

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



DELEGATURA PROPIEDAD INDUSTRIAL

División de Nuevas Creaciones

SOLICITUD

PCT

PATENTE DE INVENCION

ENTRADA EN FASE NACIONAL

21. EXPEDIENTE No.

05-70253

54. TITULO

EL USO DE MODULADORES DE RECEPTOR α DE ESTROGENO PARA EL TRATAMIENTO
DE ESCLEROSIS MULTIPLE

51. CLASIFICACION INTERNACIONAL

71. SOLICITANTE

WYETH

DOMICILIO

MADISON, NEW JERSEY, ESTADOS UNIDOS DE AMERICA

74. APODERADO

JUAN PABLO CADENA SARMIENTO

22. SANTAFE DE BOGOTA, D.C.

PETITORIO

AS: 97.402



SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO
 Radicación: 05070253 00000000 Folios: 74
 Fecha (d/m): 2004-07-15 17:22:24
 Trámite: 011 PCT-PATINT 379 FASE NACI ALL PRESENTAC
 Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTE

PCT

ENTRADA EN FASE NACIONAL

06-08-05

1

SOLICITUD DE:

☒ Patente de Invención.

☐ Patente de Modelo de Utilidad.

☐ Capítulo I.

☒ Capítulo II.

2

SOLICITANTE
(71)

Nombre: WYETH
 Dirección: Five Girakla Farms, Madison, New Jersey
 07940, Estados Unidos de América
 Nacionalidad o Domicilio: Estados Unidos
 Lugar de Constitución: Estados Unidos
 Teléfono: Fax
 E-mail

IDENTIFICACION

C.C. ☐ NIT ☐

C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número _____

3

REPRESENTANTE
O APODERADO

Nombre: JUAN PABLO CADENA SARMIENTO

Dirección: Cra. 7 No. 16-56 Piso 9

Teléfono: 380-2200 Fax: 380-2700

E-mail:

IDENTIFICACION

C.C. ☒ NIT ☐

C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número 80.410.337 TP 57492

4

INVENTOR (ES)
(72)

Nombre: Marie M. Eliso, Robert Mitchell, Douglas C. Hamish, Steven J. Adelman
 Dirección: 311 Spencer Road, Devon, PA 19333 (US); 26 Lenape Lane, Doylestown, PA
 18901(US); 2715 Kutztown Road, Pennsburg, PA 18073 (US); 342 Windy Run Drive, Doylestown,
 PA 18901 (US) (Respectivamente)
 Nacionalidad o Domicilio: Estados Unidos de América (Respectivamente)

