblaciones de células inmunitarias en la periferia a pesar de reducir la infiltración de células inmunitarias en el cerebro. En el Ejemplo 22, la nalfurafina promueve un cambio en las células T auxiliares de células efectoras a células de memoria, lo que sugiere una resolución de la respuesta inmunitaria.

En los Ejemplos 23 y 24, la KOR es necesaria para el efecto completo de la nalfurafina, pero la nalfurafina es eficaz para reducir la enfermedad independientemente de la KOR, lo que sugiere que el mecanismo completo por el que la nalfurafina ejerce sus efectos es más complejo que la activación de la KOR.

Los efectos positivos de la nalfurafina en ratones fueron particularmente sorprendentes con dosis de 0,003 mg/kg a 0,3 mg/kg, que se pueden convertir en una dosis humana equivalente utilizando la ecuación de Regan-Shaw (Regan-Shaw S; Nihal M; Ahmad N: Dose translation from animal to human studies revisited, FASEB J. 2007, Oct 17).

5 Alternativamente, las dosis de 0,003 a 0,3 mg/kg se pueden convertir en una dosis humana equivalente usando el procedimiento de comparación entre especies descrito en esta invención.

10 El experto en la materia aprecia que existen algoritmos alternativos que pueden usarse para convertir una dosis terapéutica observada a partir de un modelo murino en una dosis humana equivalente una vez que se ha demostrado la dosificación eficaz en ratones. El experto en la materia puede usar dichos algoritmos de manera efectiva para determinar la dosis humana apropiada. Por ejemplo, usando un procedimiento de comparación entre especies, un experto emplea la relación entre la dosis de eficacia para la picazón frente a la dosis de eficacia para la EM en la misma especie. Esta proporción se puede aplicar a la dosis humana para convertir la dosis para la picazón en la dosis para la EM. En este caso, hay datos de dosis para tratar la picazón en modelos de ratones y humanos, y esto permite los cálculos que se describen a continuación.

Datos que describen la dosis del fármaco que produce el 50 % del efecto máximo (ED<sub>50</sub>).

Modelo de ratón	Ruta administración	ED <sub>50</sub> (μg/kg)	Inhibición completa (μg/kg)	Referencia
Arañazo inducido por la sustancia P	IV	3,77	7,5-10	
Arañazo inducido por la sustancia P	SC	1,65	10	
Arañazo inducido por la sustancia P	PO	9,61	100 (66 %)	Winfuran - Assessment report European Medicines Agency, Committee for Medicinal Products for Human Use (EMA/CHMP/138212/2014)
Arañazo inducido por morfina	SC	2,34	5-10	
Arañazo inducido por histamina	PO	7,3	30-100	Togashi et al. (2002). Antipruritic activity of the κ-opioid receptor agonist, TRK-820. Eur J Pharmacol 435:259
Arañazo inducido por la sustancia P	PO	19,6	100	

15 Para el modelo de prurito, la eficacia media *in vivo* de ED<sub>50</sub> es de ~2,71 μg/kg (redondeado a 3 μg/kg) mediante administración subcutánea o intravenosa (en este cálculo solo se utilizaron los datos de las dos filas superiores de la tabla anterior). La razón de esto es:

- La administración en nuestro estudio de EAE fue intraperitoneal (i.p.)
- Biodisponibilidad de la nalfurafina (tal como se describe en Winfuran - Assessment report European Medicines Agency, Committee for Medicinal Products for Human Use (EMA/CHMP/138212/2014) :
  - la administración oral (PO) es de ~32 %
  - por vía subcutánea (s.c.) es del 96 %
  - por vía intravenosa (IV) es del 100 %

- Por lo tanto, la administración subcutánea e intravenosa tendrá una biodisponibilidad similar a la intravenosa, mientras que la administración por vía oral no se debe al efecto de primer paso del metabolismo hepático y, por lo tanto, se ha excluido de los cálculos. Además, el modelo de arañazo inducido por morfina funciona mediante un mecanismo de acción no relacionado con el de la picazón por la sustancia P y, por lo tanto, se excluyó.

5

#### Convertir la dosis para la picazón frente a la EAE

El cálculo supone que la respuesta a la picazón es un biomarcador (sustituto) de la EAE.

1. La dosis para la picazón en ratones es de 3 µg/kg/día
2. **La dosis de EAE en ratones es de 3 µg/kg/día** (la dosis efectiva se muestra en la Figura 10)
3. Por lo tanto, la relación entre la picazón y la EAE en ratones es igual a 1
4. Uso de la relación de eficacia entre la picazón y la EAE en la misma especie (ratón) de 1
5. La dosis eficaz en humanos para la picazón es de 2,5 µg/cuerpo/día

#### 6. Cálculo para convertir la predicción de dosis en ratones con EAE en humanos:

Dosis de EAE en ratones/(3 µg/kg/día de picazón en ratones x 2,5 µg/cuerpo/día de picazón humana) = Dosis de EM humana.

#### 7. Conversión de la dosis de EAE en ratones en la dosis prevista de EM humana:

1. 3 µg/kg/día de ratón = 2,5 µg/cuerpo/día para humanos (Figura 10)
2. 10 µg/kg/día en ratones = 8,33 µg/cuerpo/día en humanos (Figura 1)
3. 30 µg/kg/día de ratón = 25 µg/cuerpo/día para humanos (Figura 1)
4. 100 µg/kg/día en ratones = 83,33 µg/cuerpo/día en humanos (Figura 1)
5. 300 µg/kg/día de ratón = 250 µg/cuerpo/día para humanos (Figura 1)

Como muchas enfermedades desmielinizantes causan síntomas terriblemente debilitantes, cualquier mejora en los resultados del tratamiento supone un avance importante. Los inventores han descubierto que la nalfurafina es un tratamiento eficaz para las enfermedades desmielinizantes y, en particular, la EM. En un ejemplo, los inventores creen que el tratamiento con nalfurafina será eficaz para aliviar los síntomas debilitantes relacionados con el síndrome clínicamente aislado (CIS). Uno de los cursos de la EM, el CIS, generalmente se refiere a un primer episodio de síntomas neurológicos asociados con la EM. Por lo general, este episodio inicial es causado por una inflamación o desmielinización en el sistema nervioso central (SNC) y durará 24 horas o más.

Por lo tanto, en un aspecto, la invención proporciona un procedimiento para tratar una enfermedad desmielinizante en un sujeto que lo necesite, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de nalfurafina al sujeto.

En otro aspecto, la invención proporciona un procedimiento para tratar una enfermedad desmielinizante en un sujeto que comprende identificar un sujeto que se beneficiaría de un nivel reducido de desmielinización y administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente que disminuye el nivel de desmielinización en el sujeto en relación con el nivel de desmielinización antes de administrar el agente, en donde el agente comprende nalfurafina.

En otro aspecto, la invención proporciona un procedimiento para tratar una enfermedad desmielinizante en un sujeto que lo necesita, que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente que disminuye el nivel de desmielinización en el sujeto en relación con el nivel de desmielinización antes de administrar el agente, en donde el agente comprende nalfurafina.

El término "tratar", tal como se usa en esta invención con referencia a una enfermedad o afección, se refiere a lo siguiente: (a) mejorar la enfermedad o afección, por ejemplo, eliminando o provocando una regresión o disminuyendo la gravedad de la enfermedad o afección médica del sujeto que está siendo tratado en comparación con un sujeto no tratado, según los criterios aceptados en la técnica para monitorear la enfermedad o afección (Wattjes et al. (2015). Pautas basadas en la evidencia: Pautas de consenso de MAGNIMS sobre el uso de la resonancia magnética en la esclerosis múltiple: establecer el pronóstico de la enfermedad y monitorear a los pacientes. Nat. Reverendo Neurol. 11, 597-606; Traboulsee et al. (2016). Revised Recommendations of the Consortium of MS Centers Task Force for a Standardized MRI Protocol and Clinical Guidelines for the Diagnosis and Follow-Up of Multiple Sclerosis. AJNR Am. J. Neuroradiol. 37, 394-401; Toosy et al. (2014). Optic neuritis. Lancet Neurol. 13, 83-99; Ontaneda et al. (2017). Clinical outcome measures for progressive MS trials. Mult. Scler. 23, 1627-1635; Naismith et al. (2012). Diffusion tensor imaging in acute optic neuropathies: predictor of clinical outcomes. Arch. Neurol. 69, 65-71); (b) suprimir la enfermedad

o afección, por ejemplo, retrasando o deteniendo el desarrollo de la enfermedad o afección en relación con un sujeto no tratado según los criterios aceptados en la técnica para monitorear la enfermedad o afección (Oh et al. (2019). Imaging outcome measures of neuroprotection and repair in MS: A consensus statement from NAIMS. *Neurology*; Sormani et al. (2017). Assessing Repair in Multiple Sclerosis: Outcomes for Phase II Clinical Trials. *Neurother. J. Am. Soc. Exp. Neurother.* 14, 924-933; Zhang et al. (2018). Clinical trials in multiple sclerosis: milestones. *Ther. Adv. Neurol. Disord.* 11; Bjartmar et al. (2003). Axonal loss in the pathology of MS: consequences for understanding the progressive phase of the disease. *J. Neurol. Sci.* 206, 165-171; Toosy et al. (2014). Optic neuritis. *Lancet Neurol.* 13, 83-99) o (c) aliviar un síntoma de la enfermedad o afección en el sujeto en relación con un sujeto no tratado según los criterios aceptados en la técnica para controlar la enfermedad o afección (van Munster et al. (2017)). Outcome Measures in Clinical Trials for Multiple Sclerosis. *CNS Drugs* 31, 217-236; Uitdehaag (2018). Disability Outcome Measures in Phase III Clinical Trials in Multiple Sclerosis. *CNS Drugs* 32, 543-558; Toosy et al. (2014). Optic neuritis. *Lancet Neurol.* 13, 83-99). En algunos casos preferidos, "tratar" se refiere a mejorar como en (a), suprimir como en (b) y/o aliviar como en (c) de una manera estadísticamente significativa en relación con un sujeto de control no tratado apropiado según los criterios aceptados en la técnica para controlar la enfermedad o afección.

15 En la definición de "tratamiento", los criterios aceptados en la técnica son uno o más de los criterios para medir la discapacidad que pueden incluir la escala de discapacidad ampliada, la puntuación Z compuesta funcional de la esclerosis múltiple y la escala de impacto de la esclerosis múltiple y el formulario abreviado del estudio de resultados médicos, las imágenes del cerebro, la médula espinal o el nervio óptico, el compuesto funcional de la esclerosis múltiple y las nuevas medidas compuestas de la discapacidad, además de las pruebas que evalúan la destreza manual, la deambulación, visión (incluidas las medidas de la difusividad axial, la agudeza visual, la sensibilidad al contraste, los potenciales evocados visuales (VEP) y el grosor de la capa de fibras nerviosas de la retina (RNFL) y la cognición.

25 El sujeto puede mostrar una disminución observable o medible en uno o más de los síntomas asociados o relacionados con la enfermedad o afección, tal como conocen los expertos en la materia, como indicador de una mejoría. En algunos casos, la enfermedad o afección es una enfermedad desmielinizante, preferiblemente la EM, y el sujeto muestra una disminución observable y medible en uno o más de los síntomas asociados o relacionados con la EM, preferiblemente una disminución en la desmielinización, como saben los expertos en la materia, como indicador de mejoría. En realizaciones preferidas, la mejora es una mejora estadísticamente significativa en relación con un sujeto de control no tratado apropiado según los criterios aceptados en la técnica para controlar la enfermedad o afección.

30 35 Los términos "disminuir" y "reducir" (y sus variaciones gramaticales), tal como se usan en esta invención con referencia a la desmielinización, significan cualquier reducción medible u observable en una cantidad o nivel de desmielinización o de cualquier síntoma de una enfermedad desmielinizante que sea atribuible a la desmielinización en un sujeto tratado en relación con el nivel de desmielinización en un sujeto de control apropiado (por ejemplo, no tratado). En realizaciones preferidas, la disminución o reducción medible o detectable es una disminución o reducción estadísticamente significativa, en relación con un control apropiado.

40 45 50 El término "aumento" (y variaciones gramaticales del mismo como se utiliza en este documento con referencia a la desmielinización) significa cualquier aumento medible u observable en una cantidad o nivel de remielinización o una mejora de cualquier síntoma de una enfermedad desmielinizante que sea atribuible a la remielinización en un sujeto tratado en relación con el nivel de remielinización en un sujeto de control apropiado (por ejemplo, no tratado); por ejemplo, placebo o agente no activo. Un ejemplo de cuantificación de la remielinización se demuestra con el tratamiento con fumarato de clemastina utilizando medidas de VEP para evaluar la remielinización y la recuperación. (Green et al. (2017) Clemastine fumarate as a remyelinating therapy for multiple sclerosis (ReBUILD): a randomised, controlled, double-blind, crossover trial. *Lancet.* 390, 2481-2489; Jankowska-Lech et al. (2019). Peripapillary retinal nerve fiber layer thickness measured by optical coherence tomography in different clinical subtypes of multiple sclerosis. *Mult. Scler. Relat. Disord.* 27, 260-268; Naismith et al. (2012). Diffusion tensor imaging in acute optic neuropathies: predictor of clinical outcomes. *Arco. Neurol.* 69, 65-71; Oh et al. (2019). Imaging outcome measures of neuroprotection and repair in MS: A consensus statement from NAIMS. *Neurology*; Sormani et al. (2017). Assessing Repair in Multiple Sclerosis: Outcomes for Phase II Clinical Trials. *Neurother. J. Am. Soc. Exp. Neurother.* 14, 924-933. En realizaciones preferidas, la reducción medible o detectable es una reducción estadísticamente significativa, en relación con un control apropiado.

55 Los términos "administración de" o "administración" deben entenderse en el sentido de proporcionar nalfurafina o una composición farmacéutica que comprende, consiste esencialmente en, o consiste en, nalfurafina al sujeto que necesita tratamiento en una forma terapéuticamente útil para el modo de administración. La nalfurafina se puede administrar por cualquier vía adecuada. Las posibles vías de administración incluyen, sin limitación, la oral, la parenteral (incluidas intramuscular, subcutáneo, intradérmico, intravenoso, intraarterial, intramedular e intratecal), intraperitoneal y tópica (incluyendo dérmica/epicutánea, transdérmica, mucosa, transmucosa, intranasal (por ejemplo, mediante aerosol o gota nasal), intraocular (por ejemplo, mediante colirio), pulmonar (por ejemplo, mediante inhalación), bucal, sublingual, rectal y vaginal.

60 El término "terapéuticamente", tal como se usa en esta invención, significa "al inicio de la enfermedad".

En ciertos casos, la nalfurafina se administra mediante formas de dosificación oral tales como comprimidos, cápsulas, jarabes, suspensiones y similares. En otra realización, la nalfurafina se administra mediante un parche transdérmico.

El término "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad suficiente del agente activo, en una composición adecuada y en una forma de dosificación adecuada para tratar las afecciones patológicas observadas o para obtener un resultado medible u observable, tal como una disminución de la desmielinización o un aumento de la remielinización. La "cantidad terapéuticamente eficaz" variará dependiendo del compuesto, la gravedad de la enfermedad desmielinizante y la especie, la edad, el peso, etc., del sujeto a tratar.

En una realización, la cantidad terapéuticamente eficaz de nalfurafina es la cantidad equivalente a aproximadamente 0,003 a aproximadamente 0,3 mg/kg en un ratón, que se puede convertir según la práctica aceptada en una dosificación para un sujeto animal o humano. Por ejemplo, usando la ecuación de Reagan-Shaw, una cantidad terapéuticamente eficaz de nalfurafina para un perro sería de aproximadamente 0,67 a aproximadamente 2 mg/kg.

En una realización, la cantidad terapéuticamente eficaz de nalfurafina es la cantidad equivalente a aproximadamente 0,003 a aproximadamente 0,3 mg/kg en un ratón, convertida según el procedimiento de comparación entre especies descrito en esta invención. En una realización, una cantidad terapéuticamente eficaz de nalfurafina para un ser humano es de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 5 µg de nalfurafina al día, preferiblemente de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 2,5 µg de nalfurafina al día.

En una realización, el sujeto es un ser humano. En una realización, el procedimiento comprende administrar de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 5 µg de nalfurafina al día, de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 4 µg, de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 3 µg, de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 2,5 µg, de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 2 µg, de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 1,5 µg, de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 1 µg, de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 0,75 µg, de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 0,5 µg, o aproximadamente 0,25 µg de nalfurafina al día.

En una realización, el procedimiento comprende administrar aproximadamente 0,01 a aproximadamente 2,5 µg de nalfurafina diariamente, aproximadamente 0,025 a aproximadamente 2 µg, aproximadamente 0,05 a aproximadamente 1 µg, aproximadamente 0,075 a aproximadamente 0,75 µg, aproximadamente 0,1 a aproximadamente 0,5 µg, o aproximadamente 0,225 a aproximadamente 0,325 µg de nalfurafina diariamente.

En algunas realizaciones, el procedimiento comprende administrar menos de aproximadamente 1 µg de nalfurafina diariamente, preferiblemente menos de 1 µg de nalfurafina al día.

En una realización, el procedimiento comprende administrar de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 0,1 µg de nalfurafina al día, de aproximadamente 0,025 a aproximadamente 0,075 µg, de aproximadamente 0,06 a aproximadamente 0,04 µg, o aproximadamente 0,05 µg de nalfurafina al día.

En una realización, el procedimiento comprende una terapia de larga duración.

En algunos casos, la terapia de larga duración comprende la administración de una dosis terapéuticamente eficaz de nalfurafina a un sujeto que la necesite durante al menos 5 días, al menos 6 días o al menos 7 días.

En algunos casos, la terapia de larga duración comprende la administración de una dosis terapéuticamente eficaz de nalfurafina a un sujeto que la necesite durante al menos 5, preferiblemente al menos 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, referiblemente al menos 90 días.

En algunos casos, una terapia de larga duración comprende la administración de una dosis terapéuticamente eficaz de nalfurafina a un sujeto que la necesite durante al menos una semana, al menos 2 semanas, al menos 3 semanas, al menos 4 semanas, al menos 6 semanas o al menos 8 semanas.

En algunas realizaciones, la terapia de larga duración comprende la administración durante al menos 5 días, al menos 6 días, al menos 7 días, al menos 14 días, durante al menos 21 días, durante al menos 28 días, durante al menos 35 días, durante al menos 42 días, durante al menos 45 días, durante al menos 60 días, durante al menos 120 días, durante al menos 240 días o durante al menos 360 días.

En algunos casos, una terapia de larga duración comprende la administración de una dosis terapéuticamente eficaz de nalfurafina a un sujeto que la necesite durante al menos 1 semana, al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51 o al menos 52 semanas.

En algunas realizaciones, una terapia de larga duración comprende la administración de una dosis terapéuticamente eficaz de nalfurafina a un sujeto que la necesita durante al menos 1 mes, al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 o al menos 36 meses.

En algunos casos, la terapia de larga duración comprende un intervalo de dosificación, preferiblemente en donde el intervalo de dosificación es de al menos 1 día.

En algunos casos, el intervalo de dosificación comprende al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 o 14 días.

En algunas realizaciones, el intervalo de dosificación comprende al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12 semanas.

5 En algunas realizaciones, el intervalo de dosificación comprende al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 u 11 meses.

El término "enfermedad desmielinizante" se refiere a una enfermedad del sistema nervioso donde se daña la vaina de mielina de las neuronas. Las enfermedades desmielinizantes incluyen las enfermedades mielinolíticas desmielinizantes y las enfermedades leucodistróficas desmielinizantes. El tratamiento de una enfermedad desmielinizante puede comprender el tratamiento con un agente que disminuye la desmielinización y/o un agente que aumenta la remielinización.

10 Las enfermedades desmielinizantes pueden afectar al sistema nervioso central y al sistema nervioso periférico. Las enfermedades desmielinizantes del sistema nervioso central incluyen la esclerosis múltiple incluyendo la neuritis óptica con síndrome clínicamente aislado (CIS), la enfermedad de Devic, las enfermedades desmielinizantes inflamatorias, las neuropatías del sistema nervioso central como las producidas por la deficiencia de vitamina B12, las mielopatías como la Tabes dorsalis, las leuкоencefalopatías como la leuкоencefalopatía multifocal progresiva, las leucodistrofias o una combinación de las mismas. Las enfermedades desmielinizantes del sistema nervioso periférico incluyen el síndrome de Guillain-Barré y su contraparte crónica, la polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica, la neuropatía periférica antiMAG, la enfermedad de Charcot Marie Tooth (CMT), la deficiencia de cobre, la neuropatía inflamatoria progresiva o una combinación de las mismas. El término "sujeto" se refiere a un mamífero, más preferiblemente un ser humano o un animal de compañía. Los animales de compañía preferidos incluyen gatos, perros y caballos. Otros sujetos mamíferos incluyen animales agrícolas, incluidos caballos, cerdos, ovejas, cabras, vacas, ciervos o aves de corral: y animal de laboratorio, incluidos monos, ratas, ratones, conejos y cobayas.

