(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 259 552**

(21) Número de solicitud: 200500628

(51) Int. Cl.:
A61K 31/7076 (2006.01)
A61P 37/06 (2006.01)

(12) SOLICITUD DE PATENTE A1

(22) Fecha de presentación: **17.03.2005**

(43) Fecha de publicación de la solicitud: **01.10.2006**

(43) Fecha de publicación del folleto de la solicitud: **01.10.2006**

(71) Solicitante/s:
PROYECTO DE BIOMEDICINA CIMA, S.L.
Avda. Pío XII, 55
31008 Pamplona, Navarra, ES

(72) Inventor/es: **Villoslada Díaz, Pablo;**
Ávila Zaragoza, Matías;
Moreno Bruna, Beatriz;
Corrales Izquierdo, Fernando;
Berasain Lasarte, Carmen y
Ruiz García-Trevijano, Elena

(74) Agente: **Arias Sanz, Juan**

(54) Título: **Empleo de 5'-metiltioadenosina (MTA) en la prevención y/o tratamiento de enfermedades autoinmunes y/o rechazo de transplantes.**

(57) Resumen:
Empleo de 5'-metiltioadenosina (MTA) en la prevención y/o tratamiento de enfermedades autoinmunes y/o rechazo de transplantes.
La 5'-metiltioadenosina (MTA), sus sales farmacéuticamente aceptables y/o profármacos, pueden ser utilizados en la prevención y/o tratamiento de enfermedades autoinmunes, por ejemplo, la Esclerosis Múltiple (EM), así como en la prevención y/o tratamiento de rechazo de transplantes.

ES 2 259 552 A1

DESCRIPCIÓN

Empleo de 5'-metiltioadenosina (MTA) en la prevención y/o tratamiento de enfermedades autoinmunes y/o rechazo de transplantes.

Campo de la invención

La invención se relaciona, en general, con el empleo de 5'-metiltioadenosina (MTA), sus sales farmacéuticamente aceptables y/o profármacos en la prevención y/o tratamiento de enfermedades autoinmunes así como en la prevención y/o tratamiento de rechazo de transplantes, y, en particular, en la prevención y/o tratamiento de la Esclerosis Múltiple (EM).

Antecedentes de la invención

Las enfermedades autoinmunes son enfermedades graves, que causan importantes problemas sanitarios y personales, y constituyen, actualmente, el cuarto problema sanitario en los países industrializados. A modo ilustrativo, la Esclerosis Múltiple (EM) es una enfermedad autoinmune de gran relevancia sanitaria, que produce importantes secuelas. Asimismo, el rechazo de transplantes, un caso concreto de autoinmunidad en el que la activación de linfocitos T específicos contra antígenos del transplante producen su eliminación, supone una complicación grave para los pacientes que los reciben con un elevado coste personal y social.

Las enfermedades autoinmunes, debido a sus características propias (mecanismos y respuesta a tratamientos), forman un sub-grupo específico dentro de las enfermedades inflamatorias. Como es conocido, las enfermedades inflamatorias son enfermedades en las que predomina la inflamación innata o en la que el tratamiento está dirigido contra la inflamación innata. Sin embargo, las enfermedades autoinmunes se diferencian de las enfermedades inflamatorias en que predomina la inflamación por inmunidad adaptativa (linfocitos), por lo que los tratamientos anti-inflamatorios clásicos, dirigidos a modular la inflamación innata, no son eficaces en el tratamiento de las enfermedades autoinmunes, debido, parece ser, a que para controlar la actividad crónica de una enfermedad autoinmune es necesario, además de suprimir la inflamación local, modular la actividad de los linfocitos con inmunomoduladores.

El tratamiento de las enfermedades autoinmunes constituye un serio problema puesto que muchos tratamientos son sintomáticos y los tratamientos que modifican el curso de la enfermedad tienen eficacia parcial y efectos secundarios así como importantes costes. El control de las enfermedades autoinmunes se basa, en general, en la modulación de la activación de los linfocitos T mediante tratamientos inmunosupresores o inmunomoduladores, por lo que los tratamientos antiinflamatorios clásicos son ineficaces.

Actualmente, para tratar las enfermedades autoinmunes y el rechazo de transplantes se suelen realizar tres tipos de tratamientos, todos ellos focalizados en limitar la activación y efecto de los linfocitos T autorreactivos:

a) por un lado, la administración de corticoides (e.g., prednisona, 5-metilprednisona, dexametasona y ACTH, entre otros) por vía oral, subcutánea o intravenosa y en forma de bolus, durante periodos cortos o de forma indefinida, puede aliviar algunas de estas enfermedades aunque siempre de forma parcial y con efectos secundarios importantes a largo plazo que limitan su empleo;

b) por otro lado, la administración de inmunosupresores (e.g., ciclofosfamida, mitoxantrona, metrotexate, azatioprina y ciclosporina A, entre otros) por vía oral o intravenosa, mejora el control de muchas de estas enfermedades pero con efectos secundarios potencialmente graves o incluso mortales, lo que limita mucho su empleo; y

c) por otro lado, la administración de inmunomoduladores (e.g., interferón beta, interferón alfa, acetato de glatiramer, anticuerpos monoclonales anti-CD20 o anti-TNFa, entre otros) mejora el control de estas enfermedades pero de forma parcial, con efectos secundarios habituales y con un coste elevado al ser productos biotecnológicos.

Por tanto, seria de gran interés disponer de un nuevo tratamiento que sea eficaz en prevenir la activación linfocitaria y que prevenga o disminuya la actividad de las enfermedades autoinmunes y del rechazo de transplantes, con escasos efectos secundarios.

Ahora se ha encontrado que la 5'-metiltioadenosina (MTA) puede ser utilizada en la prevención y/o tratamiento de enfermedades autoinmunes así como en la prevención y/o tratamiento de rechazo de transplantes, y, en particular, en la prevención y/o tratamiento de la Esclerosis Múltiple (EM).

La MTA es un sulfuro-nucleósido de adenina, hidrófobo, en el que el grupo hidroxilo de la posición 5' de la ribosa es sustituido por un grupo metiltio. La MTA se encuentra en pequeñas proporciones en todos los tipos celulares, incluyendo procariotas, levaduras, plantas y eucariotas superiores, habiéndose observado que está presente en todos los tejidos de mamíferos de forma natural. La MTA es una molécula bien conocida y con propiedades muy diversas en el control del cáncer, así como en la regeneración e inflamación innata.

La patente US 4.454.122 describe el empleo de MTA como agente anti- inflamatorio, analgésico y antipirético; en particular, el empleo de MTA en el tratamiento de la inflamación innata. La actividad anti-inflamatoria es analizada mediante la supresión de la respuesta inmune innata en modelos de edema, pleuritis y granuloma por cuerpo extraño. No se analiza el papel de MTA en la supresión de la activación linfocitaria ni su papel como inmunomodulador en enfermedades autoinmunes ni rechazo de transplantes.

También se han estudiado los efectos del MTA en el cáncer. Se ha visto de forma amplia que la actividad MTAP (5'-metiltioadenosina fosforilasa) falta en muchas células malignas, y que estas células MTAP-deficientes en cultivo secretan MTA en vez de metabolizarlo. A modo de ejemplo, la solicitud de patente internacional WO2004/074325 describe el empleo de compuestos que inhiben la enzima MATP para el tratamiento del cáncer. En modelos experimentales de hepatocarcinogénesis inducida de forma química, donde se ha visto que los niveles de MTA están reducidos, la administración de MTA induce una inhibición dosis-dependiente de las lesiones preneoplásticas de hígado y de la síntesis de ADN.