5 PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/US2004/000037 Fecha 05-01-2004

Publicación Internacional No. WO 2004/062653 A3 Fecha 29-07-2004

Título (54): EL USO DE MODULADORES DE RECEPTOR α DE ESTROGENO PARA EL TRATAMIENTO DE ESCLEROSIS MULTIPLE

7 Clasificación Internacional (51) A 61 K 31/00; A 61 P 37/00

8 Prioridad

SI ☒ NO ☐

(33) País de
Origen

US

(32) Fecha

06-01-2003

(31) Número de Solicitud

60/438.123

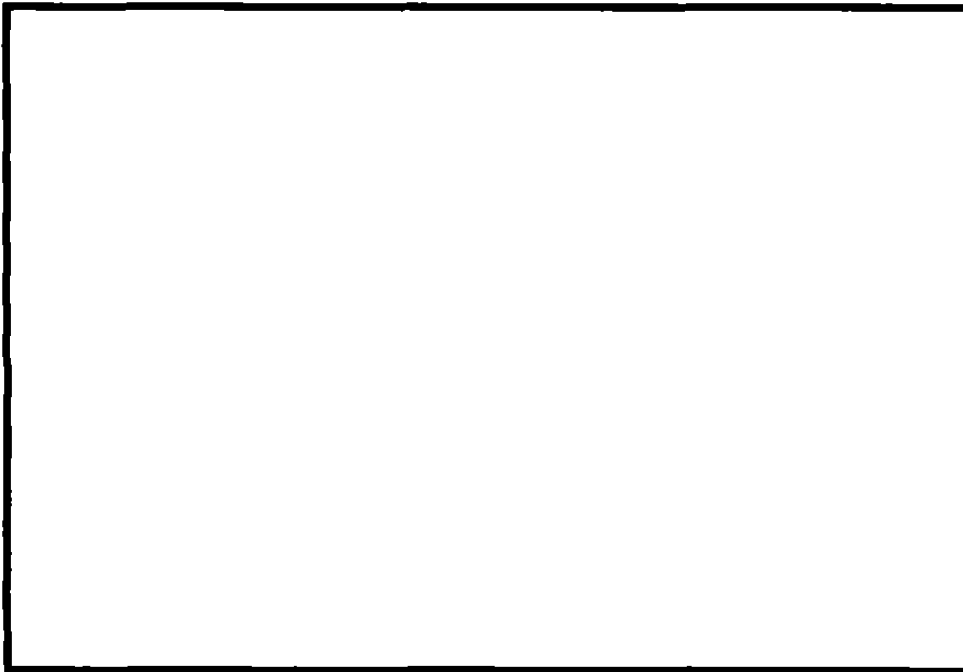
9 Comprobante de pago No. 05-40308

Fecha 14-07-2005

Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario, ver reverso de esta página.

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud. \$443.000
- ☐ Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- ☐ Poderes, si fuere el caso.
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
- ☐ Declaraciones
- ☒ Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☐ Copia del examen preliminar efectuado por la IPEA.
- ☐ Traducción del examen preliminar efectuado por la IPEA.
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso.
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- ☐ De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.
- ☐ Arte final 12x12.
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☒ Otros: Tarjeta de Propietarios

11 FIGURA CARACTERÍSTICA:



12. Solicito la concesión de la patente:

NOMBRE: JUAN PABLO CADENA SARMIENTO

FIRMA:

C.C. 89410437 de Us. client P. 57492 del C.S.U.

Instrucciones para la presentación de los anexos, ver reverso de esta página.

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 05 - 40,308
FECHA : JUNIO 2 DE 2005

Radicacion : 05070253 00000000 Folios: 74
Fecha (AMD): 2005-07-15 17:22:24
Tramite : 011 PCT-PATENT 372 FASE NACI 411 PRESENTAC
Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
BRIGARD & CASTRO LTDA	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	28252183	02/06/2005	21,261,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01	SOLICITUDES	
		1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	443,000.00
		TOTAL :	\$ 443,000.00

SON: CUATROCIENTOS CUARENTA Y TRES MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

Folio 4 torn

AS: 97.402
4

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property
Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
29 July 2004 (29.07.2004)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2004/062653 A3

(51) International Patent Classification⁷: A61K 31/80,
31/4535, 31/138, 31/40, 31/55, A61P 37/00, 37/06

TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW,
ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(21) International Application Number:
PCT/US2004/000037

(22) International Filing Date: 5 January 2004 (05.01.2004)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60438,123 6 January 2003 (06.01.2003) US

(71) Applicant (for all designated States except US): WYETH
[US/US]: Five Girakla Farms, Madison, NJ 07940 (US).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): ELIASO, M.,
Merle [US/US]: 311 Spencer Road, Devon, PA 19333
(US); MITCHELL, Robert [US/US]: 26 Lenape Lane,
Doylestown, PA 18901 (US); HARNISH, Douglas, C.
[US/US]: 2715 Kulztown Road, Pennsburg, PA 18073
(US); ADELMAN, Steven, J. [US/US]: 342 Windy Run
Drive, Doylestown, PA 18901 (US).

(74) Agent: WEBSTER, Darryl, L.: Wyeth, Patent Law De-
partment, Five Girakla Farms, Madison, NJ 07940 (US).

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of national protection available): AE, AG, AL, AM,
AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN,
CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI,
GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE,
KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD,
MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG,
PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SI, SY, TJ, TM,
TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM,
ZW.

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SI, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),
Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), Euro-
pean (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR,
GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK,

Declarations under Rule 4.17:

— as to applicant's entitlement to apply for and be granted
a patent (Rule 4.17(ii)) for the following designations AE,
AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ,
CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE,
EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS,
JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA,
MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM,
PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ,
TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM,
ZW, ARIPO patent (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD,
SI, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY,
KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, BG,
CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT,
LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI patent (BF, BJ,
CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD,
TG)

— as to the applicant's entitlement to claim the priority of the
earlier application (Rule 4.17(iii)) for the following desig-
nations AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW,
BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ,
EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID,
IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU,
LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ,
OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY,
TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VC, VN, YU, ZA,
ZM, ZW, ARIPO patent (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ,
SD, SI, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ,
BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE,
BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU,
IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI patent
(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE,
SN, TD, TG)

Published:

— with international search report
— before the expiration of the time limit for amending the
claims and to be republished in the event of receipt of
amendments

(88) Date of publication of the International search report:
4 November 2004

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guid-
ance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the begin-
ning of each regular issue of the PCT Gazette.