15 La invención también proporciona el uso de la nalfurafina en la fabricación de un medicamento para tratar una enfermedad desmielinizante en un sujeto que lo necesite.

20 25 La invención también proporciona un uso de nalfurafina en la fabricación de un medicamento para aumentar la remielinización en un sujeto que lo necesita.

La invención también proporciona nalfurafina para su uso en el tratamiento de una enfermedad desmielinizante.

La invención también proporciona nalfurafina para su uso para aumentar la remielinización.

En una realización, la enfermedad es una enfermedad mielinolítica desmielinizante.

30 35 En una realización, la enfermedad es una enfermedad leucodistrófica desmielinizante.

En una realización, la enfermedad desmielinizante es una enfermedad desmielinizante del sistema nervioso central. En una realización, la enfermedad desmielinizante del sistema nervioso central se selecciona del grupo que comprende la EM (incluyendo el síndrome clínicamente aislado CIS), la neuritis óptica, la enfermedad de Devic, las enfermedades desmielinizantes inflamatorias, las neuropatías del sistema nervioso central, las mielopatías como la Tabes dorsalis, las leuкоencefalopatías, las leucodistrofias o una combinación de las mismas.

En una realización, la enfermedad desmielinizante es la EM.

40 En otra realización, la enfermedad desmielinizante es una enfermedad desmielinizante del sistema nervioso periférico. En una realización, la enfermedad desmielinizante del sistema nervioso periférico se elige del grupo que comprende el síndrome de Guillain-Barré y su homólogo crónico, la polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica, la neuropatía periférica con glicoproteínas asociadas a la antimielina (MAG), la enfermedad de Charcot Marie Tooth (CMT), la deficiencia de cobre y la neuropatía inflamatoria progresiva.

En otro aspecto, la invención proporciona un procedimiento para aumentar la remielinización en un sujeto que lo necesita, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de nalfurafina al sujeto.

45 En otro aspecto, la invención proporciona un procedimiento para aumentar la remielinización en un sujeto que comprende identificar un sujeto que se beneficiaría de un mayor nivel de remielinización y administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente que aumenta el nivel de remielinización en el sujeto en relación con el nivel de remielinización antes de administrar el agente, en donde el agente comprende nalfurafina.

50 En otro aspecto, la invención proporciona un procedimiento para aumentar la remielinización en un sujeto que lo necesita, que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente que aumenta el nivel de remielinización en el sujeto en relación con el nivel de remielinización antes de administrar el agente, en donde el agente comprende nalfurafina.

Como realizaciones de la invención descritas en esta invención relacionadas con un procedimiento para aumentar la remielinización en un sujeto se contemplan específicamente todas las realizaciones de la invención expuestas en esta invención relacionadas con los aspectos de la invención que son procedimientos para disminuir la desmielinización, procedimientos para tratar la EM, procedimientos para atenuar la desmielinización, procedimientos para acelerar la remisión de la EM y procedimientos para tratar una enfermedad desmielinizante.

5 En otro aspecto, la invención proporciona un procedimiento para atenuar la desmielinización en un sujeto que lo necesita, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de nalfurafina al sujeto y atenuando así el nivel de desmielinización en el sujeto en relación con el nivel de desmielinización cuando no se administra nalfurafina.

10 En otro aspecto, la invención proporciona un procedimiento para atenuar la desmielinización en un sujeto que lo necesita, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente que disminuya el nivel de desmielinización en el sujeto en relación con el nivel de desmielinización antes de administrar el agente y/o que aumente el nivel de remielinización en el sujeto en relación con el nivel de remielinización antes de administrar el agente en donde el agente comprende nalfurafina.

15 En una realización, el sujeto es un ser humano. En una realización, el procedimiento comprende administrar aproximadamente de 0,01 a aproximadamente 5 µg de nalfurafina diariamente, aproximadamente de 0,01 a aproximadamente 4 µg, aproximadamente de 0,01 a aproximadamente 3 µg, aproximadamente de 0,01 a aproximadamente 2,5 µg, aproximadamente de 0,01 a aproximadamente 2 µg, aproximadamente de 0,01 a aproximadamente 1,5 µg, aproximadamente de 0,01 a aproximadamente 1 µg, aproximadamente de 0,01 a aproximadamente 0,75 µg, aproximadamente de 0,01 a aproximadamente 0,5 µg o aproximadamente 0,25 µg de nalfurafina diariamente.

20 En una realización, el procedimiento comprende administrar aproximadamente 0,01 a aproximadamente 2,5 µg de nalfurafina diariamente, aproximadamente 0,025 a aproximadamente 2 µg, aproximadamente 0,05 a aproximadamente 1 µg, aproximadamente 0,075 a aproximadamente 0,75 µg, aproximadamente 0,1 a aproximadamente 0,5 µg, o aproximadamente 0,225 a aproximadamente 0,325 µg de nalfurafina diariamente.

25 En algunas realizaciones, el procedimiento comprende administrar menos de aproximadamente 1 µg de nalfurafina diariamente, preferiblemente menos de 1 µg de nalfurafina al día.

En una realización, el procedimiento comprende administrar de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 0,1 µg de nalfurafina al día, de aproximadamente 0,025 a aproximadamente 0,075 µg, de aproximadamente 0,06 a aproximadamente 0,04 µg, o aproximadamente 0,05 µg de nalfurafina al día.

30 35 El término "atenuación de la desmielinización" significa, en ciertos casos, que la cantidad o el nivel de desmielinización en el sujeto como resultado de la enfermedad o como síntoma de la enfermedad se reduce en comparación con afecciones por lo demás idénticas en un sujeto de control apropiado o en un punto temporal de referencia de control apropiado y/o, en ciertos casos, que la cantidad o el nivel de remielinización en el sujeto aumentan en comparación con afecciones por lo demás idénticas en un sujeto de control apropiado, o en un punto temporal de referencia de control apropiado. En algunas realizaciones preferidas, la reducción o el aumento en comparación con el control apropiado es una reducción o aumento estadísticamente significativo.

40 45 En ciertos casos preferidos, el término "atenuación de la desmielinización" significa, por lo tanto, que la cantidad o el nivel de desmielinización en el sujeto como resultado de la enfermedad o como síntoma de la enfermedad se reduce o disminuye de una manera estadísticamente significativa en comparación con un control adecuado, como entenderá un experto en la materia en vista de la presente descripción, y/o la cantidad o el nivel de remielinización en el sujeto aumentan en una manera estadísticamente significativa cuando se compara con un control adecuado, como entendería un experto en la materia en vista de la presente descripción.

50 De manera similar, el término "mejora en la función nerviosa" se refiere a una mejora cuantificable en la función que tiene un cambio estadísticamente diferente en un parámetro medible en relación con un control apropiado, tal como lo reconoce un experto en la materia. En algunos casos, la mejora en la función tiene un cambio estadísticamente significativo en el parámetro medible. En una realización, el parámetro medible es la puntuación de la enfermedad tal como se describe en el Ejemplo 1.

55 Los síntomas atribuibles a la desmielinización variarán según la enfermedad, pero pueden incluir, por ejemplo, pero sin limitarse a ellos, déficits neurológicos, como dolor crónico, deterioro cognitivo (incluidas las habilidades de memoria, atención, conceptualización y resolución de problemas) y procesamiento de la información; parestesias en una o más extremidades, en el tronco o en un lado de la cara; debilidad o torpeza en una pierna o mano; o alteraciones visuales, como ceguera parcial y dolor en un ojo (neuritis óptica retrobulbar), visión borrosa o escotomas.

La invención también proporciona un uso de nalfurafina en la fabricación de un medicamento para atenuar la desmielinización en un sujeto que lo necesita.

La invención también proporciona nalfurafina para su uso para atenuar la desmielinización en un sujeto que lo necesite.

En otro aspecto, la invención proporciona un procedimiento para tratar la EM en un sujeto que lo necesita, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de nalfurafina al sujeto. El sujeto puede padecer cualquier tipo de EM incluidos el CIS, el RRMS, el PRMS, el SPMS, el PRMS o la EM que sigue un curso de enfermedad diferente o indefinido.

La invención también proporciona un uso de nalfurafina en la fabricación de un medicamento para tratar la EM en un sujeto que lo necesita.

La invención también proporciona nalfurafina para su uso en el tratamiento de la EM en un sujeto que la necesite.

En una realización, el sujeto tiene RRMS. En una realización, el sujeto tiene PPMS. En una realización, el sujeto tiene, o se le diagnostica, SPMS. En una realización, el sujeto tiene, o se le diagnostica, PRMS. En una realización, el sujeto tiene, o se le diagnostica que tiene, el síndrome clínicamente aislado (CIS).

En otro aspecto, la invención proporciona un procedimiento para tratar la EM en un sujeto que lo necesita, que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente que disminuye un nivel de desmielinización en el sujeto en relación con el nivel antes de administrar el agente y/o que aumenta un nivel de remielinización en el sujeto en relación con el nivel antes de administrar el agente, en donde el agente comprende nalfurafina.

En algunos casos, los procedimientos de tratamiento de la EM expuestos en esta invención pueden comprender una o más de las siguientes etapas seleccionadas del grupo que consiste en diagnosticar la EM en el sujeto, probar la desmielinización en el sujeto, probar una reducción o reversión de la desmielinización en el sujeto, probar la remielinización en el sujeto, probar un nivel de parálisis o una reducción o reversión de un nivel de parálisis en el sujeto y probar una disminución, o aumento de la coordinación y/o el equilibrio en la asignatura.

En una realización, un procedimiento para tratar la EM y/o para tratar una enfermedad desmielinizante y/o para atenuar la desmielinización y/o aumentar la remielinización comprende identificar a un sujeto que se beneficiaría de un nivel de desmielinización disminuido.

En algunos casos, un sujeto que se beneficiaría de un nivel de desmielinización disminuido y/o un nivel de remielinización aumentado se identifica sobre la base de que presenta uno o más síntomas clínicos de la EM incluyendo, pero no limitado a: pérdida de sensibilidad o cambios en la sensibilidad como hormigueo, alfileres y agujas o entumecimiento, debilidad muscular de gravedad variable, reflejos muy pronunciados, espasmos musculares o dificultad para moverse; dificultades con la coordinación y el equilibrio (ataxia); espasticidad; problemas con el habla o la deglución, problemas visuales (nictagmo, neuritis óptica o visión doble), fatiga, dolor agudo o crónico, dolor facial ( neuralgia del trigémino), dificultades de vejiga e intestino, incontinencia, capacidad cognitiva reducida, depresión, ansiedad y otras anomalías emocionales, disfunción sexual, fenómeno de Uhthoff (un empeoramiento de los síntomas debido a la exposición a temperaturas más altas de lo habitual) y signo de Lhermitte (una sensación eléctrica que recorre la espalda al doblar el cuello).

En algunas realizaciones, la cantidad terapéuticamente eficaz de nalfurafina que se administrará a un sujeto humano es de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 5 mg de nalfurafina por día, de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 4 µg, de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 3 µg, de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 2,5 µg, de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 2 µg, de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 1,5 µg, de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 1 µg, de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 0,75 µg, de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 0,5 µg o de aproximadamente 0,25 µg de nalfurafina por día.

En algunos casos, la cantidad terapéuticamente eficaz de nalfurafina que se administra a un sujeto humano es de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 2,5 µg de nalfurafina al día, de aproximadamente 0,025 a aproximadamente 2 µg, de aproximadamente 0,05 a aproximadamente 1 µg, de aproximadamente 0,075 a aproximadamente 0,75 µg, de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 0,5 µg, o de aproximadamente 0,225 a aproximadamente 0,325 µg de nalfurafina al día.

En algunas realizaciones, el procedimiento comprende administrar menos de aproximadamente 1 µg de nalfurafina diariamente, preferiblemente menos de 1 µg de nalfurafina al día.

En algunas realizaciones, la cantidad terapéuticamente eficaz de nalfurafina que se administrará a un sujeto humano es de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 0,1 µg de nalfurafina por día, de aproximadamente 0,025 a aproximadamente 0,075 µg, de aproximadamente 0,06 a aproximadamente 0,04 µg, o de aproximadamente 0,05 µg de nalfurafina por día.

En una realización, el tratamiento da como resultado uno o más resultados clínicos en comparación con sujetos no tratados con nalfurafina, seleccionados del grupo que consiste en:

- (a) una disminución de la progresión de la esclerosis múltiple;
- (b) una disminución de la gravedad de la esclerosis múltiple;
- 5 (c) una disminución de la desmielinización de las células nerviosas;
- (d) una disminución de la frecuencia o gravedad de los ataques de esclerosis múltiple recidivantes;
- (e) una disminución de los síntomas clínicos de la EM;
- (f) la curación del tejido nervioso dañado (neurorestauración);
- 10 (g) un aumento de la remielinización de los nervios desmielinizados del sistema nervioso central (neurorestauración/protección);
- (h) la protección del tejido nervioso dañado contra una mayor actividad patológica (neuroprotección);
- (i) la promoción del crecimiento neuronal (neurorregeneración) en el sistema nervioso central;
- (j) una disminución de la discapacidad causada por la esclerosis múltiple;
- (k) una mejora de la función nerviosa; y
- 15 (l) una mayor tasa de remisión.

En otra realización, el tratamiento da como resultado una reducción de uno o más síntomas clínicos de la EM incluyendo, pero no limitado a pérdida de sensibilidad o cambios en la sensación como hormigueo, alfileres y agujas o entumecimiento, debilidad muscular de gravedad variable, reflejos muy pronunciados, espasmos musculares o dificultad para moverse; dificultades con la coordinación y el equilibrio (ataxia); espasticidad; problemas con el habla o la deglución, problemas visuales (nictagmo, neuritis óptica o visión doble), fatiga, dolor agudo o crónico, dolor facial (neuralgia del trigémino), dificultades de vejiga e intestino, incontinencia, capacidad cognitiva reducida, depresión, ansiedad y otras anomalías emocionales, disfunción sexual, fenómeno de Uhthoff (un empeoramiento de los síntomas debido a la exposición a temperaturas más altas de lo habitual) y el signo de Lhermitte (una sensación eléctrica que recorre la espalda al doblar el cuello).

25 En un aspecto, la invención proporciona un procedimiento para acelerar la remisión de la EM en un sujeto que lo necesita, comprendiendo el procedimiento la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de nalfurafina al sujeto.

30 En un aspecto, la invención proporciona un procedimiento para acelerar la remisión de la EM en un sujeto que lo necesita, comprendiendo el procedimiento administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente que disminuye el nivel de desmielinización en el sujeto en relación con el nivel de desmielinización antes de administrar el agente, en donde el agente comprende nalfurafina.

35 En un aspecto, la invención proporciona un procedimiento para acelerar la remisión de la EM en un sujeto que lo necesita, comprendiendo el procedimiento la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente que aumenta el nivel de remielinización en el sujeto en relación con el nivel de remielinización antes de administrar el agente, en donde el agente comprende nalfurafina.

La invención también proporciona un uso de nalfurafina en la fabricación de un medicamento para acelerar la remisión de la EM en un sujeto que lo necesita.

La invención también proporciona nalfurafina para su uso en la aceleración de la remisión de la EM en un sujeto que la necesite.

40 En algunas realizaciones, la cantidad terapéuticamente eficaz de nalfurafina que se administrará a un sujeto humano es de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 5 µg de nalfurafina por día, de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 4 µg, de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 3 µg, de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 2,5 µg, de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 2 µg, de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 1,5 µg, de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 1 µg, de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 0,75 µg, de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 0,5 µg o de aproximadamente 0,25 µg de nalfurafina por día.

45 En algunos casos, la cantidad terapéuticamente eficaz de nalfurafina que se administra a un sujeto humano es de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 2,5 µg de nalfurafina al día, de aproximadamente 0,025 a aproximadamente 2 µg, de aproximadamente 0,05 a aproximadamente 1 µg, de aproximadamente 0,075 a aproximadamente 0,75 µg, de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 0,5 µg, o de aproximadamente 0,225 a

aproximadamente 0,325 µg de nalfurafina al día.

En algunas realizaciones, el procedimiento comprende administrar menos de aproximadamente 1 µg de nalfurafina diariamente, preferiblemente menos de 1 µg de nalfurafina al día.

En algunas realizaciones, la cantidad terapéuticamente eficaz de nalfurafina que se administrará a un sujeto humano es de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 0,1 µg de nalfurafina por día, de aproximadamente 0,025 a aproximadamente 0,075 µg, de aproximadamente 0,06 a aproximadamente 0,04 µg, o de aproximadamente 0,05 µg de nalfurafina por día.

El término "remisión mejorada de la EM", tal como se usa en esta invención, significa que el inicio del procedimiento de remisión se alcanza más rápido y/o la velocidad a la que se logra la remisión es más rápida (en comparación con los sujetos no tratados con nalfurafina).

La remisión de la EM se puede medir usando cualquier técnica conocida en la materia incluidos, entre otros, la discapacidad física, los marcadores biológicos y las gammagrafías cerebrales mediante resonancia magnética.

En un aspecto, la invención proporciona un procedimiento para tratar la EM en un sujeto humano que lo necesite, procedimiento que comprende administrar al sujeto de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 5 mg de nalfurafina al día, de aproximadamente 0,05 a aproximadamente 2,0 mg, de aproximadamente 0,15 a 0,6 mg de nalfurafina al día, en donde el tratamiento da como resultado uno o más resultados clínicos en comparación con sujetos no tratados con nalfurafina seleccionados del grupo que consiste en:

- (a) una disminución de la progresión de la esclerosis múltiple;
- (b) una disminución de la gravedad de la esclerosis múltiple;
- (c) una disminución de la desmielinización de las células nerviosas;
- (d) una disminución de la frecuencia o gravedad de los ataques de esclerosis múltiple recidivantes;
- (e) una disminución de los síntomas clínicos de la EM;
- (f) la curación del tejido nervioso dañado (neurorrestauración);
- (g) un aumento de la remielinización de los nervios desmielinizados del sistema nervioso central (neurorestauración/protección);
- (h) la protección del tejido nervioso dañado contra una mayor actividad patológica (neuroprotección);
- (i) la promoción del crecimiento neuronal (neurorregeneración) en el sistema nervioso central;
- (j) una disminución de la discapacidad causada por la esclerosis múltiple;
- (k) una mejora de la función nerviosa; y
- (l) una mayor tasa de remisión.

En un aspecto, la invención proporciona un procedimiento para tratar la EM en un sujeto humano que lo necesite, el procedimiento comprende administrar al sujeto de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 5 µg de nalfurafina al día, de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 4 µg, de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 3 µg, de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 2,5 µg, de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 2 µg, de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 1,5 µg, de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 1 µg, de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 0,75 µg, de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 0,5 µg, o aproximadamente 0,25 µg de nalfurafina al día, en donde el tratamiento da como resultado uno o más resultados clínicos en comparación con sujetos no tratados con nalfurafina seleccionados del grupo que consiste en:

- (a) una disminución de la progresión de la esclerosis múltiple;
- (b) una disminución de la gravedad de la esclerosis múltiple;
- (c) una disminución de la desmielinización de las células nerviosas;
- (d) una disminución de la frecuencia o gravedad de los ataques de esclerosis múltiple recidivantes;
- (e) una disminución de los síntomas clínicos de la EM;
- (f) la curación del tejido nervioso dañado (neurorrestauración);

(g) un aumento de la remielinización de los nervios desmielinizados del sistema nervioso central (neurorestauración/protección);

(h) la protección del tejido nervioso dañado contra una mayor actividad patológica (neuroprotección);

(i) la promoción del crecimiento neuronal (neurorregeneración) en el sistema nervioso central;

5 (j) una disminución de la discapacidad causada por la esclerosis múltiple;

(k) una mejora de la función nerviosa; y

(l) una mayor tasa de remisión.

En algunos casos, la cantidad terapéuticamente eficaz de nalfurafina que se administra a un sujeto humano es de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 2,5 µg de nalfurafina al día, de aproximadamente 0,025 a 10 aproximadamente 2 µg, de aproximadamente 0,05 a aproximadamente 1 µg, de aproximadamente 0,075 a aproximadamente 0,75 µg, de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 0,5 µg, o de aproximadamente 0,225 a aproximadamente 0,325 µg de nalfurafina al día.

En algunas realizaciones, el procedimiento comprende administrar menos de aproximadamente 1 µg de nalfurafina diariamente, preferiblemente menos de 1 µg de nalfurafina al día.

15 En algunas realizaciones, la cantidad terapéuticamente eficaz de nalfurafina que se administrará a un sujeto humano es de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 0,1 µg de nalfurafina por día, de aproximadamente 0,025 a aproximadamente 0,075 µg, de aproximadamente 0,06 a aproximadamente 0,04 µg, o de aproximadamente 0,05 µg de nalfurafina por día.