Por otra parte, la función y proliferación de los linfocitos T parece ser particularmente sensible a la inhibición por MTA. Este compuesto inhibe de forma reversible, no tóxica y dosis-dependiente, la proliferación de líneas celulares linfoides murinas y linfocitos humanos periféricos estimulados con mitógenos. Entre los efectos de MTA que pueden interferir con la proliferación celular se encuentra la inhibición de la metilación de proteínas o inhibición de la actividad fosfodiesterasa. Los propios autores de la invención manifestaron en una ponencia titulada "*A methylation-inhibitor suppresses T cell activation and prevents experimental autoinmune encephalomyelitis*", en el 7th Meeting of the International Society of Neuroimmunology, Venecia, Septiembre 2004 [Resumen (abstract) publicado en Journal of Neuroimmunology 2004, Vol. 154, números 1-2, página 85], la utilidad del empleo de MTA como un potente inhibidor de las reacciones de metilación que previene el desarrollo de una respuesta autoinmune en un modelo animal de Encefalomielitis Autoinmune Experimental (EAE) consistente en ratas Lewis inmunizadas con proteína mielínica básica (MBP).

Compendio de la invención

Ahora se ha encontrado, sorprendentemente, que la MTA es capaz de ejercer un efecto modulador de la activación de los linfocitos T, lo que le otorga la capacidad de modificar la inflamación en las enfermedades autoinmunes y rechazo de transplantes y, por tanto, puede ser utilizada en la prevención y/o tratamiento de enfermedades autoinmunes así como en la prevención y/o tratamiento de rechazo de transplantes, y, en particular, en la prevención y/o tratamiento de la EM. En este sentido, en la presente invención, la MTA actúa como un agente inmunomodulador dado que su efecto se ejerce específicamente sobre los linfocitos.

Esta nueva aplicación de la MTA se basa en las investigaciones llevadas a cabo por los inventores sobre modelos animales de EAE aguda y de EAE crónico-recurrente a los que se administró MTA, observándose que los animales que habían sido tratados con MTA o bien no mostraban signos clínicos de la enfermedad o bien, una vez que la enfermedad ya había aparecido, mostraban una fuerte atenuación del curso de la enfermedad.

Por tanto, en un aspecto, la invención se relaciona con el empleo de MTA en la elaboración de un medicamento para (i) la prevención y/o tratamiento de una enfermedad autoinmune o (ii) para la prevención y/o tratamiento de rechazo de un transplante. En una realización particular, dicha enfermedad autoinmune es EM.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un método para la prevención y/o tratamiento de una enfermedad autoinmune en un individuo que padece una enfermedad autoinmune, que comprende la administración de una cantidad terapéuticamente efectiva de MTA a dicho individuo. En una realización particular, dicha enfermedad autoinmune es EM.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un método para la prevención y/o tratamiento del rechazo de transplantes en un individuo sometido a un transplante o que va a ser sometido a un transplante, que comprende la administración de una cantidad terapéuticamente efectiva de MTA a dicho individuo.

El empleo de MTA en la prevención y/o tratamiento de enfermedades autoinmunes, en particular, de la EM, y del rechazo de transplantes, supone una forma eficaz de evitar los problemas planteados por las estrategias de tratamiento actuales, tales como los efectos secundarios a largo plazo de corticoides, inmunosupresores e inmunomoduladores utilizados en el tratamiento de enfermedades autoinmunes y del rechazo de transplantes.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 es un gráfico ilustrativo de la inducción de EAE en rata Lewis con MBP_{68-82} de cobaya. Se muestra la media de la puntación clínica diaria +S.E.M para cada grupo de ratas, donde (*) significa la diferencia estadísticamente significativa a $p< 0,05$ frente al tratamiento con MTA, y (**) significa la diferencia estadísticamente significativa a $p<0,005$ frente al tratamiento con MTA. Los datos son recopilados de 3 experimentos individuales.

La Figura 2 es un gráfico ilustrativo de la inducción de EAE crónico-recurrente en rata DA con rMOG. Se muestra la media de la puntuación clínica diaria +S.E.M para cada grupo de ratas, donde (*) indica la diferencia estadísticamente significativa a $p<0,005$ frente al tratamiento con MTA.

La Figura 3 es un gráfico ilustrativo de la curva de supervivencia de ratas DA inmunizadas con MOG hasta alcanzar discapacidad moderada (puntuación = 3,5) ($p<0,001$ por el test de Breslow) [Figura 3A] y de la curva de supervivencia hasta alcanzar exitus (puntuación = 5) ($p=0,02$ por el test de Breslow) en ratas DA inmunizadas con MOG [Figura 3B].

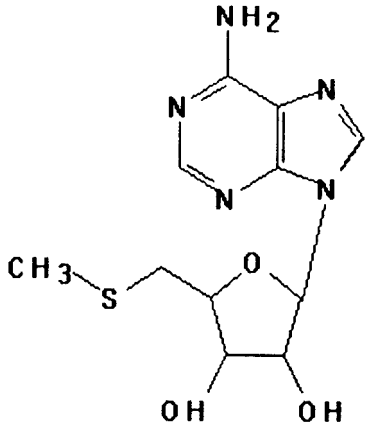
La Figura 4 es un diagrama de barras que muestra la respuesta MBP-específica de los linfocitos T de rata Lewis inmunizada con MBP a día 16 tras la inmunización. Los resultados están expresados como media del índice de estimulación, donde (*) significa la diferencia estadísticamente significativa a $p< 0,05$ frente al tratamiento placebo.

La Figura 5 es un diagrama de barras que muestra un patrón de expresión de mRNA de IL-2, IFN-γ, TNF, IL-10 e iNOS en esplenocitos de ratas con EAE. Los datos se expresan de forma relativa respecto al nivel del gen constitutivo 18S ARNr, donde (*) significa la diferencia significativa a $p<0,05$ frente a MTA.

La Figura 6 es un diagrama de barras que muestra las puntuaciones histológicas de las lesiones inflamatorias y desmielinizantes, donde (*) significa la diferencia estadísticamente significativa a $p<0,05$ frente a MTA.

Descripción detallada de la invención

En un aspecto, la invención se relaciona con el empleo de MTA



sus sales farmacéuticamente aceptables y/o profármacos, en la elaboración de un medicamento para (i) la prevención y/o tratamiento de una enfermedad autoinmune o (ii) para la prevención y/o el tratamiento del rechazo de transplantes.

Tal como aquí se utiliza, el término "sales farmacéuticamente aceptables" se refiere a cualquier sal de MTA que puede ser utilizada en la elaboración de un medicamento. La naturaleza de la sal no es crítica siempre y cuando sea farmacéuticamente aceptable. Entre las sales farmacéuticamente aceptables de MTA se encuentran las sales de adición de ácido, las cuales pueden obtenerse a partir de ácidos, orgánicos o inorgánicos, por métodos convencionales bien conocidos por los técnicos en la materia haciendo reaccionar el ácido apropiado con la MTA en la cantidad estequiométrica adecuada. Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de ácidos que pueden utilizarse para la obtención de dichas sales de adición de ácido incluyen ácidos orgánicos, por ejemplo, ácido ascórbico, ácido cítrico, ácido 1,4-butanodisulfónico, ácido p-toluensulfónico, etc., o inorgánicos, por ejemplo, ácido clorhídrico, ácido sulfúrico, etc. A modo ilustrativo, en formulaciones inyectables se puede utilizar, por ejemplo, MTA hidrocloruro; en formulaciones orales, se puede utilizar MTA hidrocloruro, MTA sulfato, MTA citrato, MTA ascorbato, MTA 1,4-butanodisulfonato (comprimidos gastrorresistentes), MTA p-toluensulfonato, etc.

Asimismo, dentro del alcance de esta invención se encuentran las profármacos de MTA. El término "profármaco" tal como aquí se utiliza incluye a cualquier compuesto derivado de MTA, por ejemplo, éster, amida, etc., que, cuando se administra a un individuo es capaz de proporcionar, directa o indirectamente, MTA en dicho individuo. Ventajosamente, dicho derivado es un compuesto que aumenta la biodisponibilidad de la MTA cuando se administra a un individuo o que potencia la liberación de MTA en un compartimento biológico. La naturaleza de dicho derivado no es crítica siempre y cuando pueda ser administrado a un individuo y proporcione MTA en un compartimento biológico de un individuo. La preparación de dicho profármaco puede llevarse a cabo mediante métodos convencionales conocidos por los expertos en la materia.