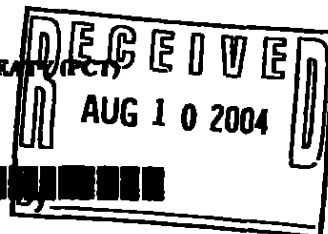
(54) Title: THE USE OF ESTROGEN RECEPTOR ALPHA MODULATORS FOR THE TREATMENT OF MULTIPLE SCLEROSIS

(57) Abstract: The present invention provides methods of treating an autoimmune pathology in a mammal, comprising adminis-
tering an agent with estrogen receptor agonist activity in particular a selective estrogen receptor modulator, to the mammal in an
amount sufficient to decrease production of TNF-1 and/or TNF-2 cytokines. Also provided is a method of selecting compounds useful
for the treatment of multiple sclerosis, comprising selecting a compound which has estrogen receptor agonist activity.

WO 2004/062653 A3

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property
Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
29 July 2004 (29.07.2004)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2004/062653 A2

(51) International Patent Classification²: A61K 31/00,
31A535, 31/138, 31/40, 31/55, A61P 37/00, 37/06

GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK,
TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW,
ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(21) International Application Number:
PCT/US2004/000037

Declarations under Rule 4.17:

(22) International Filing Date: 5 January 2004 (05.01.2004)

— as to applicant's entitlement to apply for and be granted
a patent (Rule 4.17(ii)) for the following designations AE,
AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ,
CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE,
EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS,
JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA,
MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM,
PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ,
TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM,
ZW, ARIPO patent (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD,
SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY,
KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, BG,
CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT,
LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI patent (BF, BJ,
CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD,
TG)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Date:
60438,123 6 January 2003 (06.01.2003) US

— as to the applicant's entitlement to claim the priority of the
earlier application (Rule 4.17(iii)) for the following design-
nations AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW,
BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ,
EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID,
IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU,
LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ,
OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY,
TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VC, VN, YU, ZA,
ZM, ZW, ARIPO patent (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ,
SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ,
BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE,
BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU,
IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI patent
(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE,
SN, TD, TG)

(71) Applicant (for all designated States except US): WYETH
[US/US]; Five Giralda Farms, Madison, NJ 07940 (US).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): ELLOSO, M.,
Marie [US/US]; 311 Spencer Road, Devon, PA 19333
(US); MITCHELL, Robert [US/US]; 26 Lemp Lane,
Doylestown, PA 18901 (US); HARNISH, Douglas, C.
[US/US]; 2715 Kutztown Road, Pennsburg, PA 18073
(US); ADELMAN, Steven, J. [US/US]; 342 Windy Run
Drive, Doylestown, PA 18901 (US).

(74) Agent: WEBSTER, Darryl, L.; Wyeth, Patent Law De-
partment, Five Giralda Farms, Madison, NJ 07940 (US).

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of national protection available): AE, AG, AL, AM,
AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN,
CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI,
GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE,
KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD,
MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG,
PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM,
TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM,
ZW.

Published:

— without international search report and to be republished
upon receipt of that report

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SI, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),
Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), Euro-
pean (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR,

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guid-
ance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the begin-
ning of each regular issue of the PCT Gazette.

(54) Title: THE USE OF ESTROGEN RECEPTOR ALPHA MODULATORS FOR THE TREATMENT OF MULTIPLE SCLEROSIS

(57) Abstract: The present invention provides methods of treating an autoimmune pathology in a mammal, comprising adminis-
tering an agent with estrogen receptor agonist activity in particular a selective estrogen receptor modulator, to the mammal in an
amount sufficient to decrease production of T11-1 and/or T11-2 cytokines. Also provided is a method of selecting compounds useful
for the treatment of multiple sclerosis, comprising selecting a compound which has estrogen receptor agonist activity.

WO 2004/062653 A2

RECEIVED
AUG 10 2004
By _____

5

10

15

20

25

30

multiple sclerosis⁹⁻¹³. This model was used to test treatment with SERMS/Tissue-Selective Estrogens (TSEs) and estrogen receptor α selective agonists.