20 En otro aspecto, la invención proporciona un procedimiento para tratar una enfermedad desmielinizante en un sujeto que comprende identificar un sujeto que se beneficiaría de un nivel reducido de desmielinización y administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente que disminuye el nivel de desmielinización en relación con el nivel de desmielinización antes de administrar el agente, en donde el agente comprende nalfurafina.

25 En otro aspecto, la invención proporciona un procedimiento para aumentar la remielinización en un sujeto que comprende identificar un sujeto que se beneficiaría de un mayor nivel de remielinización y administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente que aumenta el nivel de remielinización en relación con el nivel de remielinización antes de administrar el agente, en donde el agente comprende nalfurafina.

30 Se contemplan específicamente como realizaciones de la invención descritas en esta invención relacionadas con la nalfurafina para su uso para disminuir la desmielinización, atenuar la desmielinización, acelerar la remisión de la EM, tratar la EM, tratar una enfermedad desmielinizante y aumentar la remielinización están todas las realizaciones de la invención expuestas en esta invención relacionadas con los aspectos de la invención que son procedimientos para disminuir la desmielinización, atenuar la desmielinización y acelerar la remisión de EM, tratamiento de la EM, tratamiento de una enfermedad desmielinizante y aumento de la remielinización.

35 Además, se contemplan específicamente como realizaciones de la invención descrita en este documento relacionadas con el uso de nalfurafina en la fabricación de un medicamento para disminuir la desmielinización, atenuar la desmielinización, acelerar la remisión de la EM, tratar la EM o para aumentar la remielinización todas las realizaciones de la invención expuestas en este documento relacionadas con los aspectos de la invención que son procedimientos para disminuir la desmielinización, atenuar la desmielinización, acelerar la remisión de la EM, tratar la EM, tratar una enfermedad desmielinizante y aumentar la remielinización.

40 Además, en esta invención se contemplan específicamente para todos los aspectos del procedimiento, uso y nalfurafina para el uso citados de la invención todas las realizaciones expuestas en esta invención que se refieren a la terapia de larga duración y a las brechas de dosificación en la terapia de larga duración.

La invención consiste en lo anterior y también prevé construcciones de las que las siguientes proporcionan solo ejemplos y de ninguna manera limitan el alcance de las mismas.

#### 6.4 Ejemplos

45 **Ejemplo 1: La nalfurafina promueve la recuperación funcional de la parálisis cuando se administra terapéuticamente en el modelo de encefalomielitis autoinmune experimental (EAE) de EM.**

50 *Detalle experimental:* Se inmunizaron ratones C57BL/6 hembra por vía subcutánea (s.c.) en los flancos posteriores para inducir la EAE utilizando el péptido 35-55 de la glucoproteína oligodendrocítica (MOG) de mielina (50 mg/ratón) en adyuvante completo de Freund que contenía *Mycobacterium tuberculosis* muerto por calor (500 µg/ratón). Además, la toxina de la tos ferina (200 ng/ratón) se administró por vía intraperitoneal (i.p.) los días 0 y 2. Los ratones se pesaron y se puntuaron diariamente. El día 17 (línea punteada vertical en la Figura 1), se inició el tratamiento diario de los ratones solo con vehículo (Veh; 10 % de Tween y 10 % de DMSO en solución salina) o nalfurafina a dosis de 0,3, 0,1,

0,03 o 0,01 mg/kg mediante inyección intravenosa. La nalfurafina se obtuvo en el Laboratorio Central de Biología Química Sintética de la Universidad de Kansas (97,6 % de pureza mediante HPLC). La asignación del tratamiento fue ciega. La enfermedad se puntuó de 0-5 con 0 (normal), 1 (parálisis parcial de la cola), 2 (parálisis total de la cola), 3 (una extremidad posterior paralizada o discapacidad grave en ambas extremidades posteriores), 4 (parálisis completa de ambas extremidades posteriores) y 5 (moribunda). Este modelo es un modelo de enfermedad estándar para la esclerosis múltiple y se describe en White et al. 2018. *Scientific Reports.* 8:259. En la Figura 1 se muestran los resultados combinados de 2 experimentos independientes. \*\*\*\* p < 0,0001 y \* p < 0,05 mediante ANOVA unidireccional con la prueba de comparación múltiple de Dunnett.

*Interpretación e impacto:* Los resultados demuestran que la nalfurafina es capaz de tratar enfermedades en curso. La reducción de la enfermedad en todos los grupos tratados con nalfurafina indica una recuperación de la parálisis, que es completa con algunas dosis (0,1 y 0,03 mg/kg) y es inusual en este modelo. Finalmente, la dosis a la que la nalfurafina muestra la recuperación más rápida en este ejemplo es de 0,1 mg/kg, y las dosis por encima y por debajo de este nivel parecen menos eficaces.

**Ejemplo 2: La nalfurafina reduce la discapacidad total cuando se administra terapéuticamente en el modelo EAE de la EM**

*Detalle experimental:* La EAE se indujo en ratones C57BL/6 hembra como se describe en el Ejemplo 1. El día 17, se inició el tratamiento diario de los ratones solo con vehículo (Veh) o nalfurafina a dosis de 0,3, 0,1 o 0,03 mg/kg mediante inyección intravenosa. El área bajo la curva (AUC) se calculó para cada ratón basándose en la puntuación diaria de la enfermedad y representa la discapacidad total experimentada. En la Figura 2 se muestran los resultados de un experimento representativo. \* p < 0,05 mediante ANOVA unidireccional con la prueba de comparación múltiple de Dunnett.

*Interpretación e impacto:* A pesar de que todos los grupos de tratamiento tenían puntuaciones de enfermedad similares al inicio del tratamiento (gráfico inferior), los ratones tratados diariamente con nalfurafina tenían una discapacidad total significativamente menor al día 45 después de la inmunización para inducir la EAE (gráfico superior). Las dosis de 0,03 y 0,1 mg/kg de nalfurafina tuvieron el mayor efecto en la reducción de la discapacidad. La dosis de 0,1 mg/kg de nalfurafina reduce la enfermedad en un 60 %.

Sin pretender imponer ninguna teoría, los inventores creen que los resultados del Ejemplo 2 destacan los beneficios del tratamiento con nalfurafina durante un período de al menos una semana. Por consiguiente, en algunos casos, la administración comprende la administración durante al menos 7 días, al menos 14 días, al menos 30 días, al menos 45 días, al menos 60 días, al menos 120 días, al menos 240 días o al menos 360 días.

**Ejemplo 3: La nalfurafina promueve la recuperación de la pérdida de peso inducida por la EAE cuando se administra terapéuticamente.**

*Detalle experimental:* La EAE se indujo en ratones C57BL/6 hembra como se describe en el Ejemplo 1. Los ratones se pesaron diariamente y se calculó el % de cambio en el peso corporal. El día 17 (línea de puntos vertical en la Figura 3), los ratones comenzaron un tratamiento diario con vehículo solamente (Veh) o nalfurafina a 0,3, 0,1 o 0,03 mg/kg mediante inyección i.p.

*Interpretación e impacto:* Como se muestra en la Figura 3, al inicio de la enfermedad, los ratones pierden peso rápidamente. Una vez que se inicia el tratamiento con nalfurafina (línea punteada vertical), los ratones se recuperan de la pérdida de peso inducida por la EAE.

**Ejemplo 4: La nalfurafina reduce la infiltración de las células inmunitarias en el cerebro cuando se administra terapéuticamente en dosis bajas en el modelo EAE de la EM.**

*Detalle experimental:* La EAE se indujo en ratones C57BL/6 hembra como se describe en el Ejemplo 1. El día 17, se inició el tratamiento diario de los ratones solo con vehículo (Veh) o nalfurafina a dosis de 0,3, 0,1 o 0,03 mg/kg mediante inyección intravenosa. El día 45 después de la inmunización para inducir la EAE, se sacrificaron los ratones y se aislaron las células inmunitarias del cerebro. El aislamiento se realizó mediante el gradiente de Percoll como se describe en White et al. 2018. *Informes científicos.* 8:259. Una vez aisladas, las células se tiñeron con anticuerpos marcados con fluorescencia para identificar tipos de células inmunitarias específicos y se analizaron mediante citometría de flujo. Todas las células inmunes infiltradas fueron identificadas por la expresión CD45<sup>high</sup>; células CD4 T fueron identificadas como CD45<sup>high</sup>CD4<sup>+</sup>, y macrófagos como CD45<sup>high</sup>CD11b<sup>+</sup>Gr-1<sup>+</sup>. El número relativo de células se expresa como una relación con la microglía (MG), una célula inmunitaria residente en el cerebro identificada como CD45<sup>medium</sup>CD11b<sup>+</sup> \* p < 0,05 mediante ANOVA unidireccional con la prueba de comparación múltiple de Dunnett.

*Interpretación e impacto:* Como se muestra en la Figura 4, el día 45, hubo una elevación significativa de las células inmunitarias en los cerebros de los ratones con EAE tratados con vehículos en comparación con los animales sanos. El tratamiento con 0,03 mg/kg de nalfurafina redujo significativamente el número de células inmunitarias infiltrantes, lo que sugiere que, a esta dosis, la nalfurafina puede tener propiedades inmunomoduladoras. Curiosamente, si bien los ratones tratados con nalfurafina al 0,1 tenían niveles de células infiltrantes similares a los de los animales tratados con vehículos, estos ratones no presentaban signos evidentes de enfermedad y se habían recuperado por completo de la

parálisis (Figura 1).

**Ejemplo 5: La nalfurafina promueve la recuperación funcional de la parálisis cuando se administra antes del inicio de la parálisis en el modelo EAE de la EM**

*Detalle experimental:* La EAE se indujo en ratones C57BL/6 hembra como se describe en el Ejemplo 1. El día 17 (línea de puntos vertical en la Figura 5), los ratones comenzaron un tratamiento diario con solo vehículo (Veh) o nalfurafina a 0,3, 0,1 o 0,03 mg/kg mediante inyección i.p. En la Figura 5 se muestran los resultados en ratones que no estaban enfermos en el momento del tratamiento pero que desarrollaron la enfermedad más tarde. \* p < 0,05 mediante un ANOVA bidireccional con la prueba de comparación múltiple de Holm-Sidak.

*Interpretación e impacto:* El tratamiento con nalfurafina antes de la aparición de la enfermedad no alteró la aparición de la enfermedad. Sin embargo, el tratamiento con nalfurafina condujo a una rápida recuperación de la parálisis en comparación con los ratones tratados con vehículos. Estos datos sugieren que el tratamiento con nalfurafina también será eficaz para reducir la discapacidad total si se administra antes de la enfermedad, pero es posible que no prevenga la aparición de la enfermedad.

**Ejemplo 6: La mielinización mejora en ratones tratados con nalfurafina después de la aparición de parálisis en el modelo EAE de EM**

*Detalle experimental:* La EAE se indujo en ratones C57BL/6 hembra como se describe en el Ejemplo 1. El día 17, los ratones comenzaron un tratamiento diario con vehículo únicamente o nalfurafina a 0,03 mg/kg mediante inyección i.p. El día 45 después de la inmunización para inducir la EAE, se sacrificaron los ratones y se procesaron las médulas espinales para la microscopía electrónica de transmisión (TEM). En la Figura 6 se muestran imágenes TEM representativas de secciones de la médula espinal de un ratón EAE sano (A), tratado con un vehículo (B) o tratado con nalfurafina (C) teñido para mostrar que la mielina oscura forma anillos alrededor de los axones nerviosos.

*Interpretación e impacto:* El día 45, hubo una reducción significativa de la mielina teñida de oscuro en la médula espinal de los ratones con EAE tratados con un vehículo, lo que sugiere que se ha producido una desmielinización. Además, los axones nerviosos aparecen hinchados y el citoplasma desorganizado, lo que sugiere estrés celular. Por el contrario, los axones nerviosos parecen sanos y bien mielinizados en los ratones tratados con nalfurafina, lo que concuerda con la recuperación funcional completa.

**Ejemplo 7: La nalfurafina mejoró el aumento de peso cuando se administró después de la desmielinización en el modelo de desmielinización con cuprizona**

*Detalle experimental:* Se alimentó a ratones hembra C57BL/6 con cuprizona al 0,3 % en la dieta durante 5 semanas para inducir la desmielinización. Al comienzo de la semana 4 (línea discontinua vertical en la Figura 7), se inició el tratamiento diario de los ratones solo con vehículo o con 0,1 mg/kg de nalfurafina mediante inyección intravenosa. Al comienzo de la semana 5 (línea punteada vertical en la Figura 7), se retiró la cuprizona de la dieta para permitir la remielinización espontánea. Los ratones se pesaron diariamente y se calculó el % de cambio en el peso corporal.

*Interpretación e impacto:* Como se muestra en la Figura 7, la cuprizona provocó una pérdida de peso significativa en ratones, como se informó anteriormente. Esta pérdida de peso se revirtió de manera significativamente más eficaz mediante la administración de nalfurafina que con el vehículo solo.

**Ejemplo 8: La nalfurafina mejora la recuperación funcional de la coordinación y el equilibrio cuando se administra después de la desmielinización en el modelo de desmielinización con cuprizona**

*Detalle experimental:* Se alimentó a ratones hembra C57BL/6 con cuprizona al 0,3 % en la dieta durante 5 semanas para inducir la desmielinización y se trajeron con nalfurafina como se describe en el Ejemplo 7. Pruebas conductuales incluyendo el ensayo con rotarod, que mide la coordinación, se realizaron semanalmente. Los ratones se entrenaron con un aparato de rotarod acelerador (Panlab, Harvard Apparatus) durante un período de 4 a 5 días antes de registrar las latencias basales el día 0, seguidas de mediciones semanales durante el tratamiento y la recuperación con cuprizona. El rotarod se ajustó a 4 rotaciones por minuto (rpm) y una velocidad de aceleración de 40 rpm con un tiempo de corte máximo de 5 minutos. Se registraron el tiempo y la velocidad a la que el animal se cae del rotarod y se registró el promedio de 3 réplicas. Los datos muestran el rendimiento en la semana 9 después del tratamiento con Veh o nalfurafina (0,1 mg/kg) en relación con el rendimiento en la semana 5. \* p < 0,05 según la prueba t de Student.

*Interpretación e impacto:* Como se muestra en la Figura 8, la cuprizona alteró la coordinación en ratones, como se informó anteriormente. La incapacidad inducida por la cuprizona se invirtió mediante la administración de nalfurafina. Estos datos sugieren que la nalfurafina es eficaz para reducir la discapacidad en un modelo de desmielinización no mediada por el sistema inmunitario, como el que se encuentra en algunos pacientes con EM progresiva.

**Ejemplo 9: La nalfurafina mejora la mielinización cuando se administra después de la desmielinización en el modelo de desmielinización con cuprizona**

*Detalle experimental:* Se alimentaron ratones hembra C57BL/6 con 0,3 % de cuprizona en la dieta durante 5 semanas para inducir la desmielinización como se describe en el Ejemplo 7. El día 65, se sacrificaron los ratones y se procesaron los cerebros para la microscopía electrónica de transmisión (TEM). Se muestran imágenes TEM representativas de secciones del cuerpo calloso de un ratón sano (sin cuprizona), tratado con un vehículo y tratado con cuprizona, o tratado con nalfurafina y tratado con cuprizona, teñidas para mostrar los anillos oscuros de mielina alrededor de los axones nerviosos. La mielina se cuantificó mediante la relación  $g$ , que es el diámetro axonal interno dividido por el diámetro exterior total.

*Interpretación e impacto:* Como se muestra en la Figura 9, la cuprizona provocó una pérdida de mielina y una alteración simultánea de las estructuras axonales regulares del cuerpo calloso en comparación con los controles sanos. Por el contrario, se detectó más mielina y la estructura estaba menos desorganizada en el cuerpo calloso de los animales tratados con cuprizona y nalfurafina. Estos datos indican que el tratamiento con nalfurafina promueve la remielinización y la reparación después de una desmielinización no mediada por el sistema inmunitario inducida por la cuprizona. En algunos pacientes con esclerosis múltiple progresiva se produce una desmielinización no inmunitaria similar.

**Ejemplo 10: La nalfurafina promueve la recuperación funcional de la parálisis cuando se administra terapéuticamente en el modelo de encefalomielitis autoinmune experimental (EAE) de EM**

*Detalle experimental:* La EAE se indujo en ratones C57BL/6 hembra como se describe en el Ejemplo 1. Los resultados se muestran en la Figura 10. El día del inicio de la enfermedad (puntuación  $\geq 1$ , línea punteada), se inició el tratamiento diario de los ratones solo con vehículo (Veh) o nalfurafina a dosis de 0,3, 0,1, 0,03, 0,01 o 0,003 mg/kg mediante inyección intravenosa. La asignación del tratamiento fue ciega. Se muestran las puntuaciones alineadas de los ratones ( $n = 33$  en los grupos Veh, 3 en 0,3, 4 en 0,1, 5 en 0,03, 20 en 0,01 y 4 en los grupos de 0,003 mg/kg) a partir del inicio del tratamiento. Un animal del grupo de 0,3 mg/kg de nalfurafina y 2 del grupo de vehículos fueron sacrificados los días 17-18.  $****p < 0,0001$  mediante ANOVA bidireccional en todas las dosis (excepto 0,3 mg/kg) en comparación con el vehículo.

*Interpretación e impacto:* Al tratar después de la aparición de la enfermedad (parálisis), demostramos que la nalfurafina es capaz de tratar una enfermedad en curso. La reducción de la enfermedad en todos los grupos tratados con nalfurafina indica una recuperación de la parálisis, que es completa con algunas dosis (0,01 y 0,03 mg/kg); la recuperación total de la enfermedad es inusual en este modelo y la eficacia del tratamiento con nalfurafina es sorprendente. Finalmente, la dosis a la que la nalfurafina muestra la recuperación más rápida en este ejemplo es de 0,01 mg/kg, y este hallazgo se ha repetido en 6 experimentos independientes.

**Ejemplo 11: La nalfurafina no es eficaz cuando se administra como un ciclo corto de 4 días que comienza con el inicio de la enfermedad en un modelo de EM con EAE.**

*Detalle experimental:* La EAE se indujo en ratones C57BL/6 hembra como se describe en el Ejemplo 1. Los resultados se muestran en la Figura 11. El día del inicio de la enfermedad (puntuación  $\geq 1$ , línea punteada), se inició el tratamiento diario de los ratones solo con vehículo o con nalfurafina a razón de 0,01 mg/kg mediante inyección intravenosa todos los días durante el curso experimental o solo durante cuatro días (zona sombreada). Se muestran las puntuaciones alineadas de los ratones ( $n = 5$ /grupo) a partir del inicio/inicio del tratamiento.  $**p < 0,01$  mediante ANOVA NalF bidireccional (tratamiento completo) en comparación con nalfurafina (4 días) o vehículo.

*Interpretación e impacto:* El tratamiento con nalfurafina no mejora la recuperación cuando se administra solo durante cuatro días a partir del inicio de la enfermedad, mientras que el tratamiento con una duración más prolongada sí mejora la recuperación de manera eficaz.

**Ejemplo 12: La nalfurafina no altera el pico de la enfermedad cuando se administra terapéuticamente en el modelo EAE de EM.**

*Detalle experimental:* La EAE se indujo en ratones C57BL/6 hembra como se describe en el Ejemplo 1. Los resultados se muestran en la Figura 12. El día del inicio de la enfermedad (puntuación  $\geq 1$ ), los ratones comenzaron un tratamiento diario con vehículo solo o nalfurafina a 0,3, 0,1, 0,03, 0,01 o 0,003 mg/kg mediante inyección i.p. Se registró la puntuación máxima de la enfermedad durante el primer episodio de EAE y se muestran la media y el error estándar de los ratones individuales ( $n = 33$  en los grupos de Veh, 3 en 0,3, 4 en 0,1, 5 en 0,03, 20 en 0,01 y 4 en 0,003 mg/kg). No se encontraron diferencias significativas entre la dosis de nalfurafina y el vehículo de Kruskal-Wallis con la prueba de comparación múltiple de Dunn. Estos datos provienen de los mismos experimentos que en el Ejemplo 10.

*Interpretación e impacto:* Como no se encontró ninguna diferencia en la puntuación máxima de la enfermedad con ninguna dosis de nalfurafina en comparación con la del vehículo, la nalfurafina no pareció alterar el episodio neuroinflamatorio inicial mediado por el sistema inmunitario que conduce a la desmielinización y la parálisis. Este hallazgo sugiere que la mejora funcional observada (es decir, la recuperación de la parálisis) se produce porque la lesión inicial se ha reparado y quizás no porque la lesión inicial en sí misma se haya detenido.