El MTA es un producto comercial que puede ser proporcionado por la compañía Sigma. Alternativamente, dicho compuesto puede ser obtenido por métodos conocidos, por ejemplo, a partir de S-adenosil-metionina (SAM) mediante el procedimiento descrito por Schlenk F. *et al.*, Arch. Biochem. Biophys., 1964, 106:95-100, tal como se menciona en el Ejemplo que acompaña a esta descripción.

Para su administración en la prevención y/o tratamiento de una enfermedad autoinmune, tal como EM, o en la prevención y/o tratamiento del rechazo de un transplante, la MTA, sus sales farmacéuticamente aceptables y/o profármacos, se formularán en una composición farmacéutica apropiada, en la cantidad terapéuticamente efectiva, junto con uno o más vehículos, adyuvantes o excipientes farmacéuticamente aceptables.

Ejemplos de composiciones farmacéuticas incluyen cualquier composición sólida (e.g., comprimidos, cápsulas, gránulos, etc.) o líquida (e.g., soluciones, suspensiones, emulsiones, etc.) para su administración por cualquier vía de administración apropiada, por ejemplo, oral, subcutánea, intraperitoneal, intravenosa, etc., típicamente, por vía oral debido al carácter crónico de la enfermedad a tratar.

En una realización particular, dichas composiciones farmacéuticas pueden estar en una forma farmacéutica de administración por vía oral, bien en forma sólida o líquida. Ejemplos ilustrativos de formas farmacéuticas de administración por vía oral incluyen comprimidos, cápsulas, granulados, soluciones, suspensiones, etc., y pueden contener los excipientes convencionales, tales como aglutinantes, diluyentes, desintegrantes, lubrificantes, humectantes, etc., y pueden ser preparadas por métodos convencionales. Las composiciones farmacéuticas también pueden ser adaptadas para su administración parenteral, en forma de, por ejemplo, soluciones, suspensiones o productos liofilizados, estériles, en la forma de dosificación apropiada; en este caso, dichas composiciones farmacéuticas incluirán los excipientes adecuados, tales como tampones, tensioactivos, etc. En cualquier caso, los excipientes se elegirán en función de la forma farmacéutica de administración seleccionada. Una revisión de las distintas formas farmacéuticas de administración de fármacos y de su preparación puede encontrarse en el libro "Tratado de Farmacia Galénica", de C. Faulí i Trillo, 10 Edición, 1993, Luzán 5, S.A. de Ediciones.

Para su aplicación en terapia la MTA se encontrará preferiblemente en una forma farmacéuticamente aceptable o sustancialmente pura, es decir, que la MTA tiene un nivel de pureza farmacéuticamente aceptable excluyendo los excipientes farmacéuticamente aceptables y no incluyendo material considerado tóxico a los niveles de dosificación normales. Los niveles de pureza para la MTA son preferiblemente superiores al 50%, más preferiblemente, superiores al 70%, más preferiblemente, superiores al 90%. En una realización preferida, son superiores al 95% de MTA.

En general, la cantidad terapéuticamente efectiva de MTA a administrar dependerá, entre otros factores, del individuo que vaya a ser tratado, de la severidad de la enfermedad que padezca dicho individuo, de la forma de administración elegida, etc. Por este motivo, las dosis mencionadas en esta invención deben ser consideradas tan solo como guías para el experto en la materia, y éste debe ajustar las dosis en función de las variables citadas anteriormente. No obstante, se puede administrar MTA, una o más veces al día, por ejemplo, 1, 2, 3 ó 4 veces al día, en una cantidad típica total diaria comprendida entre 25 y 75 mg/kg/día.

La MTA, sus sales farmacéuticamente aceptables y/o profármacos, y las composiciones farmacéuticas que los contienen pueden ser utilizadas junto con otros fármacos adicionales útiles en la prevención y/o tratamiento de enfermedades autoinmunes o de rechazo de transplante, por ejemplo, corticoides, inmunosupresores, inmuno-moduladores, etc., para proporcionar una terapia de combinación. Dichos fármacos adicionales pueden formar parte de la misma composición farmacéutica o, alternativamente, pueden ser proporcionados en forma de una composición separada para su administración simultánea o no a la de la composición farmacéutica que comprende MTA, o un profármaco o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma.

Tal como se utiliza en esta descripción, "enfermedad autoinmune" es una enfermedad que obedece al desencadenamiento de mecanismos agresivos de las defensas (sistema inmune) del enfermo contra los tejidos de su propio organismo. Más concretamente, las enfermedades autoinmunes se caracterizan porque en ellas predomina la inflamación por inmunidad adaptativa (también llamada específica o adquirida), donde la inmunidad se estimula tras la exposición a agentes infecciosos y sus componentes principales son los linfocitos. Un listado de enfermedades autoinmunes se puede encontrar en la página web de la Asociación Americana de Enfermedades Autoinmunes (American Autoimmune Related Diseases Association) [http://www.aarda.org/]. Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de enfermedades autoinmunes incluyen: EM, enfermedad de Crohn, artritis reumatoide, diabetes mellitus tipo 1, psoriasis, lupus, colitis ulcerosa, vitíligo, celíaca, vasculitis, dermatomiositis, polimiositis, tiroiditis (Hashimoto, Graves), miastenia gravis, síndrome de Guillain-Barre, uveítis, liquen plano, arteritis de la temporal, sarcoidosis, síndrome seco (Sjöegren), asma bronquial, penfigo, espondilitis anquilosante, esclerodermia, fibromialgia, fiebre reumática, etc.

En una realización particular, la invención va dirigida al empleo de MTA, sus sales farmacéuticamente aceptables y/o profármacos, en la elaboración de un medicamento para la prevención y/o el tratamiento de la EM, en particular, en el tratamiento de la EM, y, más en particular, en la prevención y/o tratamiento de la EM en el retardo de la aparición de brotes posteriores o en la progresión de su enfermedad (fase progresiva) en un individuo que padece EM, es decir, después de que la EM ya se hubiera iniciado. Ensayos realizados por los inventores han puesto de manifiesto, además del efecto preventivo de la MTA en el desarrollo de autoinmunidad observado en la prevención de EAE en ratas Lewis inmunizadas con MBP (modelo de EAE aguda), se ha observado que la MTA también posee un efecto curativo de la autoinmunidad crónica ya que el tratamiento con MTA mejoraba los síntomas clínicos y la supervivencia cuando la enfermedad (EM) ya estaba iniciada, tal como se ha podido comprobar en el modelo de EAE-CR con ratas DA inmunizadas con rMOG. Este aspecto tiene una gran importancia dado que, actualmente, solo se pueden emplear los tratamientos inmunomoduladores cuando la enfermedad ya ha comenzado, sin poder realizar un tratamiento preventivo al no existir marcadores en pre-sintomáticos.

En otra realización particular, la invención se relaciona con el empleo de la MTA, sus sales farmacéuticamente aceptables y/o profármacos, en la elaboración de un medicamento para la prevención y/o el tratamiento del rechazo de transplantes. La MTA, sus sales farmacéuticamente aceptables y/o profármacos, pueden ser utilizados para prevenir y/o tratar el rechazo de, prácticamente, cualquier transplante. Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de tales transplantes incluyen: transplante renal, hepático, cardiaco, pulmonar, intestino, hematopoiético y de médula ósea, cutáneo, de extremidades, córnea, páncreas, de células madre y terapia celular, de injertos o biomateriales, etc.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un método para la prevención y/o tratamiento de una enfermedad autoinmune en un individuo que padece una enfermedad autoinmune, que comprende la administración de una cantidad terapéuticamente efectiva de MTA, o de una de sus sales farmacéuticamente aceptables y/o profármacos, a dicho individuo. Las enfermedades autoinmunes que pueden ser tratadas han sido definidas previamente, al igual que las características de administración, composición farmacéutica y cantidad terapéuticamente efectiva de MTA. En una realización particular, dicha enfermedad autoinmune es EM. La MTA, sus sales farmacéuticamente aceptables y/o profármacos, en una realización concreta, puede ser utilizada para retardar la aparición de brotes posteriores en un individuo que padece EM o para retardar la progresión de la EM (fase progresiva) en un individuo que padece EM.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un método para la prevención y/o tratamiento del rechazo de transplantes en un individuo que va a ser sometido a un transplante o que ha sido sometido a un transplante, que comprende la administración de una cantidad terapéuticamente efectiva de MTA, o de una de sus sales farmacéuticamente aceptables y/o profármacos, a dicho individuo. Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de transplantes cuyo rechazo puede ser prevenido o tratado con MTA, sus sales farmacéuticamente aceptables y/o profármacos, ya han sido mencionados previamente, así como las características de administración, composición farmacéutica y cantidad terapéuticamente efectiva de MTA. Dicha composición farmacéutica puede administrarse tanto antes como después del transplante (es decir, con fines profilácticos o terapéuticos) o bien antes y después del transplante, aunque no haya inicialmente síntomas de rechazo (es decir, con fines profilácticos).