SERMS are a class of drugs which bind to the estrogen receptor and show tissue-selective effects. The SERM raloxifene, for example, has estrogen-agonistic effects on bone, lipids and clotting factors, and estrogen-antagonistic effects on the breast and uterus.¹⁰ SERMS may include 1) agents previously known as antiestrogens, such as 16-epiestriol, ethamoxytriphetol, clomiphene, and tamoxifen; 2) a 19-nortestosterone derivative, tibolone; 3) raloxifene and its analogues; and 4) newer triphenylethylene derivatives, such as droloxifene, lorenilfene, idoxifene, and levorneloxifene.¹⁰ SERMS compete with endogenous estrogens for binding to the receptor and may either activate or block estrogen action.¹⁰

An object of the present invention is to provide novel methods to treat autoimmune pathologies by the administration of agents having estrogen receptor α activity, particularly SERMS.

SUMMARY OF THE INVENTION

The present invention provides a method of treating an autoimmune pathology in a mammal, comprising administering at least one agent having estrogen receptor α agonist activity to the mammal in an amount sufficient to decrease production of TH-1 and/or TH-2 cytokines.

The present invention also provides a method of treating an autoimmune pathology in a mammal, comprising administering a selective estrogen receptor modulator to the mammal in an amount sufficient to decrease production of TH-1 and/or TH-2 cytokines.

The present invention further provides a method of selecting compounds useful for the treatment of multiple sclerosis, comprising selecting a compound which has estrogen receptor α agonist activity.

CK

8

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

The invention can be more fully understood from the detailed description and the accompanying drawings that form a part of this application.

Figure 1A shows the effect of the ER antagonist ICI on estrogen-mediated suppression of disease.

Figure 1B shows the effect of Raloxifene vs. Compound A on EAE.

Figure 2 shows the effect of ER-selective ligands on EAE.

Figure 3A shows the effect of in vivo administration of ER-selective ligands on TNF- α production by splenocytes from mice with EAE.

Figure 3B shows the effect of in vivo administration of ER-selective ligands on IL-4 production by splenocytes from mice with EAE.

Figure 3C shows the effect of in vivo administration of ER-selective ligands on IFN- γ production by splenocytes from mice with EAE.

Figure 3D shows the effect of in vivo administration of ER-selective ligands on IL-5 production by splenocytes from mice with EAE.

Figure 3E shows the effect of in vivo administration of ER-selective ligands on IL-2 production by splenocytes from mice with EAE.

Figure 3F shows the effect of in vivo administration of ER-selective ligands on IL-10 production by splenocytes from mice with EAE.

Figure 4A shows the effect of compounds on proliferation of CD4⁺ cells upon antigen stimulation.

9

Figure 4B shows the effect of compounds on proliferation of CD4+ cells upon antigen stimulation.

5 Figure 5A shows the effect of compounds on TNF- α production by effector T cells upon antigen stimulation.

Figure 5B shows the effect of compounds on IFN- γ production by effector T cells upon antigen stimulation.

10 Figure 5C shows the effect of compounds on IL-4 production by effector T cells upon antigen stimulation.

25 Figure 5D shows the effect of compounds on IL-2 production by effector T cells upon antigen stimulation.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

20 As disclosed herein, administration of an agent having estrogen receptor α agonist activity to a mammal reduces the severity of autoimmune pathologies. These effects appear to be due, in part, to the effect of such agonists on reducing the production of TH-1 and/or TH-2 cytokines by T-cells in the periphery and at the site of pathology.

25 Therefore, the present invention provides a method of treating an autoimmune pathology in a mammal, comprising administering an agent having estrogen receptor α agonist activity to the mammal in an amount sufficient to decrease production of TH-1 and/or TH-2 cytokines. The present invention also provides a
30 method of treating an autoimmune pathology in a mammal, comprising administering a selective estrogen receptor modulator to the mammal in an amount sufficient to decrease production of TH-1 and/or TH-2 cytokines.

The methods of the invention can be practiced with respect to a variety of autoimmune pathologies. Such pathologies are known in the art and include but are not limited to multiple sclerosis, rheumatoid arthritis, psoriasis, autoimmune thyroiditis, uveitis, myasthenia gravis, inflammatory bowel disease and Sjögren's syndrome. In preferred embodiments of the invention, the mammal may be female, male, human or non-human.

In an embodiment of the invention, the agent having estrogen receptor α agonist activity is administered by a route selected from oral, transdermal, respiratory, subcutaneous and intravenous routes.