**Ejemplo 13: La nalfurafina promueve la recuperación completa de la parálisis inducida por EAE cuando se administra terapéuticamente.**

*Detalle experimental:* La EAE se indujo en ratones C57BL/6 hembra como se describe en el Ejemplo 1. Los resultados se muestran en la Figura 13. El día del inicio de la enfermedad (puntuación  $\geq 1$ ), los ratones comenzaron un tratamiento diario con vehículo solo o nalfurafina a 0,3, 0,1, 0,03, 0,01 o 0,003 mg/kg mediante inyección i.p. Los ratones se consideraron recuperados si recibieron una puntuación  $\leq 0,5$  el día 23 después del inicio del tratamiento. Se muestran los porcentajes de ratones de cada grupo que se recuperaron ( $n = 33$  en los grupos de Veh, 3 en 0,3, 4 en 0,1, 5 en 0,03, 20 en 0,01 y 4 en los de 0,003 mg/kg).  $****p < 0,0001$ ,  $**p < 0,01$  y  $*p < 0,05$  según la prueba exacta de Fisher. Estos datos provienen de los mismos experimentos que en el Ejemplo 10.

*Interpretación e impacto:* el tratamiento con nalfurafina permite una recuperación funcional completa (es decir, sin parálisis) cuando se administra terapéuticamente y en una amplia gama de dosis (entre 0,003 y 0,1 mg/kg muestran un efecto significativo). La recuperación total en este modelo de enfermedad es inusual. La eficacia lograda con el tratamiento de la nalfurafina es extraordinaria.

**Ejemplo 14: La nalfurafina promueve la recuperación completa de la parálisis inducida por EAE cuando se administra terapéuticamente con una EC<sub>50</sub> de <0,001 mg/kg.**

*Detalle experimental:* La EAE se indujo en ratones C57BL/6 hembra como se describe en el Ejemplo 1. Los resultados se muestran en la Figura 14. El día del inicio de la enfermedad (puntuación  $\geq 1$ ), los ratones comenzaron un tratamiento diario con vehículo solamente o nalfurafina a 0,1, 0,03, 0,01 o 0,003 mg/kg mediante inyección i.p. Los ratones se consideraron recuperados si recibieron una puntuación  $\leq 0,5$  el día 23 después del inicio del tratamiento. Se muestran los porcentajes de ratones en cada grupo que se recuperaron ( $n = 33$  en el grupo Veh, 4 en el grupo 0,1, 5 en el grupo 0,03, 20 en el grupo 0,01 y 4 en el grupo 0,003 mg/kg). Se ha ajustado una curva dosis-respuesta desde una dosis de 0,1 mg/kg, donde se recuperó el 100 %, hasta el vehículo solo, donde se recuperó el 12,1 %. Esta curva calcula una EC<sub>50</sub> de <0,001 mg/kg. Estos datos provienen de los mismos experimentos que en el Ejemplo 13.

*Interpretación e impacto:* El tratamiento con nalfurafina permite una recuperación funcional completa (es decir, sin parálisis) cuando se administra de forma terapéutica y en un amplio intervalo de dosis (0,003-0,1 mg/kg muestran un efecto significativo). La recuperación total en este modelo de enfermedad es inusual. La eficacia lograda con el tratamiento de la nalfurafina es extraordinaria. Para lograr el 50% de este efecto (es decir, EC<sub>50</sub>) se requiere una dosis estimada de <0,001 mg/kg.

**Ejemplo 15: La nalfurafina promueve la recuperación funcional sostenida de la parálisis inducida por EAE cuando se administra terapéuticamente.**

*Detalle experimental:* La EAE se indujo en ratones C57BL/6 hembra como se describe en el Ejemplo 1. Los resultados se muestran en la Figura 15. El día del inicio de la enfermedad (puntuación  $\geq 1$ ), los ratones comenzaron un tratamiento diario con vehículo solo o nalfurafina a 0,3, 0,1, 0,03, 0,01 o 0,003 mg/kg mediante inyección i.p. Los ratones se consideraron recuperados si recibieron una puntuación  $\leq 0,5$  el día 23 después del inicio del tratamiento. Se muestra el número de días que los ratones estuvieron en recuperación en cada grupo ( $n = 33$  en los grupos de Veh, 3 en 0,3, 4 en 0,1, 5 en 0,03, 20 en 0,01 y 4 en los de 0,003 mg/kg).  $****p < 0,0001$ ,  $**p < 0,01$  y  $*p < 0,05$  mediante ANOVA unidireccional con la prueba de comparación múltiple de Holm-Sidak. Estos datos provienen de los mismos experimentos que en el Ejemplo 10.

*Interpretación e impacto:* El tratamiento con nalfurafina permite una recuperación funcional sostenida (es decir, sin parálisis) cuando se administra de forma terapéutica y en un amplio intervalo de dosis (0,003-0,1 mg/kg muestran todas un efecto significativo).

**Ejemplo 16: La nalfurafina promueve la recuperación funcional de la parálisis en ratones machos cuando se administra terapéuticamente en el modelo EAE de EM.**

*Detalle experimental:* Se indujo EAE en ratones machos C57BL/6 como se describe en el Ejemplo 1. Los resultados se muestran en la Figura 16. El día del inicio de la enfermedad (puntuación  $\geq 1$ , línea), los ratones comenzaron un tratamiento diario con vehículo únicamente o nalfurafina a 0,01 mg/kg mediante inyección i.p. La asignación del tratamiento fue ciega. Se muestran las puntuaciones alineadas de los ratones ( $n = 5$ /grupo) a partir del inicio/inicio del tratamiento.  $****p < 0,0001$  mediante ANOVA bidireccional en comparación con el vehículo.

*Interpretación e impacto:* La nalfurafina es eficaz para permitir la recuperación funcional de la parálisis tanto en mujeres como en hombres.

**Ejemplo 17: La nalfurafina promueve la recuperación completa en ratones machos cuando se administra terapéuticamente en el modelo EAE de EM.**

*Detalle experimental:* Se indujo EAE en ratones machos C57BL/6 como se describe en el Ejemplo 1. Los resultados se muestran en la Figura 17. El día del inicio de la enfermedad (puntuación  $\geq 1$ ), los ratones comenzaron un tratamiento diario con vehículo únicamente o nalfurafina a 0,01 mg/kg mediante inyección i.p. Los ratones se consideraron

recuperados si recibieron una puntuación  $\leq 0,5$  el día 23 después del inicio del tratamiento. Se muestran los porcentajes de ratones en cada grupo que se recuperaron ( $n = 5$ /grupo).  $^{**}p < 0,01$  según la prueba exacta de Fisher. Estos datos provienen de los mismos experimentos que en el Ejemplo 16.

5 *Interpretación e impacto:* El tratamiento con nalfurafina promueve la recuperación total (es decir, sin parálisis) tanto en mujeres como en hombres cuando se administra terapéuticamente.

**Ejemplo 18: La nalfurafina promueve una recuperación sostenida en ratones machos de la parálisis inducida por EAE cuando se administra terapéuticamente.**

*Detalle experimental:* Se indujo EAE en ratones machos C57BL/6 como se describe en el Ejemplo 1. Los resultados se muestran en la Figura 18. El día del inicio de la enfermedad (puntuación  $\geq 1$ ), los ratones comenzaron un tratamiento diario con vehículo únicamente o nalfurafina a 0,01 mg/kg mediante inyección i.p. Los ratones se consideraron recuperados si recibieron una puntuación  $\leq 0,5$  el día 23 después del inicio del tratamiento. Se muestra el número de días que los ratones estuvieron en recuperación en cada grupo ( $n = 5$ /grupo).  $^{****}p < 0,0001$  según la prueba t del estudiante. Estos datos provienen de los mismos experimentos que en el Ejemplo 16.

10 15 *Interpretación e impacto:* El tratamiento con nalfurafina permite una recuperación funcional sostenida (es decir, sin parálisis) tanto en mujeres como en hombres cuando se administra terapéuticamente.

**Ejemplo 19: El tratamiento con nalfurafina reduce la infiltración de células inmunes en el cerebro cuando se administra terapéuticamente en el modelo EAE de EM (A), mientras que el U-50488 no lo hace (B).**

*Detalle experimental:* Se indujo EAE en ratones hembra C57BL/6 como se describe en el Ejemplo 1. Los resultados se muestran en las Figuras 19A y 19B. El día del inicio de la enfermedad (puntuación  $\geq 1$ ), los ratones comenzaron un tratamiento diario con vehículo solo o nalfurafina a 0,3, 0,1, 0,03, 0,01 o 0,003 mg/kg mediante inyección i.p. (A). En un experimento separado, los ratones se trataron de manera similar con el vehículo solo o con U-50488, un agonista de la KOR a 1,6 y 5 mg/kg (B). Durante la fase crónica ( $>24$  días después del inicio del tratamiento), se sacrificaron los ratones y se aislaron las células inmunitarias del cerebro. El aislamiento se realizó mediante gradiente de Percoll como se describe en White *et al.* 2018.

20 25 30 Informes científicos. 8:259. Una vez aisladas, las células se tiñeron con anticuerpos marcados con fluorescencia para identificar tipos de células inmunitarias específicos y se analizaron mediante citometría de flujo. Todas las células inmunitarias infiltrantes se identificaron por la expresión CD45<sup>high</sup>. El número relativo de células se expresa como una relación con la microglía (MG), una célula inmunitaria residente en el cerebro identificada como CD45<sup>medium</sup>CD11b<sup>+</sup>.  $^{*}p < 0,05$  mediante un ANOVA unidireccional con la prueba de comparación múltiple de Holm-Sidak en comparación con el vehículo. NS, no es significativo.

35 *Interpretación e impacto:* En la fase crónica de la EAE, hubo un aumento significativo de las células inmunitarias en el cerebro de los ratones con EAE tratados con un vehículo en comparación con los de los animales sanos (A). El tratamiento con 0,03 y 0,01 mg/kg de nalfurafina redujo significativamente el número de células inmunes infiltradas, lo que sugiere que a estas dosis, la nalfurafina puede tener propiedades inmunomoduladoras. Curiosamente, aunque los ratones tratados con 0,1 y 0,003 de nalfurafina tenían niveles similares de células infiltradas que los animales tratados con el vehículo, estos ratones no presentaban signos evidentes de enfermedad y se habían recuperado completamente de la parálisis (Figura 13). Además, la nalfurafina, pero no el U-50488, redujo la neuroinflamación en este modelo, lo que indica que no todos los agonistas de la KOR tienen esta actividad (B).

40 **Ejemplo 20: La mielinización mejora en ratones tratados con nalfurafina después de la aparición de parálisis en el modelo EAE de EM.**

*Detalle experimental:* La EAE se indujo en ratones C57BL/6 hembra como se describe en el Ejemplo 1. Los resultados se muestran en la Figura 20. El día del inicio de la enfermedad (puntuación  $\geq 1$ ), los ratones comenzaron un tratamiento diario con vehículo solamente o nalfurafina a 0,03 o 0,01 mg/kg mediante inyección i.p. Durante la fase crónica ( $>24$  días después del inicio del tratamiento), los ratones se sacrificaron, se perfundieron con paraformaldehído al 4 % y la médula espinal se procesó para su histología. Las secciones se tiñeron con luxol fast blue para evaluar el % de área de la médula espinal que está desmielinizada (es decir, no se tine con luxol fast blue). El % de desmielinización se evaluó usando ImageJ. Se muestran las medias y el error estándar de los valores individuales de ratones con EAE tratados con nalfurafina con el vehículo ( $n=7$ ) o 0,01 ( $n=6$ ) y 0,03 ( $n=4$ ).  $^{**}p < 0,01$  por ANOVA de una vía con prueba de comparación múltiple de Holm-Sidak.

45 50 *Interpretación e impacto:* Durante la fase crónica, cuando la nalfurafina permitió la recuperación funcional completa en ratones, hubo una reducción significativa en el porcentaje de desmielinización en la médula espinal de los ratones con EAE tratados con nalfurafina, lo que sugiere que podría haberse producido una remielinización.

**Ejemplo 21: La nalfurafina no altera la proporción de las principales poblaciones de linfocitos en el bazo durante la fase crónica de la EAE.**

*Detalle experimental:* La EAE se indujo en ratones C57BL/6 hembra como se describe en el Ejemplo 1. Los resultados se muestran en la Figura 21. El día del inicio de la enfermedad (puntuación >1), los ratones comenzaron un tratamiento diario con vehículo únicamente o nalfurafina a 0,01 mg/kg mediante inyección i.p. Durante la fase crónica (27 días después del inicio del tratamiento), se sacrificaron los ratones y se evaluaron sus esplenocitos mediante citometría de flujo. El porcentaje de las principales poblaciones de linfocitos se identificó utilizando CD4 (células T auxiliares CD4), CD8 (células T citotóxicas CD8) y B220 (células B), y se expresó como % de leucocitos vivos (es decir, células CD45+). Se muestran las medias y el error estándar de ratones individuales con n=3 (sano), 4 (vehículo) y 8. No se encontraron diferencias significativas entre el vehículo y el sano o la nalfurafina mediante un ANOVA unidireccional con la prueba de comparación múltiple de Holm-Sidak.

*Interpretación e impacto:* La nalfurafina no altera la proporción de las principales poblaciones de linfocitos en el bazo, a pesar de reducir el número de células inmunitarias que se infiltran en el sistema nervioso central. El mantenimiento de un número normal de linfocitos en el bazo en los ratones tratados con nalfurafina indica que la nalfurafina no reduce la infiltración de células inmunitarias en el cerebro al destruir las células inmunitarias.

**Ejemplo 22: La nalfurafina no altera el número total de células T CD4 auxiliares en el bazo, pero cambia las células T CD4 de un estado efector a un estado de memoria, lo que sugiere una resolución inmune durante la fase crónica de la EAE.**

*Detalle experimental:* La EAE se indujo en ratones C57BL/6 hembra como se describe en el Ejemplo 1. Los resultados se muestran en la Figura 22. El día del inicio de la enfermedad (puntuación >1), los ratones comenzaron un tratamiento diario con vehículo únicamente o nalfurafina a 0,01 mg/kg mediante inyección i.p. Durante la fase crónica (27 días después del inicio del tratamiento), se sacrificaron los ratones y se evaluaron sus esplenocitos mediante citometría de flujo. Las células T CD4 vírgenes (CD4+CD44-CD62L<sup>high</sup>), las células T CD4 efectoras (CD4+CD44+CD62L-), y las células T CD4 de memoria central (CD4+CD44+CD62L<sup>high</sup>) se expresan como % de células T CD4. La "relación TEFF: cm" es la relación entre las células T efectoras y las células T de memoria central. Se muestran las medias y el error estándar de ratones individuales con n=3 (sanos), 4 (vehículo) y 8. \*\*p<0,01 y \*p<0,05 por ANOVA de una vía con prueba de comparación múltiple de Holm-Sidak.

*Interpretación e impacto:* El aumento de la relación entre el efector y la memoria central en los ratones tratados con un vehículo con EAE en comparación con los ratones sanos indica una respuesta inmunitaria activa y continua mediada por las células T CD4. El número total de células T CD4 fue el mismo entre los ratones tratados con nalfurafina y con vehículo. La proporción reducida en los ratones tratados con nalfurafina en comparación con los ratones tratados con vehículos indica un cambio hacia un fenotipo de memoria que se produce durante la fase de resolución de la respuesta inmunitaria. El cambio a un estado de memoria indica que la resolución inmunitaria se está produciendo en ratones tratados con nalfurafina en un modelo de esclerosis múltiple donde la enfermedad es impulsada por una respuesta inmunitaria activa.

**Ejemplo 23: La nalfurafina reduce la enfermedad pero no permite una recuperación completa cuando el receptor opioide kappa (KOR) está bloqueado.**

*Detalle experimental:* La EAE se indujo en ratones C57BL/6 hembra como se describe en el Ejemplo 1. Los resultados se muestran en la Figura 23. El día del inicio de la enfermedad (puntuación >1, línea punteada), los ratones se trataron solo con vehículo (diariamente), nalfurafina (0,01 mg/kg mediante inyección intravenosa diaria), el antagonista del KOR norBNI (10 mg/kg mediante inyección intravenosa semanalmente) o con nalfurafina y norBNI. Se muestran las puntuaciones alineadas de los ratones (n = 8-9/grupo) a partir del inicio del tratamiento. \*\*\*\*p<0,0001 mediante ANOVA bidireccional NaIF en comparación con el vehículo o NaIF+noBNI.

*Interpretación e impacto:* La administración del antagonista del KOR, norBNI, anula la capacidad de la nalfurafina para permitir la recuperación total de la parálisis (es decir, una puntuación < 0,5), y este hallazgo indica que el KOR es necesario para que la nalfurafina produzca todos los efectos. El descubrimiento de que la nalfurafina es eficaz para reducir la enfermedad independientemente de la KOR (es decir, en presencia de norBNI) indica que el mecanismo completo por el que la nalfurafina ejerce sus efectos es más complejo que la activación de la KOR.

**Ejemplo 24: La activación del KOR es necesaria para la recuperación completa de la parálisis mediada por nalfurafina.**

*Detalle experimental:* La EAE se indujo en ratones C57BL/6 hembra como se describe en el Ejemplo 1. Los resultados se muestran en la Figura 24. El día del inicio de la enfermedad (puntuación >1, línea punteada), los ratones se trataron solo con vehículo (diariamente), nalfurafina (0,01 mg/kg mediante inyección intravenosa diaria), el antagonista del KOR norBNI (10 mg/kg mediante inyección intravenosa semanalmente) o con nalfurafina y norBNI. Se registró la puntuación máxima de la enfermedad durante el primer episodio de EAE, y se consideró que los ratones se habían recuperado si habían recibido una puntuación inferior a 0,5 el día 23 después del inicio del tratamiento. Se muestran las puntuaciones máximas de la enfermedad, el porcentaje de ratones de cada grupo que se recuperaron y el número de días de recuperación (n = 8-9 por grupo). \*\*p<0,01 y \*\*\*\*p<0,0001 mediante la prueba exacta de Fisher (%

recuperado) o ANOVA unidireccional con la prueba de comparación múltiple de Holm-Sidak (número de días de recuperación). Estos datos provienen de los mismos experimentos que en el Ejemplo 23.

*Interpretación e impacto:* La administración del antagonista de KOR, norBNI, elimina la capacidad de la nalfurafina de permitir y sostener la recuperación de la parálisis (es decir, puntuación < 0,5), y este hallazgo indica que el KOR es necesario para el efecto completo de la nalfurafina en la promoción de la recuperación completa, pero no en la reducción de la enfermedad.

**Ejemplo 25: La mielinización mejora en ratones tratados con nalfurafina después de la aparición de parálisis en el modelo EAE de EM.**

*Detalle experimental:* La EAE se indujo en ratones C57BL/6 hembra como se describe en el Ejemplo 1. Los resultados se muestran en la Figura 25. El día del inicio de la enfermedad (puntuación  $\geq 1$ ), los ratones comenzaron un tratamiento diario con vehículo únicamente o nalfurafina 0,01 mg/kg mediante inyección i.p. Durante la fase crónica ( $>24$  días después del inicio del tratamiento), los ratones se sacrificaron, se perfundieron con paraformaldehído al 4 % y la médula espinal se procesó para su histología. Las secciones se tiñeron con luxol fast blue para evaluar la desmielinización. La región de interés tomada para el análisis se muestra en 25A. Obsérvese la presencia de regiones desmielinizadas (lesiones) con menos tinción de luxol con azul rápido (LFB) (mielina) en el cuerno ventral en los ratones con EAE que recibieron el vehículo (círculo - 25B) y la ausencia de lesiones desmielinizadas en los ratones tratados con nalfurafina (25C). Los datos cuantificados se muestran en 25D. Para cada imagen, se analizaron 5 regiones aleatorias del asta ventral de la médula espinal en ImageJ utilizando el valor de gris medio y la densidad de píxeles integrada como indicador de la densidad de mielina. Los datos provienen de dos experimentos individuales con ratones EAE  $n=4$  (vehículo) y  $n=8$  (nalfurafina), respectivamente. Barra de escala = 50  $\mu\text{m}$ . \*  $p < 0,05$  según la prueba t de Student.

*Interpretación e impacto:* La EAE induce lesiones extensas en la médula espinal (véase únicamente el vehículo (25B)), que se caracterizan por una pérdida de mielina y una neurodegeneración, lo que demuestra que la EAE es una enfermedad destructiva del SNC. El tratamiento de este estado patológico con nalfurafina reduce la carga de lesiones y la desmielinización, lo que sugiere que el tratamiento restaura el tejido de la médula espinal a un estado casi normal mediante la remielinización.