Tal como se utiliza en esta descripción, el término "individuo" se refiere a cualquier mamífero, e incluye, aunque no se limita a, animales domésticos, roedores, primates y humanos. Preferentemente, dicho individuo es un ser humano, macho o hembra, de cualquier edad o raza.

En una realización particular de la invención, la administración de MTA se lleva a cabo en solitario o en combinación con otras terapias o con otros medicamentos, en forma de una terapia combinada.

El siguiente ejemplo ilustra la invención y no debe ser considerado limitativo del alcance de la misma.

Ejemplo

Desde los años 70 se consideraba el modelo de Encefalomielitis Autoinmune Experimental (EAE) aguda como modelo de la Esclerosis Múltiple (EM) y que, por tanto, los tratamientos efectivos en EAE aguda lo serían en EM. Sin embargo, se han ensayado cientos de compuestos que han sido efectivos en EAE aguda y no en EM (Hohlfeld R. & Wekerle H. Proceeding National Academy of Sciences USA October 2004, Vol. 101, Suppl. 2, página 14599, epígrafe: MS and EAE, párrafo 3). A la vista de ello, aparte de demostrar la eficacia en la prevención de EAE aguda, es necesario demostrar la eficacia en la curación de la EAE crónica-recurrente (modelo de EM en general). En este sentido, en este Ejemplo se han utilizado dos modelos animales no humanos para demostrar la eficacia de MTA en el tratamiento de las enfermedades autoinmunes y, en particular, EM, concretamente, (i) EAE aguda en rata Lewis inmunizada con BMP [modelo del brote de EM y de la Encefalomielitis Aguda Diseminada (EAD)] y (ii) EAE crónico-recurrente (EAE-CR) en rata Dark Agouti (DA) inmunizada con MOG [modelo de EM].

I. **Materiales y métodos**

Animales

Para el modelo de EAE aguda generado por inmunización con proteína mielínica básica (MBP) se utilizaron ratas Lewis hembras de Charles River de 6-8 semanas y con un peso de 175-200 gramos.

Para el modelo de EAE crónico-recurrente generado por inmunización con glicoproteína del oligodendrocito (MOG) se utilizaron ratas Dark Agouti (DA) con un peso aproximado de 200 gramos.

Los animales fueron alojados en jaulas de plástico en una habitación con luz natural y se les administró comida y bebida a diario.

Inducción y puntuación de EAE

Las ratas Lewis fueron inmunizadas con 100 μl de una emulsión que contenía solución salina y adyuvante de Freund incompleto (IFA) con 75 μg de MBP (fragmento 68-82 de la proteína mielínica básica de cobaya (Sigma), a volúmenes iguales, y suplementada con 4 mg/ml de *Mycobacterium tuberculosis* H37RA (Difco). La inmunización tuvo lugar en la base de ambas patas traseras.

Las ratas DA fueron inmunizadas con 100 μl de una emulsión que contenía solución salina y adyuvante de Freund incompleto (IFA) con 75 μg de rMOG [Villoslada, P., *et al*., J Exp Med, 2000. 191(10):1799-806] (purificado en nuestro laboratorio) a volúmenes iguales y también suplementada con 4 mg/ml de *Mycobacterium tuberculosis*. La inmunización tuvo lugar en la base de ambas patas traseras de la misma manera que las ratas Lewis.

Los animales se pesaban y se les inspeccionaban los síntomas clínicos de EAE de forma diaria por un evaluador ciego para el tratamiento. La severidad de la EAE se midió con la siguiente escala: 0 = normal; 1 = cola flácida; 2 = leve parapesis de las patas traseras, locomoción inestable; 3 = paraplejia; 4 = tetraparesis; 5 = moribunda.

Tratamientos

Las ratas Lewis inmunizadas con MBP se dividieron en 2 grupos de forma aleatoria. Uno de los grupos fue tratado con MTA (concentración 100 μM) con una dosis de 4,3 mg/animal (equivalente a 28,6 μg/kg de peso corporal). La MTA fue sintetizada a partir de SAM (Europharma, Madrid (España)), por el procedimiento descrito por Schlenk F. *et al*., Arch. Biochem. Biophys., 1964, 106:95-100, en la División de Hepatología y Terapia Génica del Departamento de Medicina Interna, CIMA, Universidad de Navarra, reconstituido en dimetilsulfóxido al 10% (DMSO), y el otro grupo placebo fue tratado con suero fisiológico y DMSO al 10% mediante inyección intraperitoneal (i.p) de forma diaria tras la inmunización.

Las ratas DA inmunizadas con rMOG también se dividieron en dos grupos de forma aleatoria, uno de los cuales fue tratado con MTA 100 μM reconstituido en Tris 300 mM pH = 7,8, y el otro grupo placebo fue tratado con Tris 300 mM únicamente. Los tratamientos comenzaron a día 15 tras la inmunización y se suministraron mediante inyección i.p de forma diaria. Las puntuaciones se valoraron de forma ciega durante todo el transcurso de la enfermedad.

Muestras de tejidos

Los dos grupos de ratas Lewis fueron anestesiados y perfundidos por vía intracardíaca con paraformaldehído al 4% en buffer fosfato 0,1 M (pH 7,6) a día 16 de la enfermedad. Se extrajeron y se fijaron toda la noche a 4°C los cerebros y segmentos de médula cervical, torácica y lumbar. Tras la fijación, los tejidos fueron embebidos en parafina para histopatología e inmunohistoquímica.

Los dos grupos de ratas DA fueron anestesiados y perfundidos usando el mismo protocolo a día 35 tras la inmunización. Los tejidos fueron tratados también de la misma manera para los estudios de histopatología e inmunohistoquímica.

También se obtuvieron muestras de bazo, hígado y sangre de cada animal. Los bazos e hígados fueron congelados rápidamente en nitrógeno líquido y guardados en fragmentos a -80°C para poder hacer los estudios con RT-PCR (retrotranscripción-reacción en cadena de la polimerasa). La sangre se centrifugó a 800 rpm durante 10 minutos para poder obtener el suero que fue guardado a -80°C.

Aislamiento de ARN y síntesis de ADNc

Los segmentos de tejido de bazo e hígado fueron homogeneizados en buffer de lisis de ARN con un 2% de β-mercaptoetanol usando un homogeneizador manual. El ARN total se extrajo usando el kit RNeasy Mini Kit (Quiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante. Durante la purificación del ARN, el ADN se eliminó mediante un tratamiento con DNasa. La concentración y pureza del ARN fue determinada midiendo la absorbancia a 260 nm y 280 nm en un espectrofotómetro (Eppendorf). Se realizó la retrotranscripción del RNA total mediante el kit High Capacity ADNc Archive Kit (Applied Biosystems). La reacción de retrotranscripción se llevó a cabo a 25°C durante 10 minutos, 37°C durante 2 horas y finalmente se guardó a 4°C.

Cebadores y diseño de sondas

Se utilizaron las secuencias de los cebadores y las sondas específicas de Taqman marcadas con fluorescencia (Taqman Gene Expresión Assays) (Applied Biosystems) para ARNr 18S de eucariotas, interferon-gamma (IFN-γ), interleuquina 2 (IL-2), factor de necrosis tumoral alfa (TNF-α), interleuquina 10 (IL-10) y óxido nítrico sintasa inducible (iNOS).