In preferred embodiments of the invention, the TH-1 cytokine is selected from the group consisting of TNF- α , IFN- γ and IL-2, and the TH-2 cytokine is selected from the group consisting of IL-4, IL-5 and IL-10. Those skilled in the art recognize that a TH-1 mediated immune response is characterized by secretion of pro-inflammatory cytokines, which includes TNF- α , IFN- γ , IL-2. A TH-2 mediated response is characterized by secretion of anti-inflammatory cytokines such as IL-4, IL-5 and IL-10. In one preferred embodiment of the invention, the production of TH-1 cytokines is suppressed by administration of the agent. In another preferred embodiment of the invention, the production of both TH-1 and TH-2 cytokines is suppressed. In a further embodiment of the invention, the production of TH-1 cytokines is suppressed and the production of TH-2 cytokines is increased.

As a preferred embodiment, the ER α agonist exhibits an anti-inflammatory activity, e.g. a reduction in NF- κ B activity. In another preferred embodiment, the ER α agonist is non-steroidal.

In a further embodiment of the invention, the SERM is selected from the group comprising raloxifene, tamoxifen, lasofoxifene, idoxifene, droloxifene, bazedoxifene, toremifene and their derivatives and analogs. In another embodiment of the invention the selective estrogen receptor modulator exerts a biological effect on the brain or central nervous system.

X2/11

The present invention also provides a method of selecting compounds useful for the treatment of multiple sclerosis, comprising selecting a compound which has estrogen receptor α agonist activity. Conventional assays for assaying in vitro agonist activity, using receptors such as luciferase, are well known in the art. Illustrative of agonist assays are the following publications which are incorporated by reference for their ER α agonist assays: Lytle CR, Damian-Matsumura P., Juul H., Butt TR, Human estrogen receptor regulation in a yeast model system and studies on receptor agonists and antagonists, J. Steroid Biochem Mol Biol 42:677-685 (1992); Katzenellenbogen BS, Bhardwaj B, Fang H, Ince BA, Pakdel F, Reese JC, Schodin D, Wrenn CK, Hormone binding and transcription activation by estrogen receptors: analyses using mammalian and yeast systems, J Steroid Biochem Mol Biol 47:39-48 (1993); PCT International Publication No. WO 00/37681; Webb P, Lopez GN, Greene GL, Baxter JD, Kushner PJ, 1992, The limits of the cellular capacity to mediate an estrogen response, Mol Endocrinology, 6(2):157-67. Preferably, in such assays, an "estrogen receptor α agonist" is defined as a compound that substantially mimics ER- α activity of 17- β estradiol as measured in the selected assay for estrogenic activity.

In a preferred embodiment of the invention, the compound is a SERM. In a further embodiment of the invention, the compound decreases TNF α production by at least about 20%-100%, as described in Example II herein. In alternative embodiments, the decrease may be at least 30, 40, 50, 60 or 80%.

Definitions of abbreviations and terms:

The following definitions are provided for the full understanding of terms and abbreviations used in this specification.

As used herein and in the appended claims, the singular forms "a", "an" and "the" include the plural reference unless the context clearly indicates otherwise. Thus, for example, a reference to "an estrogen receptor α agonist" includes a plurality of such agonists.

X/ 12

The abbreviations in the specification correspond to units of measure, techniques, properties or compounds as follows: "µg" means microgram(s), "ml" means milliliter(s), "µM" means micromole(s), "mM" means millimole(s), "s.c." means subcutaneous, "i.p." means intraperitoneal, and "p.o" means per oral.

"Multiple sclerosis" is abbreviated MS.

"Central nervous system" is abbreviated CNS.

"T-helper-1" and "T-helper-2" are abbreviated TH-1 and TH-2, respectively.

"Tumor Necrosis Factor-α" is abbreviated TNF-α.

"Interferon-γ" is abbreviated IFN-γ.

"Nuclear Factor-κB" is abbreviated NF-κB.

"Experimental Autoimmune Encephalomyelitis" is abbreviated EAE.

"Selective Estrogen Receptor Modulators" is abbreviated SERMS.

"Tissue Selective Estrogens" is abbreviated TSEs.

"Estrogen receptor" is abbreviated ER.

"Interleukin" is abbreviated IL.

"Proteolipid protein peptide" is abbreviated PLP.

"Complete Freund's adjuvant" is abbreviated CFA.

"Post transfer" is abbreviated PT.

As used herein, the term "autoimmune pathology" refers to a pathology mediated by a detrimental autoimmune response. In most autoimmune pathologies, T cells recognize a host component in one or more tissues as foreign and attack that tissue.