**Ejemplo 26: El tratamiento con nalfurafina disminuye la infiltración celular en la médula espinal cuando se administra terapéuticamente en el modelo EAE de EM.**

*Detalle experimental:* La EAE se indujo en ratones C57BL/6 hembra como se describe en el Ejemplo 1. Los resultados se muestran en la Figura 26. El día del inicio de la enfermedad (puntuación  $>1$ ), los ratones comenzaron un tratamiento diario con vehículo únicamente o nalfurafina 0,01 mg/kg mediante inyección i.p. Durante la fase crónica ( $>24$  días después del inicio del tratamiento), los ratones fueron sacrificados, perfundidos con paraformaldehído al 4 % y las médulas espinales fueron incluidas en parafina para histología. Se tiñeron secciones coronales de 10  $\mu\text{m}$  con hematoxilina y eosina (H&E) para evaluar la infiltración de leucocitos, un marcador de inflamación dentro de las lesiones inducidas por la enfermedad de EAE. Obsérvese la gran cantidad de leucocitos presentes en el cuerno ventral de los ratones con EAE tratados con el vehículo, que en los ratones con EAE a los que se les administró nalfurafina. Un observador ciego puntuó las imágenes para determinar el nivel de infiltración en una escala que oscilaba entre 0 (sin infiltración) y 3 (infiltración máxima). Los datos provienen de dos experimentos individuales:  $n=7$  ratones (11 secciones) para el vehículo EAE; y  $n=9$  ratones (13 secciones) para los ratones EAE tratados con nalfurafina. Barra de escala = 50  $\mu\text{m}$ . Prueba t de Student, \* $p<0,05$ .

*Interpretación e impacto:* La enfermedad por EAE induce una histopatología sustancial en la médula espinal. La tinción H&E de los leucocitos es un indicador de la gravedad de la lesión, ya que cuanto mayor sea el número de células infiltrantes, más grave será la lesión. Incluida la desmielinización, como se muestra en el panel exclusivo del vehículo y mediante cuantificación. El tratamiento con nalfurafina muestra una reducción sorprendente de los leucocitos infiltrantes, con una ausencia casi total de lesiones y desmielinización, lo que indica que el tratamiento puede resolver las lesiones y/o provocar remielinización.

**Ejemplo 27: El tratamiento con nalfurafina reduce el nivel de astrocitos activados en la médula espinal cuando se administra terapéuticamente en el modelo EAE de EM.**

*Detalle experimental:* La EAE se indujo en ratones C57BL/6 hembra como se describe en el Ejemplo 1. Los resultados se muestran en la Figura 27A-B. El día 17, los ratones comenzaron un tratamiento diario con vehículo únicamente o nalfurafina a 0,01 mg/kg mediante inyección i.p. El día 45 después de la inmunización para inducir la EAE, se sacrificaron los ratones y se procesaron las médulas espinales para su inmunohistoquímica (IHC). En la Figura 27A se muestran células inmunomarcadas representativas de la proteína del ácido fíbrilar glial (GFAP) (tinción negra) de secciones coronales del asta ventral de la médula espinal tomadas de ratones con EAE. Las imágenes son de secciones incrustadas en parafina de 10  $\mu\text{m}$ , teñidas con Anti-GFAP de conejo en (1: 1000, DAKO) antes de fotografiarse con un aumento de 20x, barra de escala = 50  $\mu\text{m}$ . El número de astrocitos por sección en una ROI estándar se contó utilizando el complemento de contador de células de ImageJ. Se evaluaron dos secciones por animal. Las secciones evaluadas  $n=7$  (10-13 secciones), de 2 experimentos individuales. \*\*\* $p=,0003$  (Figura 27B).

**Interpretación e impacto:** Como se muestra y cuantifica en la Figura 27A, el día 45, hubo una elevación significativa de los astrocitos GFAP<sup>+</sup> activados en la médula espinal de los ratones con EAE tratados con vehículos. Se reconoce que los astrocitos son actores tempranos y altamente activos durante la formación de las lesiones y son clave para proporcionar a las células inmunitarias periféricas acceso al sistema nervioso central (Ponath et al. The Role of Astrocytes in Multiple Sclerosis. *Front Immunol.* 2018; 9: 217). El tratamiento con 0,01 mg/kg de nalfurafina por vía intravenosa reduce significativamente el número de astrocitos activados, lo que sugiere que el tratamiento con nalfurafina puede tener un efecto neuroprotector y antiinflamatorio en el tejido de la médula espinal en el estado patológico (Figura 27B).

**Ejemplo 28: El tratamiento con nalfurafina mejora la recuperación de la pérdida de peso cuando se administra terapéuticamente en el modelo de enfermedad de desmielinización por cuprizona de EM.**

La Figura 28A muestra una evolución temporal del régimen de desmielinización y tratamiento inducido por cuprizona.

**Detalles experimentales:** Se indujo un estado de enfermedad desmielinizante en ratones C57BL/6 hembras (de 8 a 14 semanas de edad y entre 17 y 23 gramos de peso). Como se muestra en la cronología de la Figura 28A, los ratones fueron alimentados con pienso que contenía cuprizona (cuprizona al 0,3 % (p/p)) o solo pienso (controles normales) durante 35 días, momento donde se volvieron a cambiar a pienso estándar. El día 28, se inició el tratamiento diario de los ratones solo con vehículo (DMSO: Tween 80: Solución salina) o nalfurafina a 0,1 mg/kg por inyección intravenosa o U-50488 a 1,6 mg/kg por inyección intravenosa. El día 70, se sacrificaron los ratones y se procesó el tejido cerebral para microscopía electrónica de transmisión (MET). Los ratones se pesaron diariamente y se calculó el % de cambio en el peso corporal.

**Interpretación e impacto:** Este modelo está bien establecido como una herramienta para el estudio de la desmielinización inducida por el sistema no inmunitario. Este modelo permite la evaluación de posibles terapias promotoras de la remielinización (Matsushima and Morell, 2001. The neurotoxicant, cuprizone, as a model to study demyelination and remyelination in the central nervous system. *Brain Pathol.* 11, 107-116).

La Figura 28B muestra el cambio de peso inducido por la cuprizona a lo largo del tiempo del estudio.

**Detalles experimentales:** Se indujo un estado patológico desmielinizante en ratones C57BL/6 hembra tal como se describe en el ejemplo 28 y se ilustra en la Figura 28.

**Interpretación e impacto:** Los ratones tratados con cuprizona (CPZ) al 0,3 % pierden peso a medida que se induce la enfermedad, en comparación con los ratones con una dieta normal, según la inducción y la gravedad de la enfermedad.

La Figura 28C muestra que el tratamiento con nalfurafina mejora el aumento de peso en la fase de recuperación del modelo de enfermedad por desmielinización por cuprizona de la EM, mientras que el U-50488 no lo hace.

**Detalles experimentales:** Se indujo un estado de enfermedad desmielinizante en ratones hembra C57BL/6 como se describe en la Figura 28C. Los animales enfermos se trataron solo con Vehicle, nalfurafina (0,1 mg/kg) y U-50488 (1,6 mg/kg) como se describe en la Figura 28A. Los ratones se pesaron diariamente y se calculó el % de cambio en el peso corporal. \*p<0,05 = ratones tratados con nalfurafina; #p <0,05 = ratones tratados con U-50488. ANOVA de medidas repetidas bidireccionales, seguido de las pruebas de comparación múltiple de Turkey. (n=15 ratones/grupo de 3 réplicas experimentales. ANOVA reveló una interacción significativa F(40, 600) =2,212 (p<0,0001) con un tiempo significativo F(8, 600)=101,2 (p<0,0001) y efectos del tratamiento F(5,75)=5,52 (P<0,0002).

**Interpretación e impacto:** Los ratones tratados con cuprizona (CPZ) al 0,3 % pierden peso a medida que se induce la enfermedad. Los ratones se recuperan cuando vuelven a su alimentación normal (eliminación de la cuprizona) (Figura 28C). El tratamiento con nalfurafina mejora la recuperación del peso perdido más rápidamente en comparación con los ratones con solo vehículo o el tratamiento con U-50488.

**Figura 29: El tratamiento con nalfurafina mejora la remielinización cuando se administra después de la desmielinización en el modelo de EM con enfermedad de desmielinización por cuprizona**

**Detalles experimentales:** Se indujo un estado de enfermedad desmielinizante en ratones hembra C57BL/6 como se ilustra en la Figura 28A. Los resultados se muestran en la Figura 29A-G. Los paneles A-D de la Figura 29 muestran imágenes representativas de microscopía electrónica de transmisión (TEM) del cuerpo caloso de ratones (A) alimentados con una dieta normal y (B-D) alimentados con cuprizona al 0,3 % para inducir la desmielinización. Tras el transcurso temporal mostrado en la Figura 28A, a los ratones alimentados con cuprizona se les administró (B) tratamiento solo con vehículo, (C) U-50488 (1,6 mg/kg/i.p.) y (D) nalfurafina (0,1 mg/kg/i.p.) y luego se sacrificaron el día experimental 70. Las barras de escala representan 2000 nm.

La Figura 29 (E) muestra la cuantificación y el análisis de las proporciones g y muestra una diferencia significativa entre los grupos de tratamiento F (3.953)=21,18 (p <0,0001). Los ratones alimentados con una dieta normal tienen una relación g media de  $0,78 \pm 0,09$ , en contraste con los ratones alimentados con cuprizona al 0,3%, que tienen un aumento significativo en la relación g de  $0,84 \pm 0,1$ , lo que corresponde a la disminución del grosor de la mielina (####p <0,0001). Ratones alimentados con una dieta con cuprizona tratados con nalfurafina (0,1 mg/kg/i.p.) ( $0,75 \pm 0,15$ )

5 muestran una reducción significativa en la relación  $g$  en comparación con los controles tratados con Vehicle (\*\*\* $p<0,0001$ ), lo que corresponde a un aumento del grosor de la mielina. Los ratones alimentados con una dieta con cuprizona tratados con U-50488 mostraron un aumento del grosor de la mielina en comparación con los controles tratados en vehículos con una relación  $g$  media de (0,80) (\*\* $p<0,01$ ), pero, sorprendentemente, el tratamiento con nalfurafina mostró un aumento significativo del grosor de la mielina (disminución de la relación  $g$ ) en comparación con los ratones tratados con U-50488 (1,6 mg/kg/ i.p.) (^^ $p<0,001$ ), lo que indica que la nalfurafina es significativamente más eficaz para aumentar el grosor de la mielina que la U-50488. Los datos representan las mediciones de 5 imágenes TEM del cuerpo caloso de dos a tres ratones por grupo de tratamiento y las relaciones  $g$  calculadas (una medida del grosor de la mielina) utilizando el software Image J. El análisis fue realizado por personas ciegas a los grupos de tratamiento. (n= 204-267 axones por grupo de tratamiento).

10 La Figura 29 (F) muestra la cuantificación y el análisis del número de axones mielinizados frente a los axones no mielinizados en una región de interés ( $390 \mu\text{m}^2$ ). n= 20 imágenes por grupo de tratamiento (de n=2-3 ratones).

15 La Figura 29 (G) muestra la cuantificación y el análisis del área de tinción de mielina por imagen TEM que se realizó utilizando el software Image J (20 imágenes por tratamiento de n=2-3 ratones sacrificados el día 70). Las imágenes TEM tenían un color invertido (mielina blanca) y se utilizó un umbral para revelar la mielina. El área de este umbral de mielina medida para cada grupo de tratamiento.

20 Todos los datos se analizaron mediante un ANOVA unidireccional seguido de la prueba de comparaciones múltiples de Turkey. Las diferencias significativas en comparación con el vehículo únicamente se representan con \*; entre los ratones normales y los ratones tratados con cuprizona/vehículo #; y entre la nalfurafina y el U-50488 con ^ (\* $p<0,05$ ; \*\* $p<0,01$ ; \*\*\* $p<0,001$ ; \*\*\*\* $P<0,0001$ ).

25 *Interpretación e impacto:* Como se muestra en la Figura 29A-G, la desmielinización fue muy evidente en el cuerpo caloso del cerebro de animales tratados únicamente con vehículos inducidos por cuprizona (panel B). La relación entre la circunferencia axonal y la circunferencia de la mielina (relación  $g$ ) disminuye con la mielinización normal. Los animales inducidos por la cuprizona tratados con nalfurafina muestran una estructura axonal-mielina más normal, los axones mielinizados están densamente empaquetados dentro de la sustancia blanca y las vainas de mielina de las fibras vecinas a menudo se tocan directamente. La tinción de las vainas de mielina (negra) es más prominente, lo que indica un aumento de la remielinización. Ultraestructuralmente, este tejido de nalfurafina es sorprendentemente similar al del tejido virgen (normal). Cuantitativamente, el tejido de nalfurafina tiene una relación  $g$  significativamente inferior en comparación con el vehículo tratado únicamente, lo que indica un aumento de la remielinización, con una relación  $g$  más cercana a la del tejido virgen (normal). Esto se ve respaldado además por el análisis del aumento porcentual del número de axones mielinizados y del aumento porcentual del área de mielinización en los animales tratados con nalfurafina. Por el contrario, el tratamiento con el compuesto U-50488 no mostró reparación o restauración a un estado casi normal. Cualitativamente, la estructura de la mielina axonal está desorganizada, hay una pérdida de axones y estructuras de mielina axonal abiertamente agrandadas. Cuantitativamente, el tratamiento con U-50488 tiene resultados similares a los de las muestras tratadas únicamente con el vehículo (es decir, sin remielinización perceptible), mientras que el tratamiento con nalfurafina muestra resultados similares a los del tejido virgen. Cualitativa y cuantitativamente, el tratamiento con nalfurafina mejora la remielinización, lo que es indicativo de una recuperación casi completa tras un ataque de desmielinización causado por la cuprizona.

40 **Ejemplo 30: La nalfurafina es más eficaz para promover la recuperación funcional que el fumarato de clemastina, un conocido fármaco remielinizante.**

45 *Detalle experimental:* La EAE se indujo en ratones C57BL/6 hembra como se describe en el Ejemplo 1. Los resultados se muestran en la Figura 30. El día del inicio de la enfermedad (puntuación >1, línea punteada), los ratones se trataron solo con vehículo (diariamente, n=9) o con nalfurafina (0,01 mg/kg mediante inyección intravenosa diaria; n=8). En otro experimento similar, los ratones se trataron solo con vehículo (n=5) o fumarato de clemastina (10 mg/kg mediante inyección intravenosa; n=7). Se muestran las puntuaciones alineadas de los ratones a partir del inicio del tratamiento. \*\*\*\* $p<0,0001$  mediante ANOVA bidireccional NaIF o clemastina en comparación con el vehículo.

50 *Interpretación e impacto:* Se ha demostrado que el fumarato de clemastina, un antihistamínico que también antagoniza el receptor muscarínico, reduce la discapacidad crónica en el modelo de EAE cuando se usa a 10 mg/kg a partir del momento de la inmunización. Además, se ha demostrado que mejora la remielinización en ratones y humanos (Li et al. 2015, Clemastine rescues behavioral changes and enhances remyelination in the cuprizone mouse model of demyelination. *Neurosci Bull.*; 31: 617-625; Green, A.J et al., 2017 Clemastine fumarate as a remyelinating therapy for multiple sclerosis (ReBUILD): a randomised, controlled, double-blind, crossover trial. *Lancet Lond. Engl.* 390, 2481-2489). En nuestro modelo de EAE, la clemastina tiene una eficacia similar a la de los informes publicados anteriormente, pero es mucho menos eficaz que la nalfurafina para permitir la recuperación funcional completa (Mei, F. et al. 2016, Accelerated remyelination during inflammatory demyelination prevents axonal loss and improves functional recovery. *ELife* 5). Este ejemplo muestra que la nalfurafina es superior al fumarato de clemastina en este modelo.

**Ejemplo 31: La nalfurafina promueve una recuperación mayor y más sostenida que el fumarato de clemastina, un conocido fármaco remielinizante.**

*Detalle experimental:* La EAE se indujo en ratones C57BL/6 hembra como se describe en el Ejemplo 1. Los resultados se muestran en la Figura 31A-B. El día del inicio de la enfermedad (puntuación >1, línea de puntos), los ratones fueron tratados solo con vehículo (diariamente, n=9) o nalfurafina (0,01 mg/kg mediante inyección i.p. diariamente; n=8)(A). En un experimento similar separado, los ratones fueron tratados solo con vehículo (n = 5) o fumarato de clemastina (10 mg/kg mediante inyección i.p.; n=7) (B). Los ratones se consideraron recuperados si recibieron una puntuación <0,5 el día 23 después del inicio del tratamiento. Se muestran el porcentaje de ratones de cada grupo que se recuperaron (A) y el número de días de recuperación (B). \*\*\*p<0,0001 mediante prueba exacta de Fisher (%) recuperado; A) o ANOVA de una vía con prueba de comparación múltiple de Holm-Sidak (# días en recuperación; B). Estos datos provienen de los mismos experimentos que en el Ejemplo 30.

*Interpretación e impacto:* Se ha demostrado que el fumarato de clemastina, un antihistamínico que también antagoniza el receptor muscarínico, reduce la discapacidad crónica en el modelo de EAE cuando se usa a 10 mg/kg a partir del momento de la inmunización. Además, se ha demostrado que mejora la remielinización en ratones y humanos. En nuestro modelo EAE, el tratamiento con fumarato de clemastina promueve la recuperación en poco más del 50 % de los ratones, pero la recuperación no es sostenida. Por el contrario, todos los ratones se recuperan cuando se tratan con nalfurafina y tienen una recuperación sostenida. Este hallazgo indica que la nalfurafina es superior al fumarato de clemastina en este modelo y proporciona una mejora más sostenida en todos los animales tratados.

**Ejemplo 32: La nalfurafina promueve la recuperación del umbral del dolor cuando se administra después de la desmielinización en el modelo de enfermedad de desmielinización por cuprizona de EM.**

*Detalle experimental:* Se indujo un estado de enfermedad desmielinizante en ratones hembra C57BL/6 (de 8-14 semanas de edad y entre 17 - 23 gramos de peso). Los ratones fueron alimentados con pienso que contenía cuprizona (0,3 % (p/p) de cuprizona) o pienso solamente (controles normales) durante 35 días, momento en el cual fueron cambiados nuevamente al pienso estándar. El día 28, se inició el tratamiento diario de los ratones solo con vehículo (DMSO: Tween 80: Solución salina) o nalfurafina a 0,1 mg/kg mediante inyección intravenosa. En un segundo experimento, se alimentó a ratones con pienso que contenía cuprizona (0,3 % (p/p) de cuprizona) o pienso solamente (controles normales) durante 42 días, momento donde se les volvió a dar pienso estándar. El día 35, se inició el tratamiento diario de los ratones solo con vehículo (DMSO: Tween 80: Solución salina) o nalfurafina a 0,1 mg/kg mediante inyección intravenosa. En ambos estudios, el día 70, los ratones fueron sacrificados. Véase la Figura 32 A para ver un resumen de la evolución temporal de la inducción y el tratamiento de la enfermedad.

La sensibilidad a la fuerza mecánica provoca la retirada de la pata en ratones. El umbral de retirada se mide utilizando filamentos de von Frey calibrados mediante el procedimiento arriba-abajo (Bonin et al. A simplified up-down method (SUDO) for measuring mechanical nociception in rodents using von Frey filaments. Molecular Pain. 2014; 10:1-11) en el momento máximo de la enfermedad, antes del tratamiento con nalfurafina. La cuprizona provoca un aumento de la sensibilidad mecánica en comparación con los ratones que siguen una dieta normal (\*p<0,05) (Figura 32B), y este aumento en el umbral de abstinencia mecánica se reduce a los niveles basales tras el tratamiento con nalfurafina (0,1 mg/kg/i.p.). \*p<0,05 en el momento máximo de la enfermedad (día 28 o 35) y después del tratamiento diario con nalfurafina (umbral promedio entre 45-70 días). Los ratones tratados con nalfurafina mejoraron las puntuaciones del umbral mecánico en comparación con los ratones tratados con vehículos (#p <0,05). Prueba t de Student, n=10-11 ratones/grupo de 2 experimentos independientes. ^ en comparación con ratones con una dieta normal; \* umbral antes y después del tratamiento; # diferencias en la recuperación entre los grupos de tratamiento. Se analizaron los datos agrupados de 2 cohortes experimentales (la enfermedad máxima es una semana antes del inicio del tratamiento y en la recuperación máxima (días 63-70).

*Interpretación e impacto:* El dolor crónico a menudo se asocia con la esclerosis múltiple. La alodinia es un aumento de la sensación de dolor hasta convertirse en un estímulo normalmente no doloroso. En este ensayo, los filamentos de von Frey se utilizan para medir el umbral de retirada de la pata tras la aplicación de una fuerza mecánica definida. Tras la desmielinización inducida por la cuprizona, el umbral del dolor es un biomarcador funcional para la recuperación, indicativo de la remielinización de las fibras nerviosas. Sorprendentemente, los animales enfermos tratados con nalfurafina mostraron una sensibilidad al dolor similar a la inicial, lo que indica que el tratamiento mejora la recuperación funcional.

## REIVINDICACIONES

1. Una composición farmacéutica que comprende nalfurafina para su uso en el tratamiento de una enfermedad desmielinizante en un sujeto.

5 2. La composición farmacéutica para su uso de la reivindicación 1, en donde la composición farmacéutica se administra al sujeto durante un período de (i) al menos 7 días, (ii) al menos 14 días, o (iii) al menos un mes.

3. La composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 1, en donde el sujeto es un ser humano y la composición farmacéutica se administra al sujeto para obtener una dosis de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 5 µg de nalfurafina al día o de 2,5 a 250 µg/cuerpo/día de nalfurafina.