PCR cuantitativa en tiempo real

Para la PCR cuantitativa, se usó el TaqMan Universal Master Mix (Applied Biosystems). La amplificación del ADNc se realizó en placas de 96 pocillos (MJ Research, Inc.) en un sistema de tiempo real Opticón 2 (MJ Research). La reacción se realizó en una mezcla de reacción final de 25 μl compuesta por 1X TaqMan Universal Master Mix, 1 X TaqMan Gene Expression Assay Mix (0,9 μM de cada cebador y 0,25 μM para la sonda), y 20 ng de ADNc disuelto en agua libre de RNasas y DNasas.

Las condiciones de la reacción fueron las siguientes: 2 min a 50°C, 10 min a 95°C y 40 ciclos de 15 s a 95°C y 1 min a 60°C. Cada muestra se cargó por triplicado y en cada placa el blanco y el control endógeno se amplificaron en distintos pocillos.

Los niveles de expresión de ARNm de IL-2, IFN-γ, TNF-α, IL-10 e iNOS se cuantificaron de forma relativa respecto al gen constitutivo ARNr 18S.

Histopatología, inflamación y desmielinización

Se realizó la evaluación histológica de las secciones de cerebro y médula incluidas en parafina. Las secciones se tiñeron con hematoxilina-eosina (HE) y Luxol fast-blue para poder valorar la inflamación y desmielinización de los tejidos. Se examinaron 24-30 secciones sagitales por rata. Se realizó la evaluación histológica semi-cuantitativa para inflamación y desmielinización de forma ciega tal como se ha descrito previamente [Villoslada, P., *et al*., J Exp Med, 2000. 191(10):1799-806].

Inmunohistoquímica

Los procedimientos inmunohistoquímicos se realizaron en secciones de cerebro y médula de 10 μm incluidas en parafina. La actividad peroxidasa endógena se inactivó con H_2O_2 al 0,3% en metanol durante 20 min.

Las secciones se incubaron durante 30 min en PBS con 0,5% de Tween® 20 y un 10% de suero de cabra o de caballo (Vector Laboratorios) y 2 horas en PBS con 0,5% de Tween® 20 y los anticuerpos primarios en las siguientes diluciones: anticuerpo anti-proteína policlonal anti-glial fibrilar ácida de conejo (GFAP), 1:1000 (Dakocitomation); anticuerpo anti-proteína precusora del beta amiloide de ratón (APP), 1:100 (Zymed laboratorios); anticuerpo anti-IgA de ratón (OX-6), 1:200 (Serotec); anticuerpo anti-CD8 de rata, 1:250 (Serotec); anticuerpo anti-iNOS tipo II, 1:250 (Serotec); anticuerpo anti-CD68 de rata (ED1), 1:200 (Serotec) y anticuerpo anti-CD43 de rata (W3/13), 1:50 (Serotec). Más tarde, las secciones se lavaron con PBS y se incubaron durante 45 min a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario IgG biotinilado apropiado (1:100 en PBS; Vector Laboratorios), seguido de varios lavados en PBS/Tween® y de una incubación de 45 min a temperatura ambiente con el complejo peroxidasa avidina-biotina (ABC, Vector Laboratorios).

Después de los lavados en PBS/Tween® la inmunoreactividad se reveló usando 0,5 mg/ml de 3,3'-diaminobenzidina tetrahidroclorato (DAB; Sigma). La especificidad de la inmunoreacción se determinó incubando las secciones sin el anticuerpo primario. Las imágenes se obtuvieron por microscopio óptico.

Ensayo de proliferación de linfocitos

Los esplenocitos se purificaron mediante centrifugación por densidad de Ficoll Hypaque a partir de las ratas con EAE y de ratas no inmunizadas. El ensayo de proliferación de linfocitos se realizó de la misma forma que la descrita previamente [Villoslada, P., *et al*., J Exp Med, 2000. 191(10):1799-806].

Brevemente, los esplenocitos se pusieron en cultivo a una concentración de 2 x 10^6/ml en medio RPMI 1640 suplementado con suero bovino fetal al 10% y penicilina/estreptomicina, con o sin fitohemaglutinina (PHA, 5 μg/ml), MBP (10 μg/ml), MTA (100 μM) y DMSO. Los cultivos se incubaron durante 5 días en placas de 96 pocillos con base redondeada (0,2 ml/pocillo) a 37°C. Los pocillos fueron pulsados con 0,5 μCi [^{3}H]TdR durante 18 horas. La lectura se realizó utilizando un contador de líquido de centelleo. Los resultados se expresaron como la media del índice de estimulación del triplicado de las determinaciones.

Análisis estadístico

La comparación estadística se llevó a cabo con el test de dos colas de Mann- Whitney y curvas de supervivencia. Los valores de $p<0,05$ son considerados como diferencias significativas. La evaluación estadística se llevó a cabo usando el programa estadístico SPSS 11.0.

II. **Resultados**

Efecto del MTA en el desarrollo del modelo de brote de EM (EAE aguda) en rata Lewis inmunizada con MBP

Empezando por el mismo día de la inmunización, las ratas Lewis fueron asignadas de forma aleatoria al grupo tratado con MTA o al grupo placebo, administrados ambos de forma intraperitoneal (i.p) diariamente. Todos los animales del tratamiento placebo menos uno desarrollaron síntomas neurológicos de EAE consistentes en pérdida progresiva de peso, cola sin fuerza y parálisis de las patas traseras o paraplejia moderada o grave. Los primeros síntomas neurológicos se observaron a día 12 con una media del día de comienzo de la enfermedad 13,6 ± 1,2 (n = 21). La puntuación máxima que alcanzaron los animales individuales durante el transcurso del experimento fue 1,48 ± 1 (Tabla 1).

TABLA 1

Puntuación EAE

Tratamiento	Número de ratas	Incidencia EAE	Inicio EAE (días)	Puntuación Max.EAE	Puntuación acumulativa EAE
MTA	14	4/14 (28,57%)	15 ± 1,2	0,14 ± 0,23	2 ± 0,07
Placebo	21	20/21(95,23%)[a]	13,6 ± 1,2	1,48 ± 1[a]	83,5 ± 0,65[a]

[a] diferencia estadísticamente significativa a p<0,005 frente a tratamiento con MTA

Por el contrario, los animales tratados con MTA o no mostraron signos clínicos o bien mostraron una fuerte atenuación del curso de la enfermedad. En estos animales tratados que desarrollaron signos clínicos, el inicio de la enfermedad se retrasó en comparación con el grupo placebo (día 15 ± 1,2). Las puntuaciones clínicas máximas observadas fueron significativamente menores que las del grupo placebo (0,14 ± 0,23) (Tabla 1) (Figura 1).

Efecto del MTA en el desarrollo del modelo de EM (EAE-CR) en rata DA inmunizada con MOG

Tras pasar el primer brote [5 días tras el inicio del primer brote (aproximadamente hacia el día 15-18 tras la inmunización)], las ratas DA fueron asignadas de forma aleatoria al grupo tratado con MTA o al grupo placebo, administrados ambos de forma intraperitoneal (i.p) diariamente. Todos los animales desarrollaron un segundo brote de la enfermedad pero las diferencias en los síntomas neurológicas, gravedad del segundo brote y supervivencia fueron significativas entre ambos grupos. En los animales tratados con MTA, el inicio del segundo brote se retrasó en comparación con el grupo placebo (día 23,4 ± 6,54) aunque las diferencias no llegaron a ser significativas. Las puntuaciones clínicas máximas observadas fueron menores que las del grupo placebo (2,7 ± 1,75) (Tabla 2) (Figura 2). Además, la supervivencia fue significativamente mayor en el grupo tratado con MTA (Figura 3).

TABLA 2

Puntuación EAE

Tratamiento	N° de ratas	Incidencia 2° brote	Inicio (días) 2° brote	Puntuación Máxima EAE	Puntuación Acumulada EAE
MTA	10	10/10	26±6	1,8± 1,5	23±20
Placebo	10	10/10	21 ± 3*	3,6 ± 1,5*	50 ± 20*

* diferencia estadísticamente significativa a p<0,05 frente al tratamiento con MTA

MTA inhibe la proliferación de linfocitos

Para investigar si el tratamiento con MTA modificaba la respuesta del sistema inmune periférico hacia el antígeno usado en la inmunización, se midieron las respuestas de proliferación inducidas por MBP en esplenocitos de los animales tratados con MTA y placebos (en ratas Lewis). La respuesta proliferativa específica para MBP era significativamente menor en los animales tratados con MTA, tal como se puede apreciar en la Figura 4. Así, el índice de estimulación del grupo tratado con MTA era 1,18 ± 0,4 y el del grupo placebo 2,13 ± 1,09, indicando que las respuestas de las células T están afectadas por el tratamiento con MTA. Por tanto, se observa que la MTA inhibe la activación MBP específica de los linfocitos indicando su efecto inmunomodulador.

MTA modifica la expresión de citoquinas y mediadores pro-inflamatorios

Se evaluó si MTA tenía la capacidad de modificar la expresión de citoquinas y otros mediadores pro-inflamatorios. La expresión génica de IL-2, IFN-γ, TNF-α, IL-10 e iNOS se investigó mediante PCR cuantitativa en tiempo real (RT-PCR). Los niveles relativos de mRNA de estos genes aislados de esplenocitos de ratas Lewis placebo y de las ratas tratadas con MTA se muestran en la Figura 5. La expresión del mRNA de las citoquinas previamente mencionadas se encontró disminuida en comparación con los animales del grupo placebo aunque sólo los niveles de TNF fueron significativamente diferentes.

Análisis Histológico

La evaluación neuropatológica confirmó la protección clínica observada. El examen de las médulas y cerebros de los animales placebo mostró múltiples focos de inflamación. Las lesiones inflamatorias se encontraron tanto en sustancia blanca como gris de médula cervical, torácica, lumbar y de cerebro. En las ratas tratadas con MTA, tanto el número como el tamaño de los infiltrados inflamatorios se encontró reducido (Figura 6). Había importantes diferencias entre los animales placebo y los tratados con MTA tanto en la severidad como en las regiones del sistema nervioso central (SNC) afectadas. El tratamiento con MTA inhibe el desarrollo de la EAE inflamatoria en rata Lewis inmunizada con MBP. La tinción immunohistoquímica reveló la presencia de varios tipos celulares en los infiltrados inflamatorios, incluyendo macrófagos y células de la microglía activada (ED1), linfocitos T (W3/13) y linfocitos B (OX-6). El número de células ED1 y W3/13 positivas fue mayor en el grupo placebo, mientras las células OX-6 positivas se encontraron en las mismas proporciones en ambos grupos de animales. Las tinciones para APP e iNOS se encontraron en niveles muy bajos de detección en ambos grupos.

III. **Discusión**

La EAE es un modelo de autoinmunidad dependiente de forma crítica de la activación de las células T. Las células CD4+ específicas para MBP ó MOG, dos auto-antígenos del SNC, pueden inducir EAE. La activación linfocitaria es necesaria para la entrada inicial en el SNC. El reconocimiento del antígeno por las células T CD4+ requiere la expresión de moléculas de MHC de clase II en las células presentadoras de antígeno (APC). El SNC en condiciones normales tiene una expresión muy baja de estas moléculas. Mediante la secreción de IFN-γ, un potente estimulador de la expresión de moléculas MHC de clase II en células presentadoras de antígeno residentes del SNC, tales como microglia y astrocitos, las células Thl reconocen la mielina. Por tanto, un tratamiento que interfiera con la activación de los linfocitos T puede inhibir el desarrollo de enfermedades autoinmunes, tales como la EAE.

La disminución de la respuesta proliferativa específica para MBP en ratas Lewis inmunizadas con MBP y tratadas con MTA indica que la metilación es un paso crítico en la activación linfocitaria. La inhibición selectiva de las células T reactivas frente a MBP previene la activación de linfocitos autorreactivos y la entrada de las células inflamatorias en el SNC mediante la producción de citoquinas y/o quimioquinas. Esto lleva, como consecuencia, a una enfermedad menos grave, tal como se puede ver en la escala clínica de EAE y en los análisis histológicos de los animales tratados con MTA. La escala acumulativa de EAE en el grupo tratado con MTA es significativamente menor que en el del grupo placebo y en los análisis histológicos se puede apreciar que el número de lesiones inflamatorias se reduce considerablemente.

Además del efecto preventivo de la MTA en el desarrollo de autoinmunidad observado en la prevención de EAE en ratas Lewis, se ha observado que la MTA también posee un efecto curativo de la autoinmunidad crónica. El tratamiento con MTA mejoraba los síntomas clínicos y la supervivencia cuando la enfermedad ya estaba iniciada (tras el primer brote), tal como se ha podido comprobar en el modelo de EAE con ratas DA inmunizadas con rMOG. Este aspecto es de importancia critica a nivel médico dado que en la práctica se pueden emplear los tratamientos inmunomoduladores cuando la enfermedad ya ha comenzado, sin poder de momento realizar un tratamiento preventivo al no existir marcadores en pre-sintomáticos.

Las citoquinas producidas por las células T pueden influenciar el curso de la enfermedad de forma importante. Como se aprecia en la Figura 5 se encontraron menores niveles de expresión de citoquinas en la ratas tratadas con MTA. Una de las características de la EAE es la activación de la expresión de iNOS en diversos tipos celulares. Los inventores observaron que la expresión de iNOS estaba reducida en los bazos de las ratas tratadas con MTA. TNF es una citoquina reconocida como mediador central de la inflamación sistémica y que además contribuye a la activación de la expresión génica de iNOS. En este modelo de EAE (EAE-CR) se ha observado que la MTA también reduce los niveles de TNF-α. La IL-2 es una citoquina clave en las respuestas inmunes T dependientes debido a su potente actividad como factor de crecimiento para células T. Los resultados obtenidos ponen de manifiesto que la MTA reduce la producción de IL-2 de los linfocitos inhibiendo la activación específica de las células T. Esta molécula, además, es capaz de disminuir la producción de IFN-γ. Todos estos efectos de la MTA indican que es capaz de modificar el balance de las citoquinas hacia un perfil más anti-inflamatorio.

En conclusión, los estudios realizados demuestran que la MTA previene contra la autoinmunidad en el modelo de EAE en rata Lewis inmunizada con MBP (EAE aguda) y modifica y mejora, es decir, ejerce un efecto terapéutico, la enfermedad en el modelo crónico de EAE en rata DA inmunizada con rMOG (EAE-CR). El mecanismo responsable de estos efectos protectivos sería la inhibición de la activación de las células T MBP ó MOG específicas, aunque pueden estar participando en la protección otras vías de regulación. Estos hallazgos abren una nueva posibilidad de tratamiento de las enfermedades autoinmunes y rechazo de transplantes empleando un medicamento de fácil síntesis, eficaz y con pocos efectos secundarios, lo que supondría un avance significativo en estas enfermedades.

REIVINDICACIONES

1. Empleo de 5'-metiltioadenosina (MTA), sus sales farmacéuticamente aceptables y/o profármacos, en la elaboración de un medicamento para (i) la prevención y/o tratamiento de una enfermedad autoinmune o para (ii) la prevención y/o el tratamiento del rechazo de transplantes.

2. Empleo según la reivindicación 1, en donde dicha enfermedad autoinmune es Esclerosis Múltiple (EM), enfermedad de Crohn, artritis reumatoide, diabetes mellitus tipo 1, psoriasis, lupus, colitis ulcerosa, vitíligo, celíaca, vasculitis, dermatomiositis, polimiositis, tiroiditis (Hashimoto, Graves), miastenia gravis, síndrome de Guillain-Barre, uveítis, liquen plano, arteritis de la temporal, sarcoidosis, síndrome seco (Sjöegren), asma bronquial, penfigo, espondilitis anquilosante, esclerodermia, fibromialgia o fiebre reumática.

3. Empleo según la reivindicación 1, en donde dicha enfermedad autoinmune es Esclerosis Múltiple (EM).

4. Empleo según la reivindicación 3, en donde dicho medicamento retarda la aparición de brotes en un individuo que padece EM o retarda la progresión de la EM (fase progresiva) en un individuo que padece EM.