10 4. La composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 1, en donde la composición farmacéutica se administra al sujeto para obtener una dosis de nalfurafina que es equivalente a una dosis de aproximadamente 0,003 a aproximadamente 0,3 mg/kg de nalfurafina en ratones.

15 5. La composición farmacéutica para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde la enfermedad desmielinizante se selecciona del grupo que consiste en esclerosis múltiple (EM), neuritis óptica, enfermedad de Devic, enfermedades desmielinizantes inflamatorias, neuropatías del sistema nervioso central, mielopatías, tabes dorsalis, leucoencefalopatías, leucodistrofias, síndrome de Guillain-Barré y su homólogo crónico, polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica, antiMAG (glucoproteína asociada a la elina), neuropatía periférica, enfermedad de Charcot Marie Tooth (CMT), deficiencia de cobre, neuropatía inflamatoria progresiva y cualquier combinación de las mismas.

20 6. La composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 5, en donde el tratamiento de la EM da como resultado uno o más resultados clínicos en comparación con sujetos no tratados con nalfurafina seleccionados del grupo que consiste en:

(a) una disminución de la progresión de la EM;

(b) una disminución de la gravedad de la EM;

(c) una disminución de la desmielinización de las células nerviosas;

25 (d) una disminución de la frecuencia o gravedad de los ataques de EM recidivantes;

(e) una disminución de los síntomas clínicos de la EM;

(f) la curación del tejido nervioso dañado (neurorestauración);

(g) un aumento de la remielinización de los nervios desmielinizados del sistema nervioso central (neurorestauración/protección);

30 (h) la protección del tejido nervioso dañado contra una mayor actividad patológica (neuroprotección);

(i) la promoción del crecimiento neuronal (neuronregeneración) en el sistema nervioso central;

(j) una disminución de la discapacidad causada por la EM;

(k) una mejora en la función nerviosa; y

(l) una mayor tasa de remisión.

35 7. La composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 1, que comprende administrar diariamente de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 5 µg de nalfurafina, de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 4 µg, de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 3 µg, de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 2,5 µg, de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 2 µg, de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 1,5 µg, de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 1 µg, de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 0,75 µg, de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 0,5 µg o de aproximadamente 0,25 µg de nalfurafina a un sujeto humano.

40 8. La composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 5, en donde el tratamiento de la EM da como resultado una reducción de uno o más síntomas clínicos de la EM incluyendo *seleccionados del grupo que consiste en* pérdida de sensibilidad o cambios en la sensibilidad tales como hormigueo, alfileres y agujas o entumecimiento, debilidad muscular de gravedad variable, reflejos muy pronunciados, espasmos musculares o dificultad para moverse; dificultades con la coordinación y el equilibrio (ataxia); espasticidad; problemas con el habla o la deglución, problemas visuales (nictagmo, neuritis óptica o visión doble), fatiga, dolor agudo o crónico, dolor facial (neuralgia del trigémino), dificultades de vejiga e intestino, incontinencia, capacidad cognitiva reducida, depresión, ansiedad y otras anomalías emocionales, disfunción sexual, fenómeno de Uhthoff y signo de Lhermitte.

9. Una composición farmacéutica que comprende nalfurafina para su uso en (i) aumentar la remielinización de los nervios en un sujeto, o (ii) atenuar la desmielinización de los nervios en un sujeto.

10. La composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 9, en donde la composición farmacéutica se administra al sujeto durante un período de (i) al menos 7 días, (ii) al menos 14 días, o (iii) al menos un mes.

5 11. La composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 9, en donde el sujeto es un ser humano y la composición farmacéutica se administra al sujeto para obtener una dosis de aproximadamente 0,05 a aproximadamente 0,5 µg de nalfurafina diariamente o de 2,5 a 250 µg/cuerpo/día de nalfurafina.

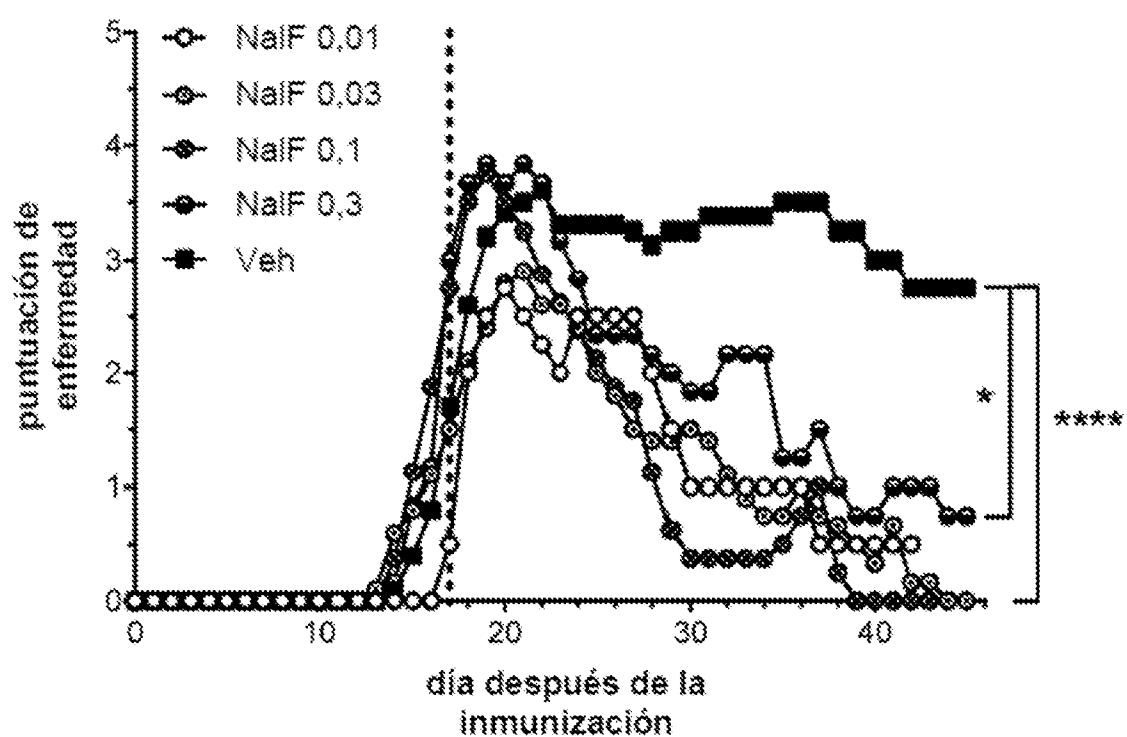
10 12. La composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 9, en donde la composición farmacéutica se administra al sujeto para obtener una dosis de nalfurafina que es equivalente a una dosis de aproximadamente 0,003 a aproximadamente 0,3 mg/kg de nalfurafina en ratones.

15 13. La composición farmacéutica para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 12. en donde el sujeto tiene uno o más síntomas de una enfermedad desmielinizante seleccionada del grupo que consiste en esclerosis múltiple (EM), neuritis óptica, enfermedad de Devic, enfermedades desmielinizantes inflamatorias, neuropatías del sistema nervioso central, mielopatías, tabes dorsal, leucoencefalopatías, leucodistrofias, síndrome de Guillain-Barré y su contraparte crónica, polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica, neuropatía periférica anti-MAG (glicoproteína asociada a la mielina), enfermedad de Charcot Marie Tooth (CMT), deficiencia de cobre, neuropatía inflamatoria progresiva y cualquier combinación de las mismas.

20 14. La composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 13, en donde la administración de la composición farmacéutica da como resultado el tratamiento de la EM en uno o más resultados clínicos en comparación con sujetos no tratados con nalfurafina seleccionados del grupo que consiste en:

- (a) una disminución de la progresión de la EM;
- (b) una disminución de la gravedad de la EM;
- (c) una disminución de la desmielinización de las células nerviosas;
- (d) una disminución de la frecuencia o gravedad de los ataques de EM recidivantes;
- 25 (e) una disminución de los síntomas clínicos de la EM;
- (f) la curación del tejido nervioso dañado (neurorestauración);
- (g) un aumento de la remielinización de los nervios desmielinizados del sistema nervioso central (neurorestauración/protección);
- (h) la protección del tejido nervioso dañado contra una mayor actividad patológica (neuroprotección);
- 30 (i) la promoción del crecimiento neuronal (neuroregeneración) en el sistema nervioso central;
- (j) una disminución de la discapacidad causada por la EM;
- (k) una mejora de la función nerviosa; y
- (l) una mayor tasa de remisión.

35 15. La composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 13, en donde la administración de la composición farmacéutica da como resultado una reducción de uno o más síntomas clínicos de EM seleccionados del grupo que consiste en pérdida de sensibilidad o cambios en la sensibilidad tales como hormigueo, alfileres y agujas o entumecimiento, debilidad muscular o parálisis de gravedad variable, reflejos muy pronunciados, espasmos musculares o dificultad para moverse; dificultades con la coordinación y el equilibrio (ataxia); espasticidad; problemas con el habla o la deglución, problemas visuales (nistagmo, neuritis óptica o visión doble), fatiga, dolor agudo o crónico, dolor neuropático, dolor facial ( neuralgia del trigémino), dificultades de vejiga e intestino, incontinencia, capacidad cognitiva reducida, depresión, ansiedad y otras anomalías emocionales, disfunción sexual, fenómeno de Uhthoff y signo de Lhermitte.



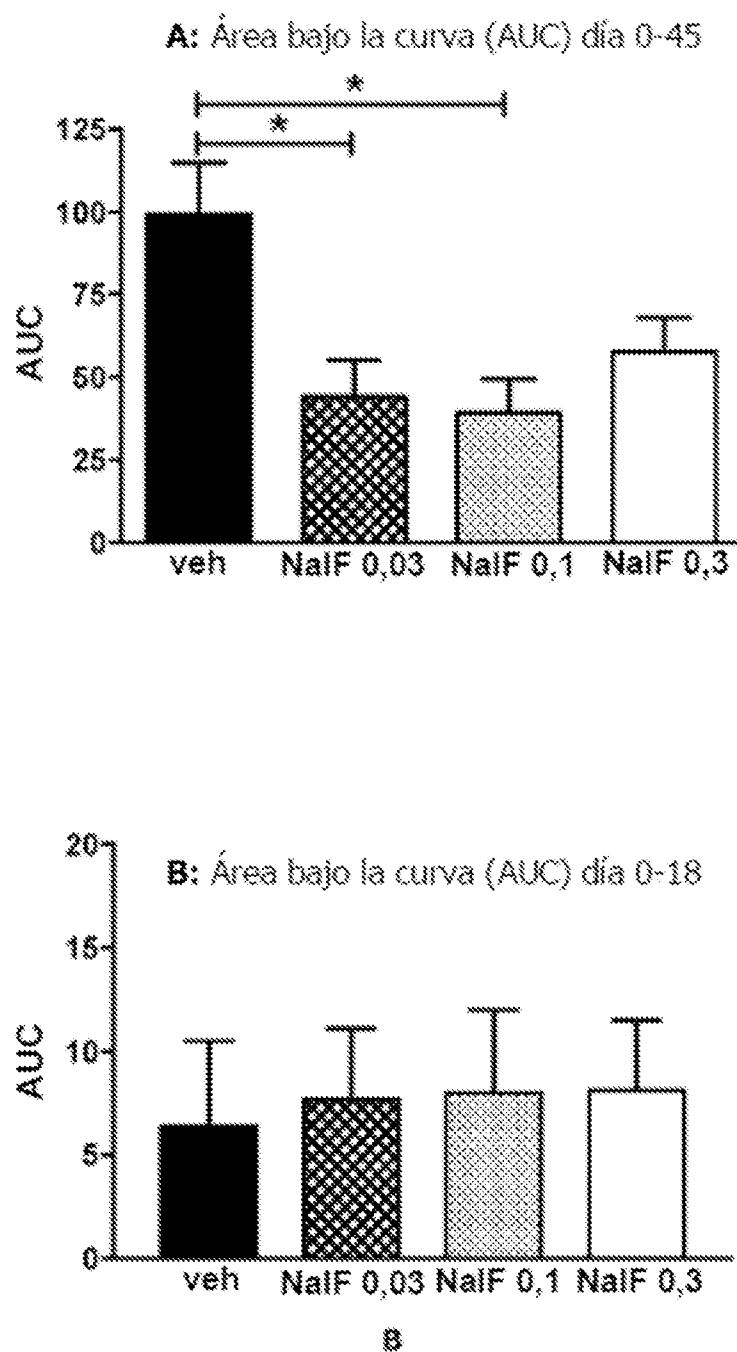


Figura 2

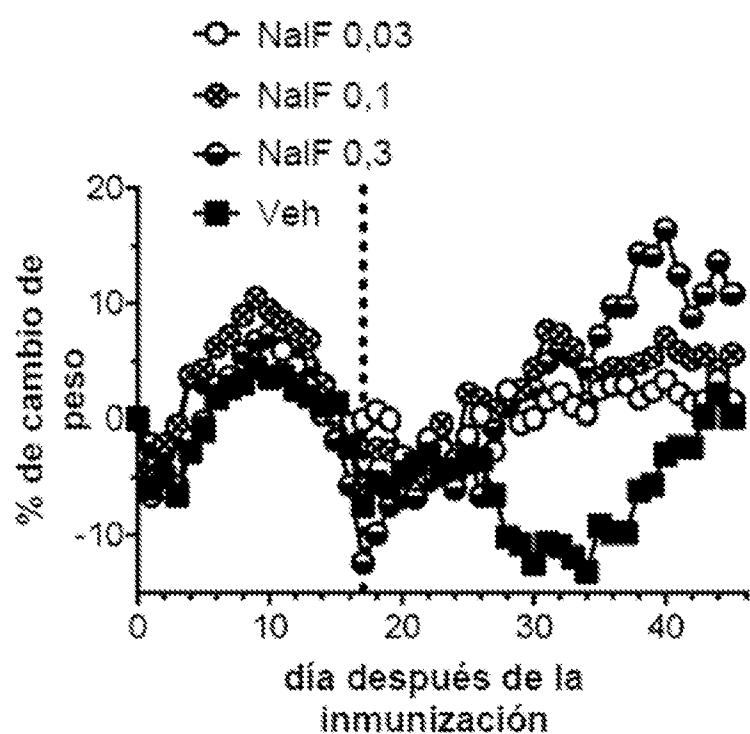


Figura 3

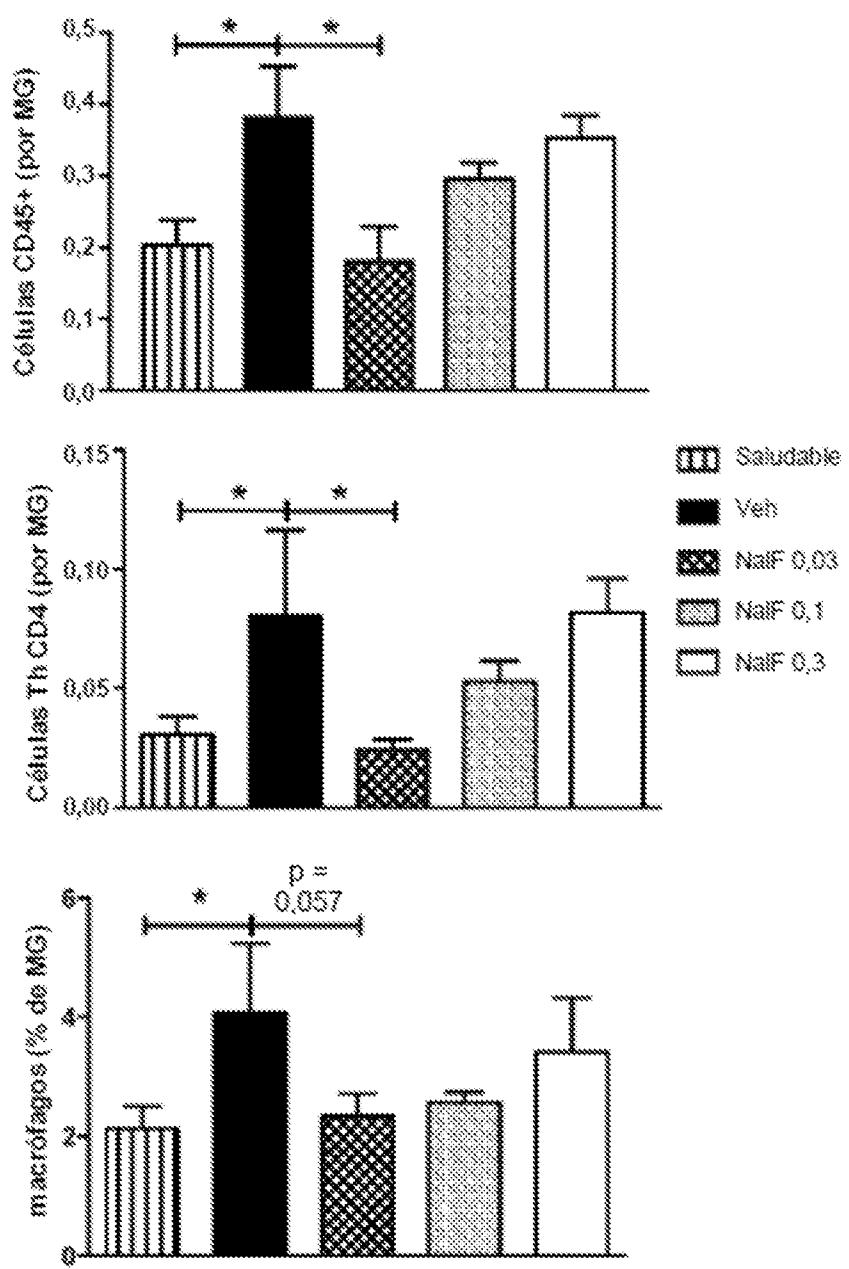


Figura 4

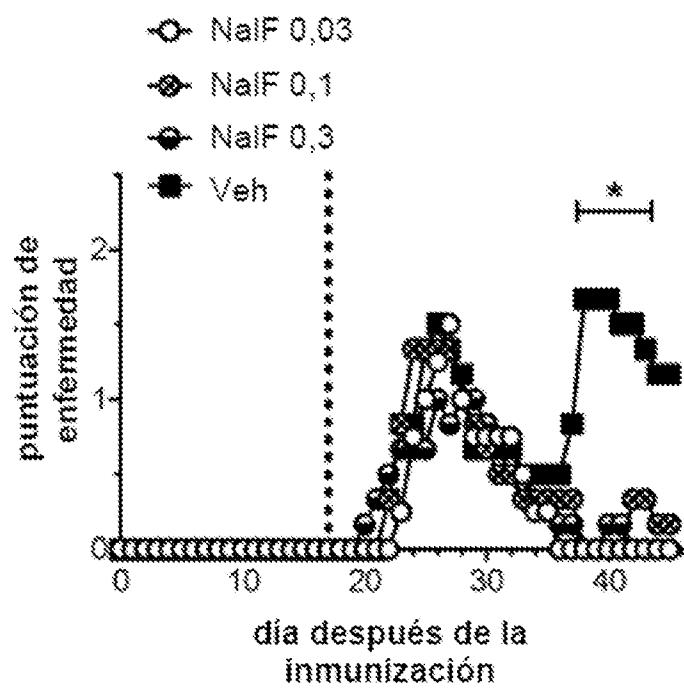


Figura 5

A: saludable

B:EAE - vehículo

C:EAE - nalfurafina

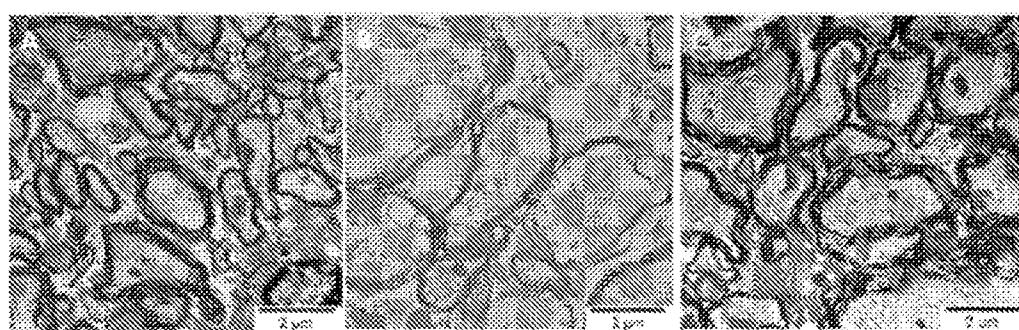


Figura 6

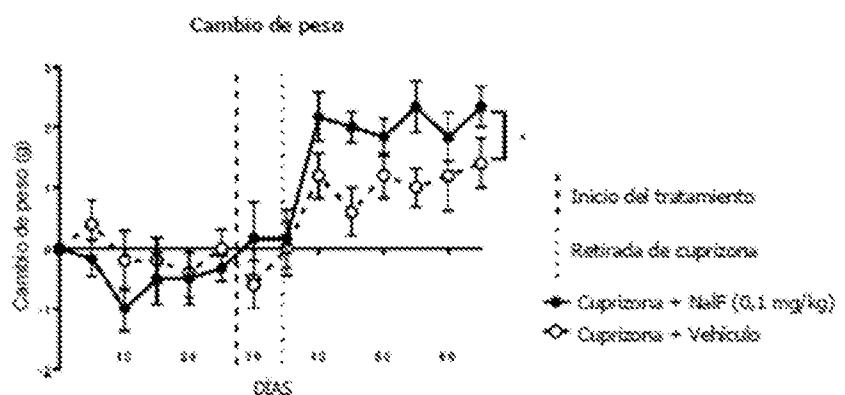
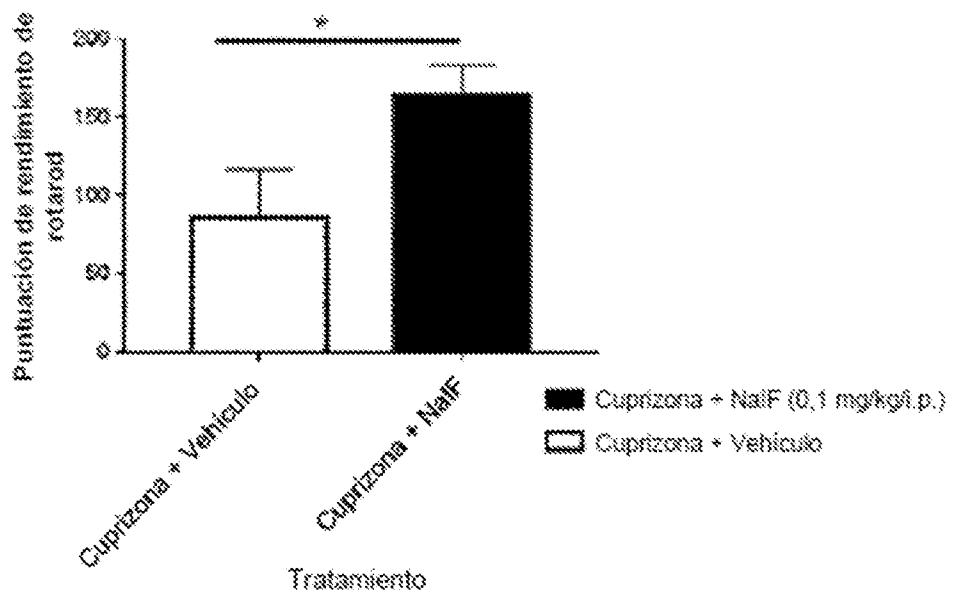