5. Empleo según la reivindicación 1, en donde dicho transplante se selecciona entre transplante renal, hepático, cardiaco, pulmonar, intestinal, hematopoiético y de médula ósea, cutáneo, de extremidades, de córnea, de páncreas, de células madre y terapia celular, y de injertos o biomateriales.

6. Empleo según la reivindicación 1, en donde dicho medicamento es un medicamento destinado a su administración por vía oral, subcutánea, intraperitoneal o intravenosa.

7. Empleo según la reivindicación 1, en donde dicho medicamento es administrado en combinación con otro fármaco adicional útil en la prevención y/o tratamiento de enfermedades autoinmunes o de rechazo de transplante.

8. Empleo según la reivindicación 7, en donde dicho fármaco adicional útil en la prevención y/o tratamiento de enfermedades autoinmunes o de rechazo de transplante se administra en forma de una composición separada para su administración simultánea o no a la de la composición farmacéutica que comprende MTA.

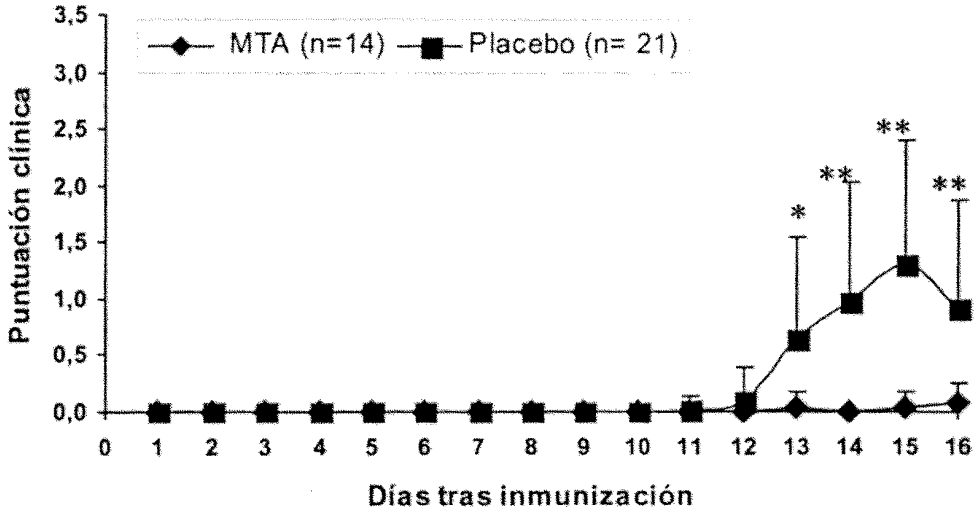


FIGURA 1

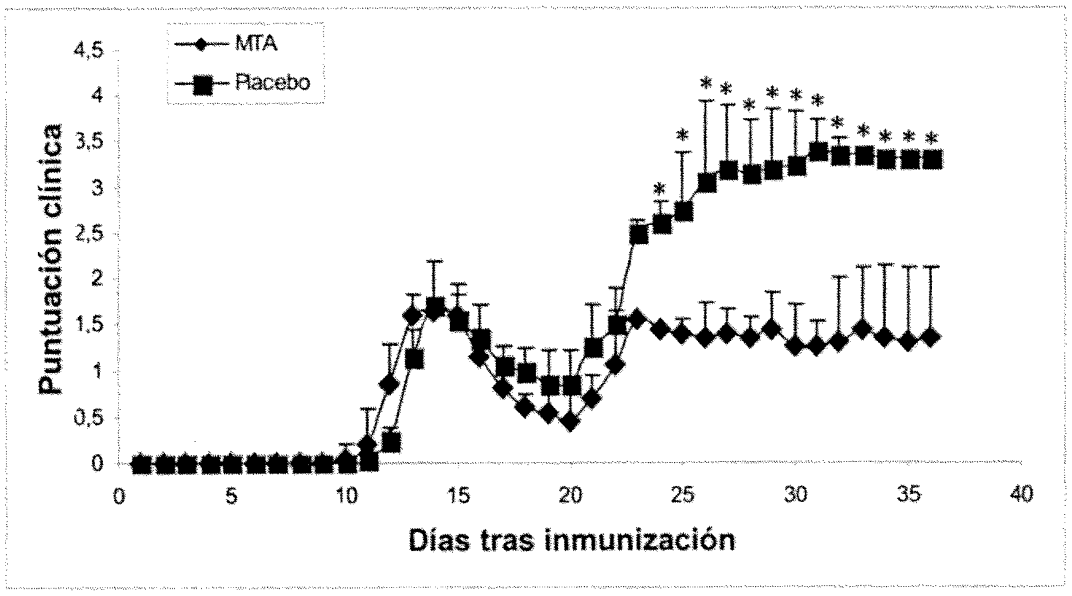
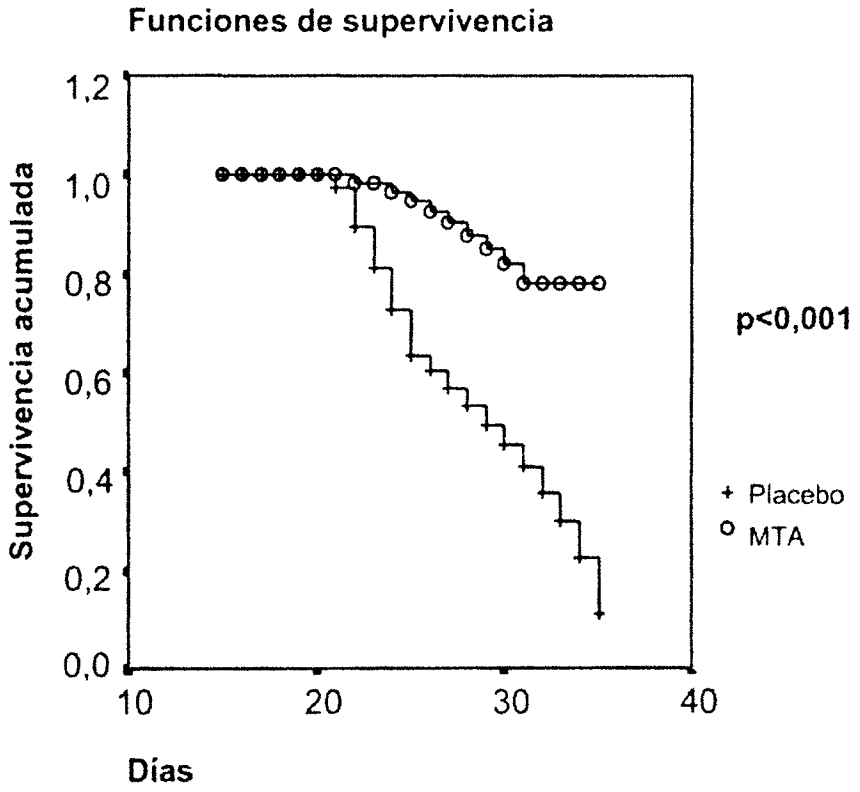


FIGURA 2


Funciones de supervivencia
Supervivencia acumulada
1,2
1,0
0,8
0,6
0,4
0,2
0,0
10
20
30
40
Días
p<0,001
+ Placebo
o MTA

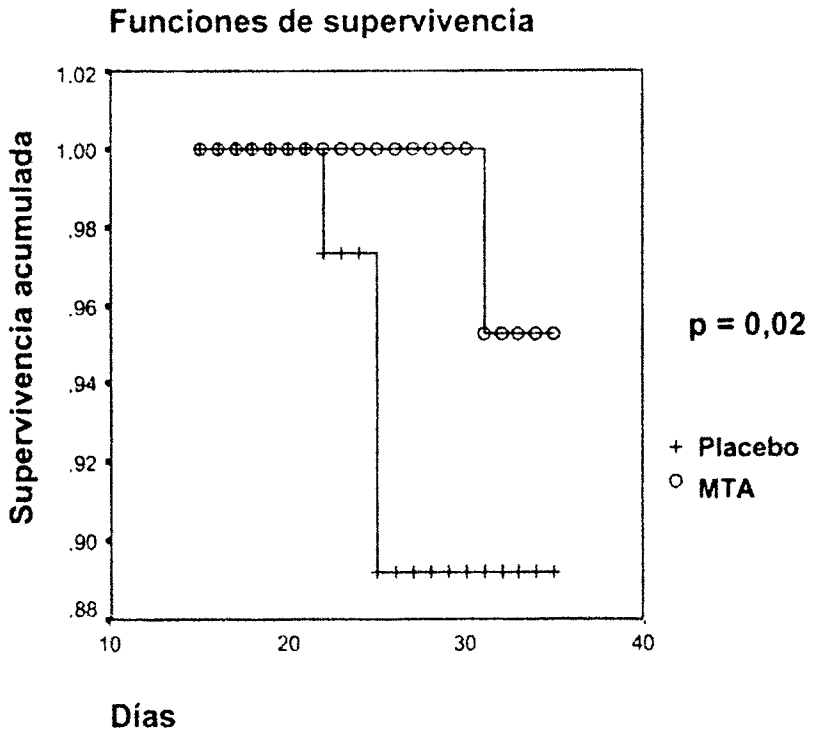

Funciones de supervivencia
Supervivencia acumulada
1.02
1.00
.98
.96
.94
.92
.90
.88
10
20
30
40
Días
p = 0,02
+ Placebo
o MTA

FIGURA 3

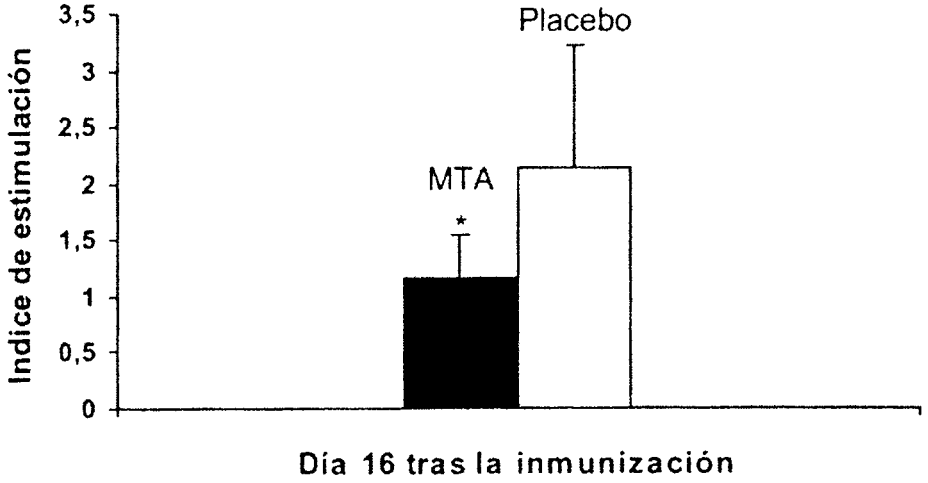


FIGURA 4

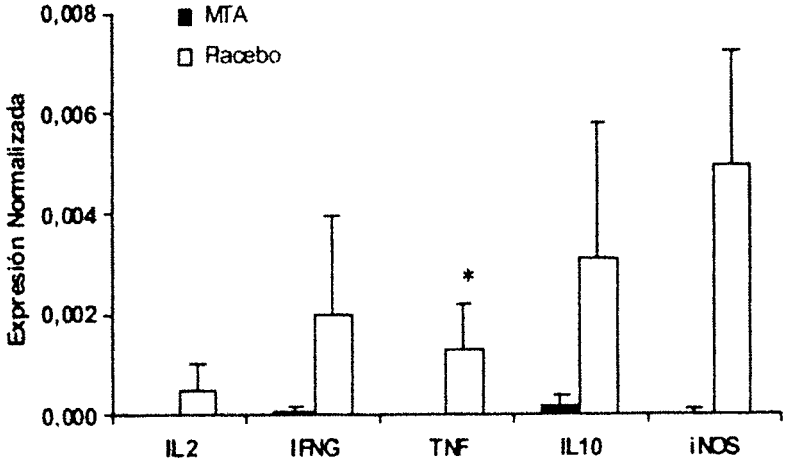


FIGURA 5

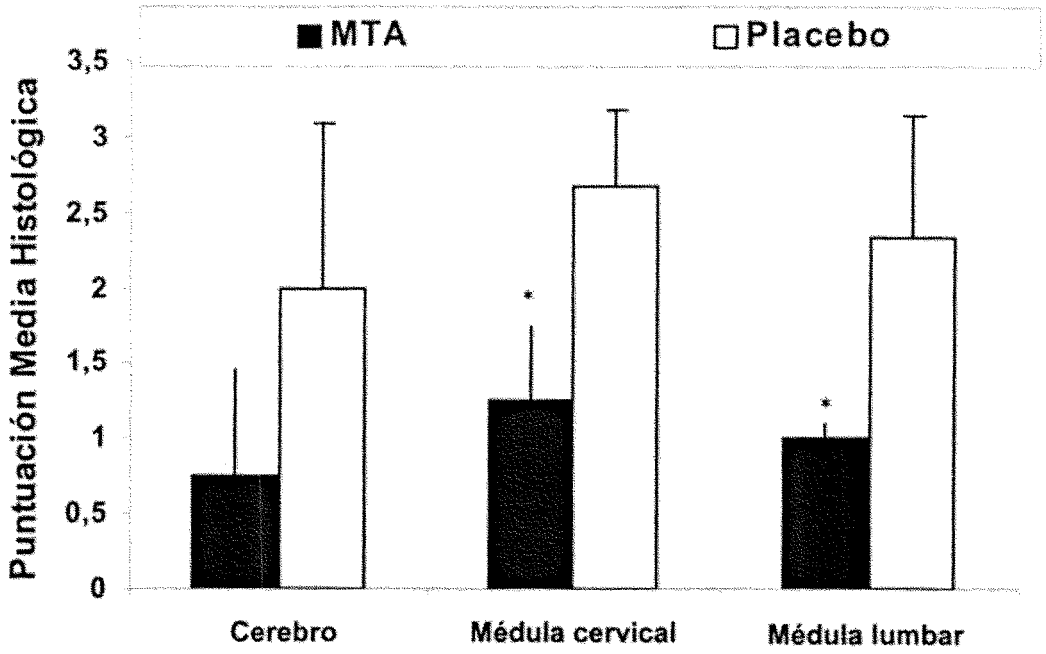

MTA
Placebo
Puntuación Media Histológica
3,5
3
2,5
2
1,5
1
0,5
0
*
*
Cerebro
Médula cervical
Médula lumbar

FIGURA 6

OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) ES 2 259 552

(21) Nº de solicitud: 200500628

(22) Fecha de presentación de la solicitud: **17.03.2005**

(32) Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

(51) **Int. Cl.:** ***A61K 31/7076*** (2006.01)
A61P 37/06 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	EP 352609 A1 (BIORESEARCH) 31.01.1990, reivindicaciones; página 8, líneas 35-55.	1-17
X	WO 9816184 A1 (ICN PHARMACEUTICALS) 23.04.1998, reivindicaciones 1,8,9,13-15.	1-17
X	HEVIA, H. et al. "5'-methylthioadenosine modulates the inflammatory response to endotoxin in mice and in rat hepatocytes". Hepatology, 2004, Vol. 39, páginas 1088-1098. Recuperado de STN, Columbus, Ohio, (EEUU). CAS [en línea], Nº de acceso 141:325363. Resumen.	1-17
A	US 6555518 B1 (MARGREITER et al.) 20.04.2003, reivindicaciones.	1-17
A	WO 03028712 A1 (UNIVESITE LIBRE DE BRUXELLES) 10.04.2003, reivindicaciones.	1-17
A	GB 2074446 A (BIORESEARCH) 04.11.1981, reivindicaciones.	1-17

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia
Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría
A: refleja el estado de la técnica
O: referido a divulgación no escrita
P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud
E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones ☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe	Examinador	Página
16.05.2005	P. Fernández Fernández	1/1