Figura 7



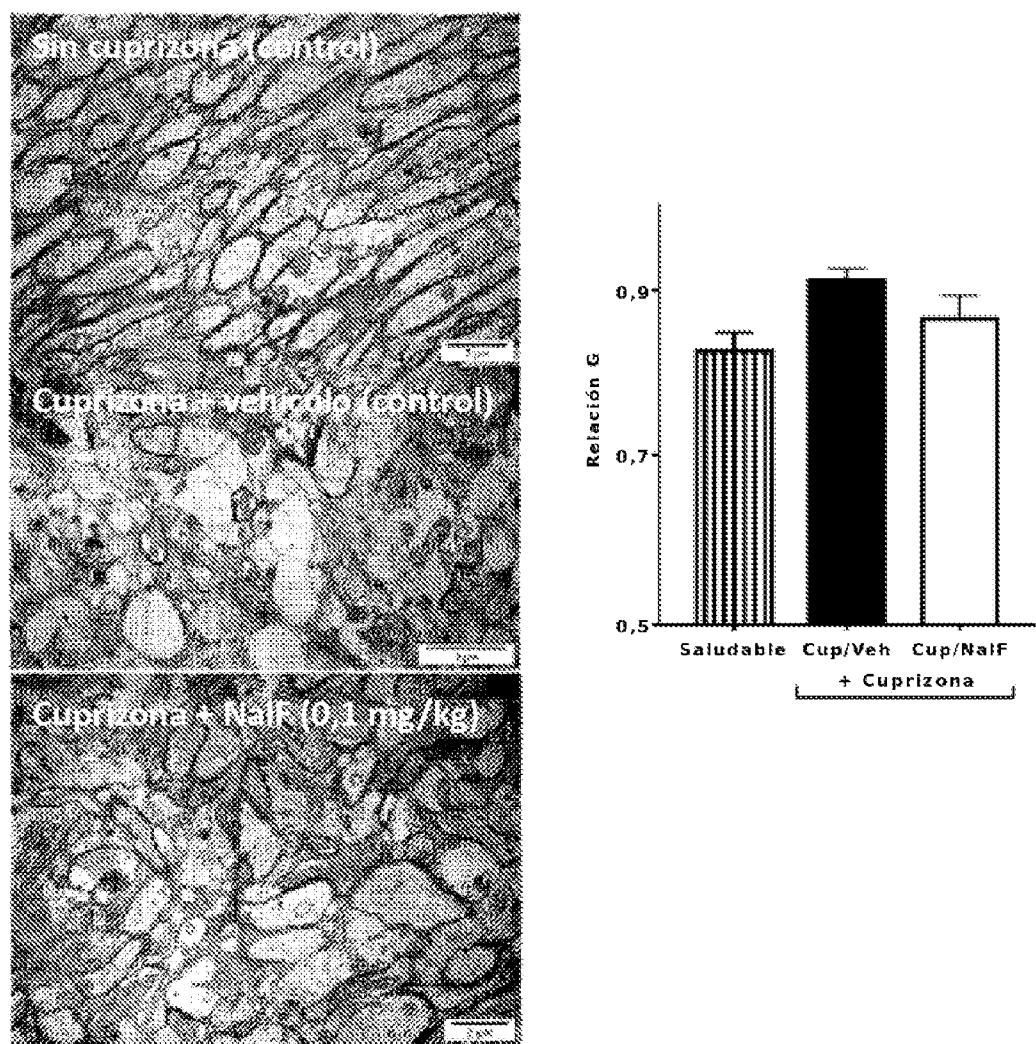


Figura 9

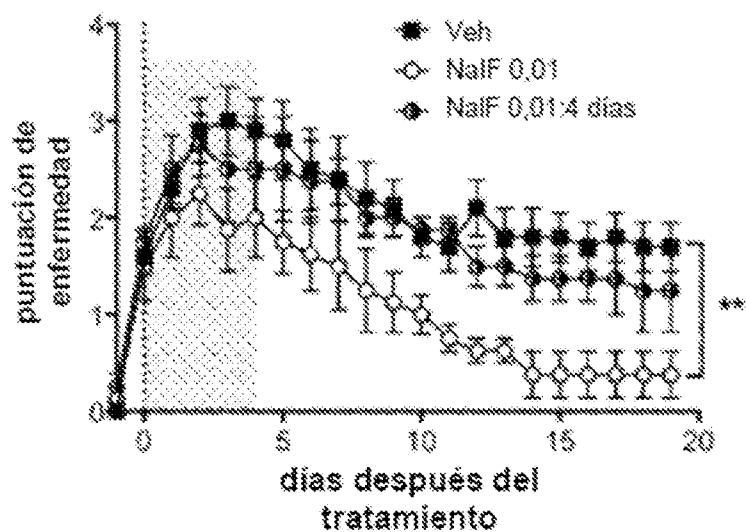


Figura 10

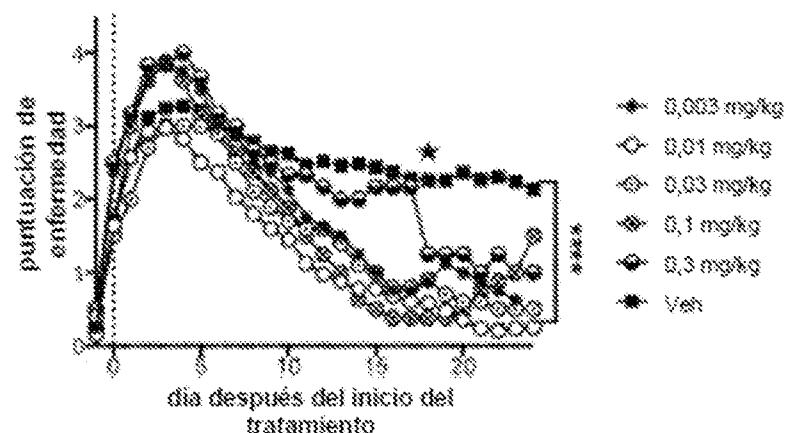


Figura 11

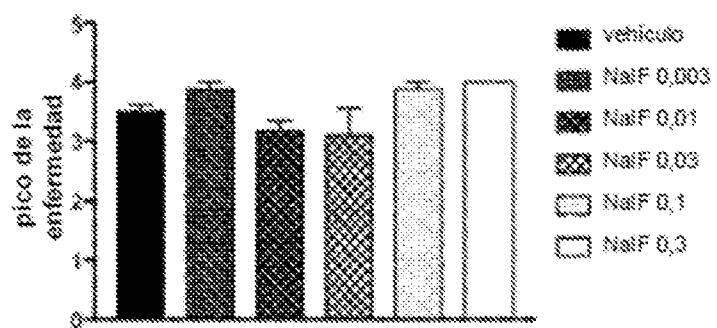


Figura 12

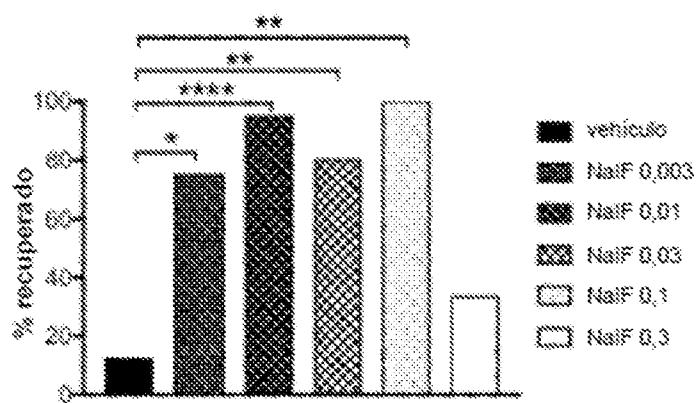


Figura 13

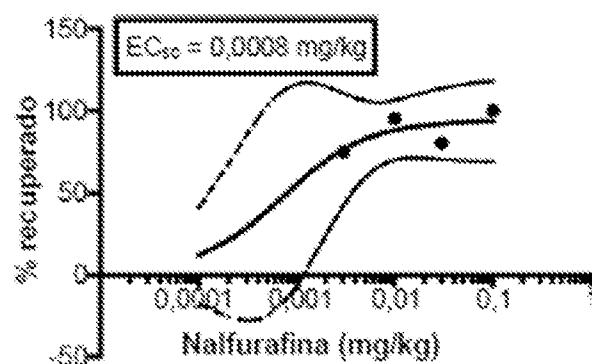


Figura 14

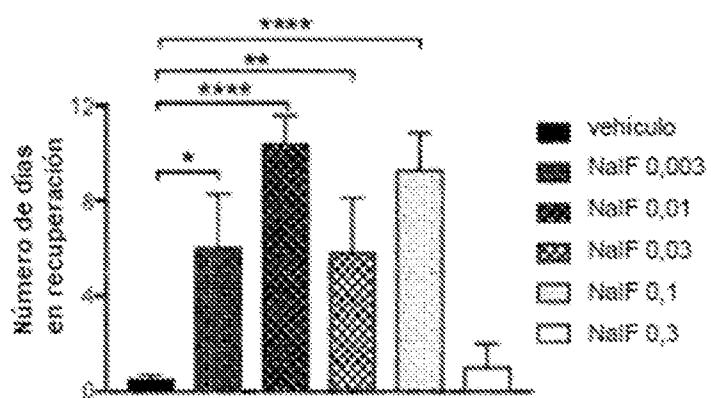


Figura 15

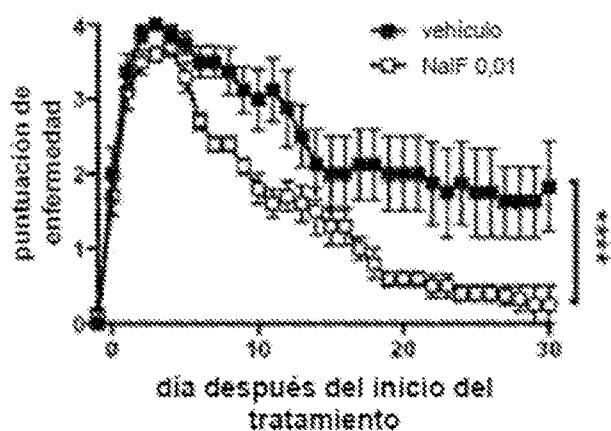


Figura 16

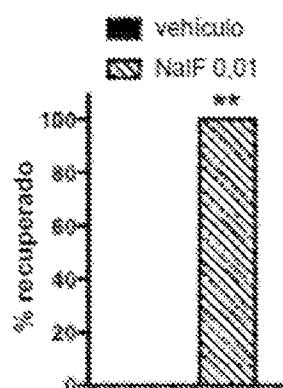


Figura 17

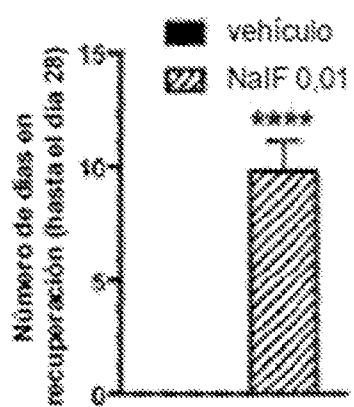


Figura 18

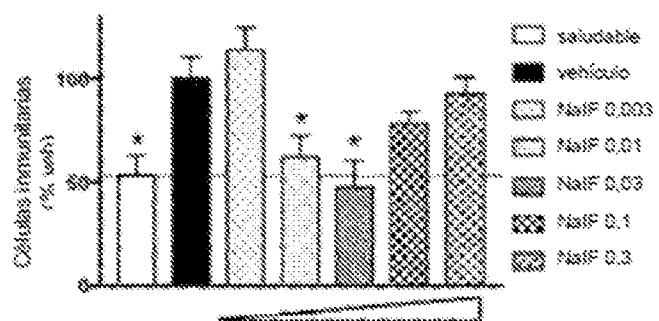


Figura 19A

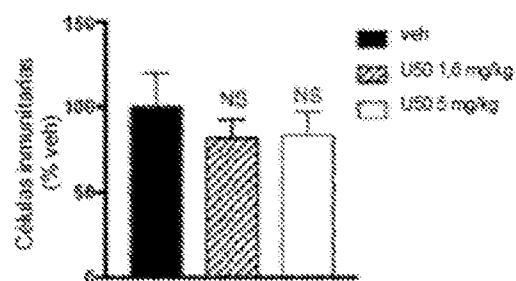


Figura 19B

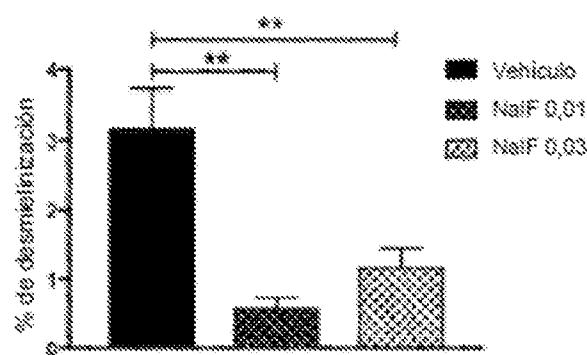


Figura 20

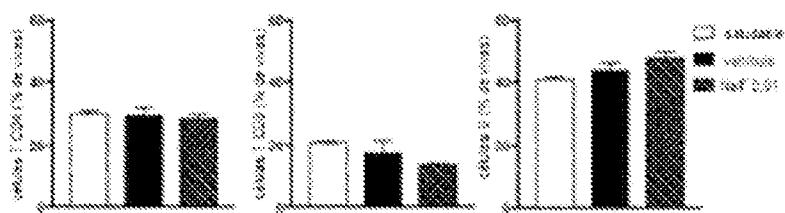


Figura 21

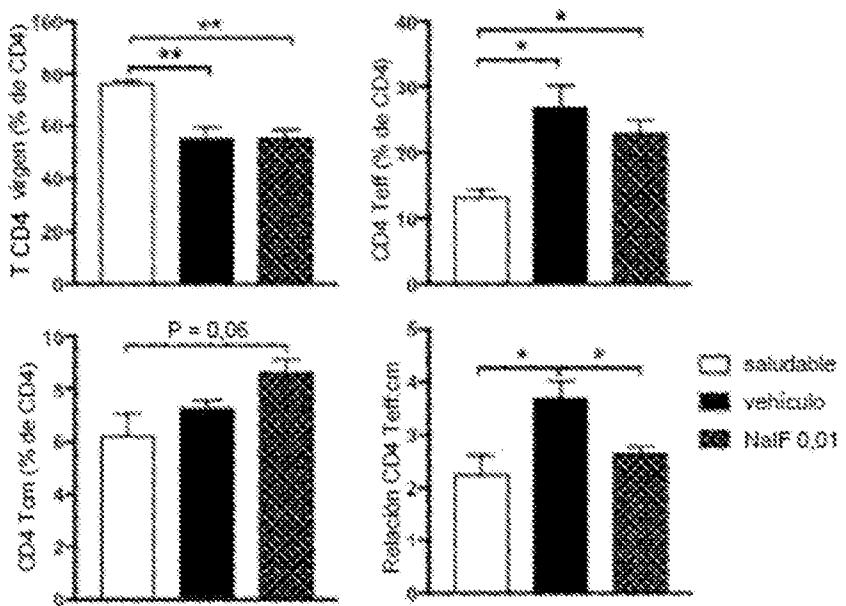
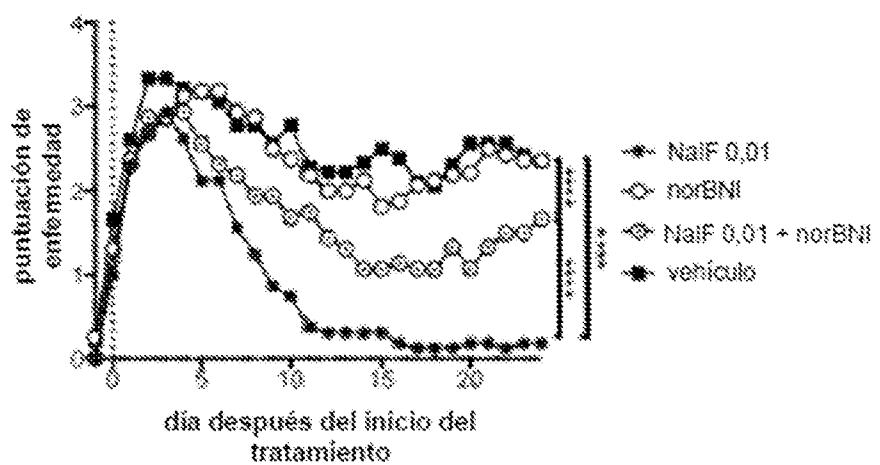


Figura 22



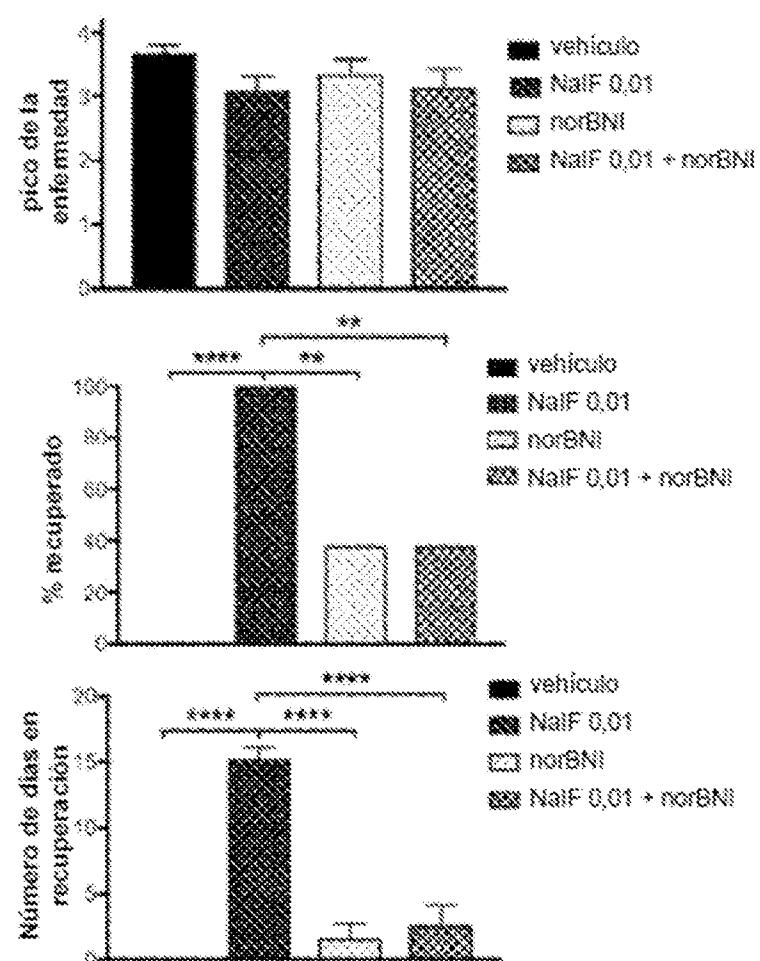


Figura 24

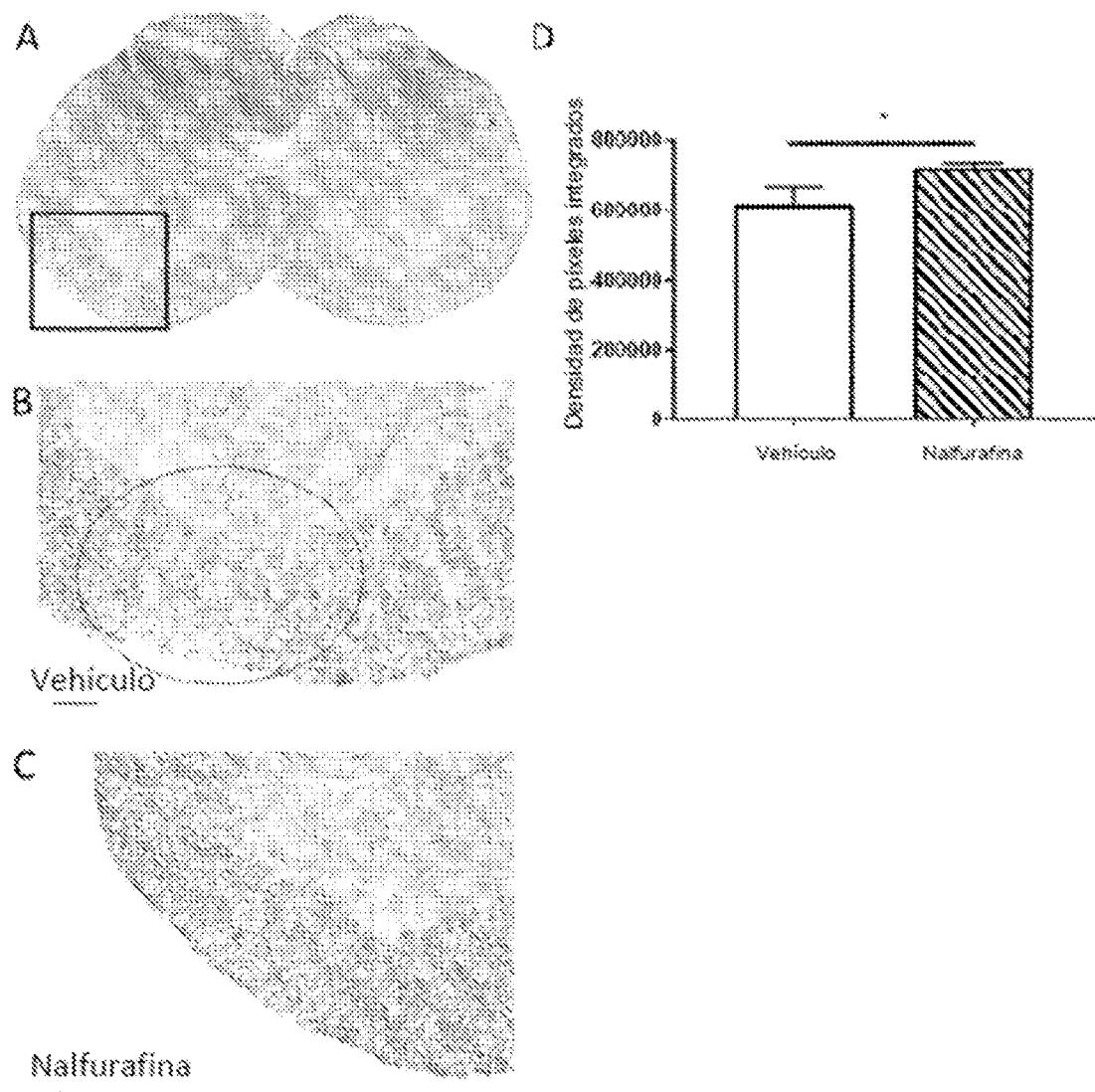


Figura 25

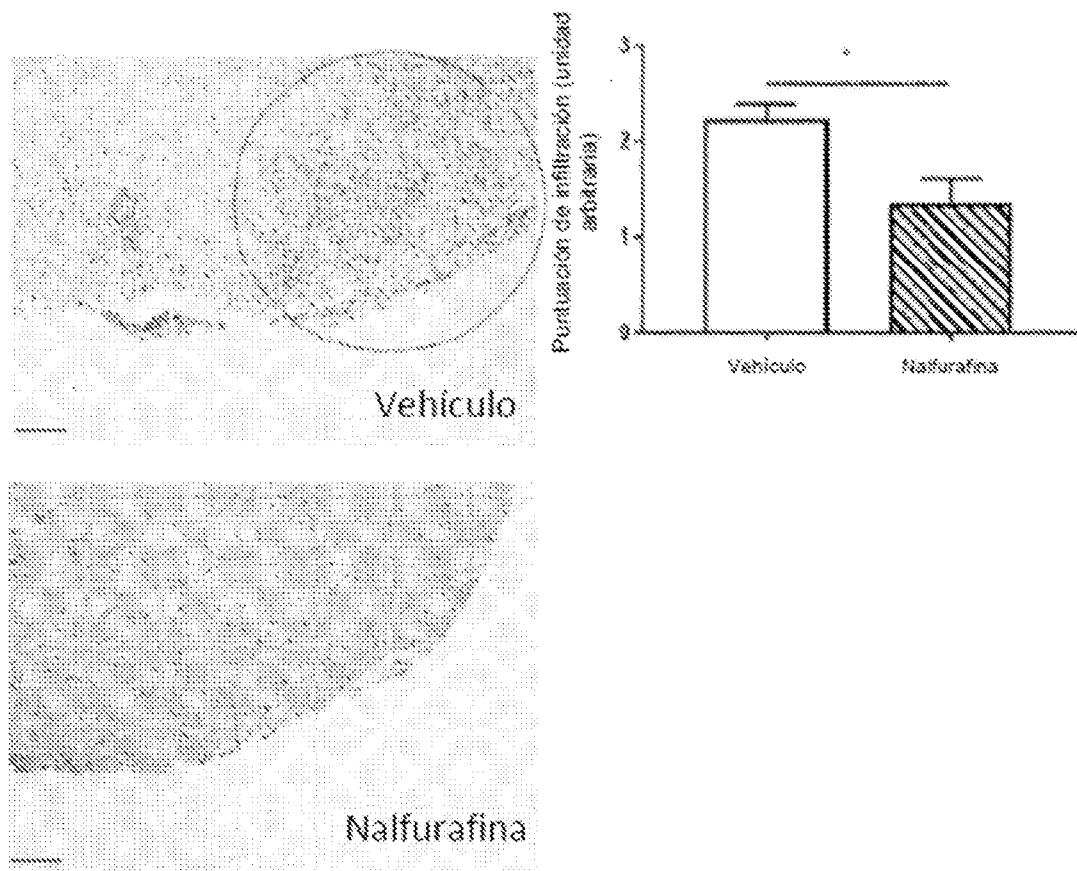


Figura 26

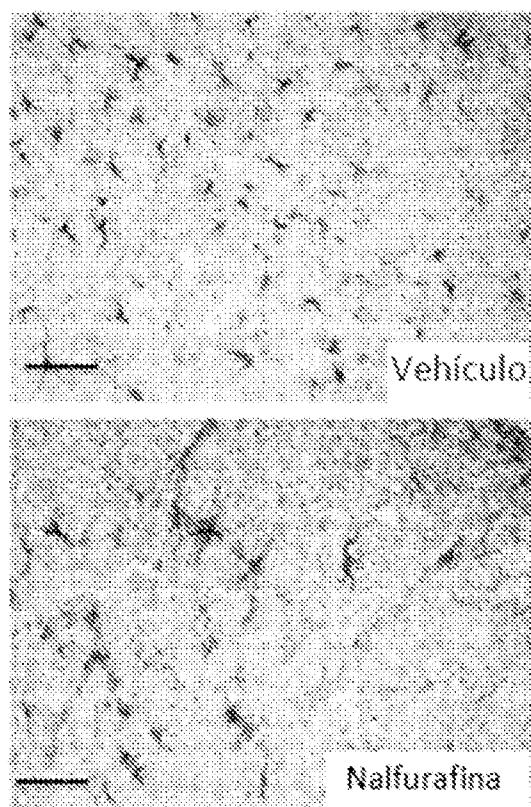


Figura 27A

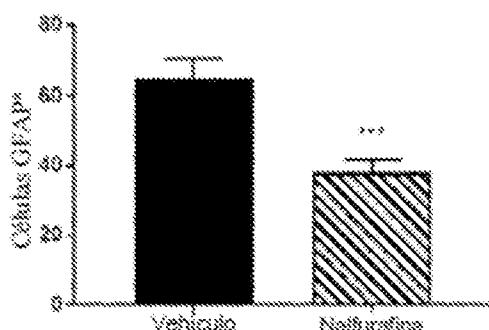


Figura 27B

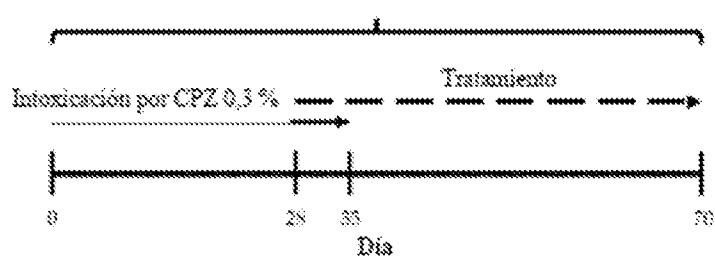


Figura 28A

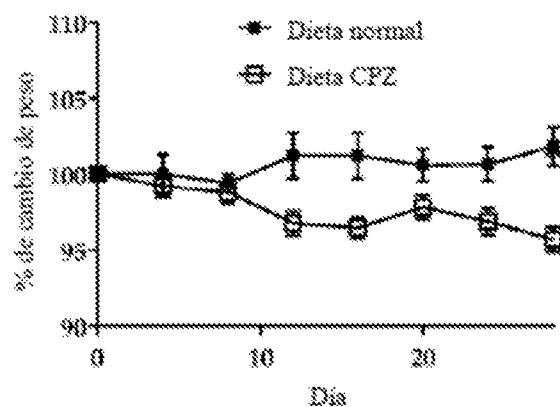
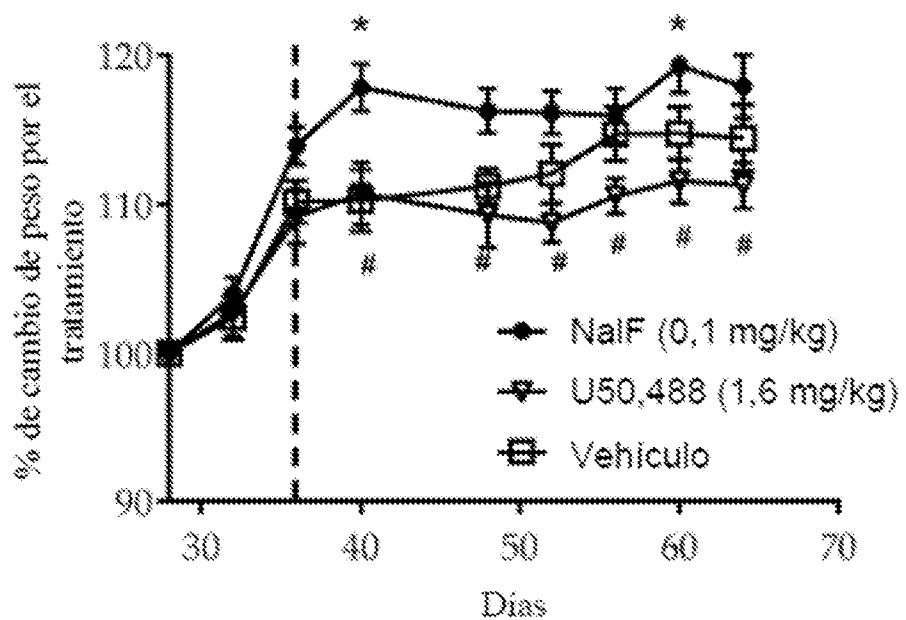


Figura 28B



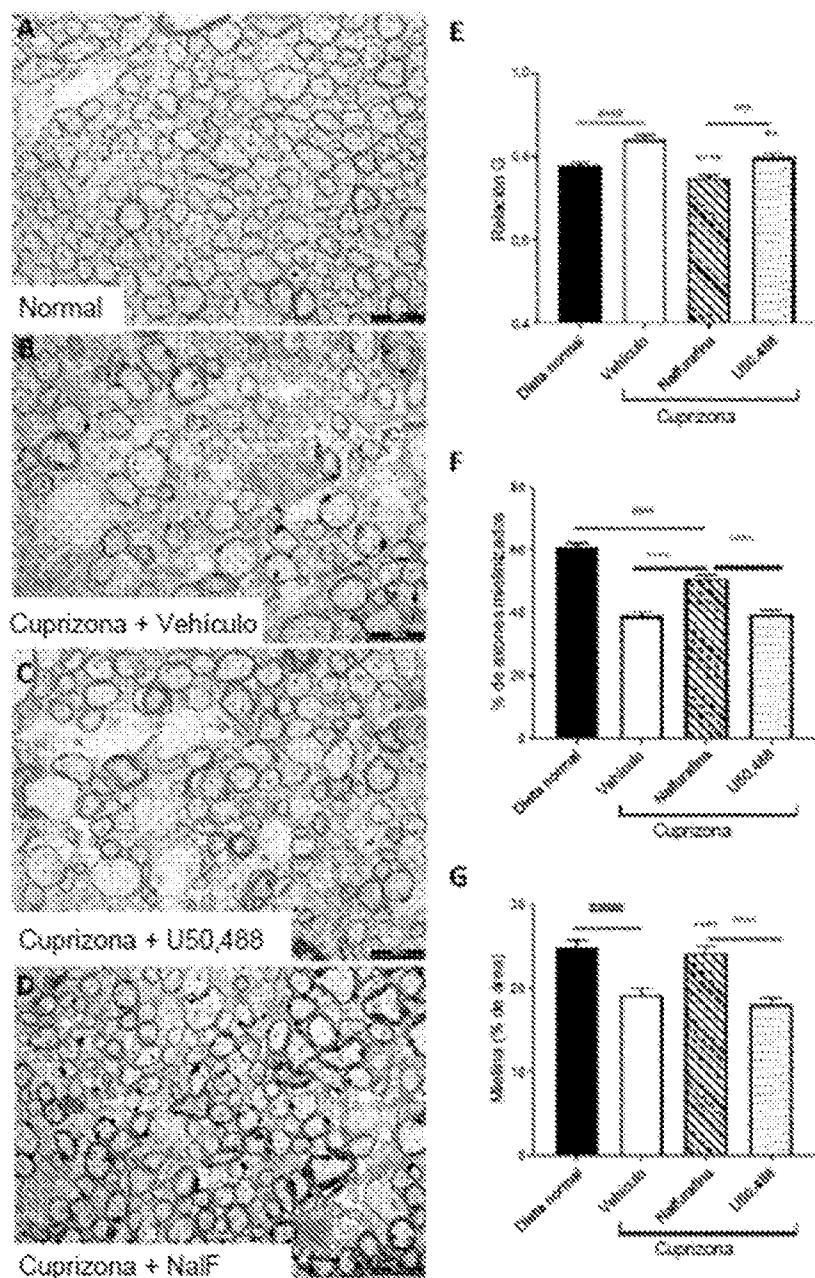


Figura 29

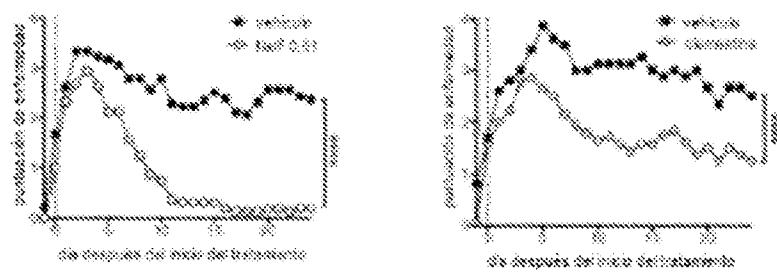


Figura 30

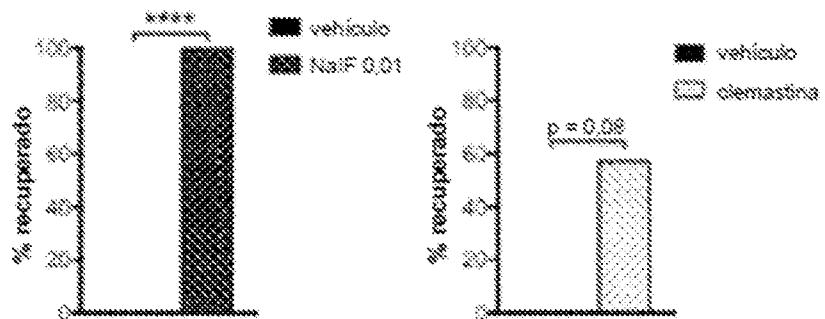


Figura 31A

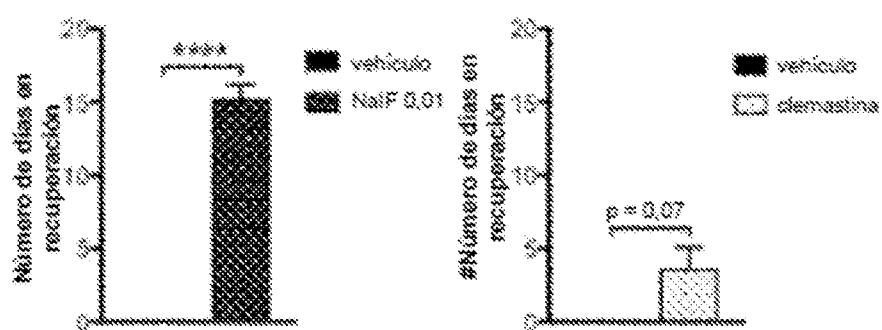


Figura 31B

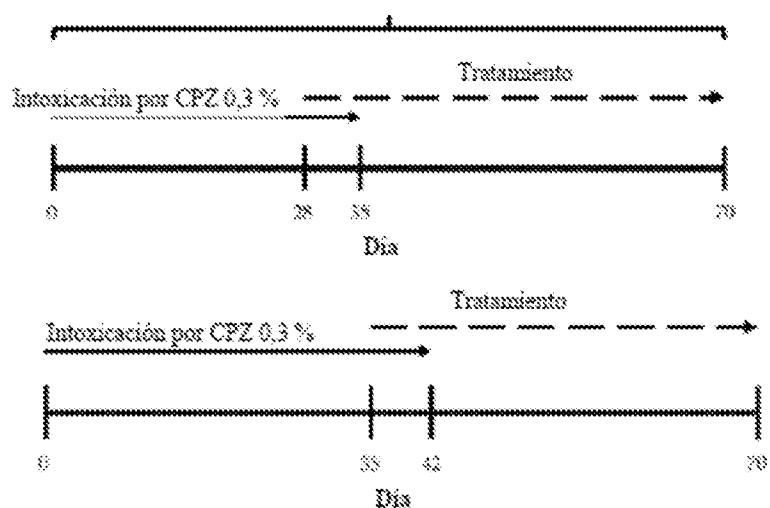


Figura 32A

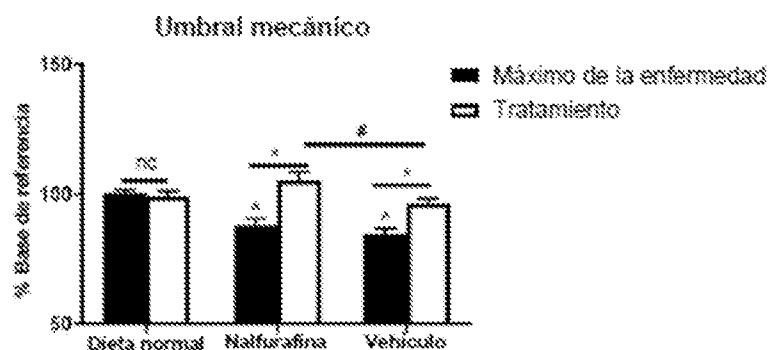


Figura 32B