The term "treatment" as used herein includes preventative (e.g. prophylactic), curative, or palliative treatment and "treating" as used herein also includes preventative, curative and palliative treatment. "Treating", with reference to autoimmune pathology, refers to any observable effect of the treatment. The beneficial effect can be evidenced by delayed onset of clinical symptoms in a susceptible mammal, a reduction in severity of some or all clinical symptoms of the disease, a slower progression of the disease, a reduction in the number of relapses of the disease, a reduction in the number or activity (e.g. cytokine

X 13

secretion) of pathogenic T cells at the site of pathology or in the circulation, an improvement in the overall health or well-being of the individual, or by other parameters well known in the art that are specific to the particular disease.

5 As disclosed herein, the term "agent having estrogen receptor α activity" is an agent that exhibits ER α activity and includes but is not limited to selective estrogen receptor modulators and tissue-selective estrogens. The term may also include partial agonists, peptides, polypeptides, genes, gene fragments, non-peptide small molecules, natural products, antisense DNA and mRNA.

10 As used herein, the term "mammal" refers to a human, a non-human primate, canine, feline, bovine, ovine, porcine, murine or other veterinary or laboratory mammal. Those skilled in the art recognize that a therapy which reduces the severity of an immune pathology in one species of mammal is predictive of the effect of the therapy on another species of mammal. The skilled person also appreciates that credible animal models of human immune pathologies are known, including EAE, which is a credible animal model of multiple sclerosis.

20 An "amount effective to decrease production of TH-1 and/or TH-2 cytokines" refers to an amount effective, at dosages and for periods of time necessary, to achieve the desired result of treating autoimmune pathology. It will be appreciated that the amount of estrogen receptor α agonist effective to decrease production of TH-1 and/or TH-2 cytokines in the methods of the present invention will vary from individual to individual not only with the particular agonist selected, 25 the route of administration, and the ability of the agonist to elicit a desired response in the individual, but also with factors such as the disease state or severity of the condition to be alleviated, age, sex, weight of the individual, the state of being of the patient, and the severity of the pathological condition being treated, concurrent medication or special diets then being followed by the 30 particular individual, and other factors which those skilled in the art will recognize, with the appropriate dosage ultimately being at the discretion of the attendant physician. Dosage regimens may be adjusted to provide the improved therapeutic response. An "amount effective to decrease production of TH-1

14

and/or TH-2 cytokines" is also one in which any toxic or detrimental effects of the agonist is outweighed by the therapeutically beneficial effects.

5 Preferably, the estrogen receptor α agonists are administered in the methods of the present invention at a dosage and for a time such that the production of TH-1 and/or TH-2 cytokines is decreased as compared to production of these cytokines at the start of treatment. Such treatment can also be beneficial to reduce the overall severity of symptoms of autoimmune disease, as compared to the severity of symptoms prior to the start of the treatment. In a preferred
10 embodiment, dosages range from .5mg/kg/day to 500 mg/kg/day, and, alternatively, at least about 10, 50, 100 or 150 mg/kg/day.

EXAMPLES

15 The present invention is further defined in the following Examples. It should be understood that these Examples, while indicating preferred embodiments of the invention, are given by way of illustration only. From the above discussion and these Examples, one skilled in the art can ascertain the essential characteristics of this invention, and without departing from the spirit and scope thereof, can
20 make various changes and modifications of the invention to adapt it to various usages and conditions.

Example 1 - Effect of In Vivo Administration of Compounds in Animal Model of Multiple Sclerosis

25 This Example shows that, in an animal model of multiple sclerosis, in vivo administration of estrogen receptor α selective agonists results in delayed onset and decreased incidence and severity of disease.

Materials and Methods

30 **Animals.** Twenty-five intact female (6-8 weeks old) SJL mice (Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME) were used as donor mice in the adoptive transfer model of EAE.
35

15

Induction of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis (EAE). EAE was induced by the adoptive transfer of PLP sensitized spleen cells using a modification of methods previously described.²⁰ Mice were immunized with proteolipid protein peptide 139-151 (PLP) emulsified in complete Freund's adjuvant (CFA). Each animal received 150 µg of PLP in a volume of 0.2 ml CFA that contained 4 mg/ml heat killed and dried *Mycobacterium tuberculosis* (H37RA strain). The PLP/CFA emulsion was injected s.c. in two sites (on the back, and at the base of the tail): 0.1 ml was injected at each site. Ten days later, the mice were euthanized and the spleens were collected. Single cell suspensions were made from the spleens. After lysis of red blood cells, the cells were cultured at a concentration of 5x10⁶ cells/ml for 3 days in 75 cm² tissue culture flasks in RPMI-10 (RPMI medium containing 10% heat-inactivated fetal bovine serum, 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin, 2mM glutamine, 50 µM 2-mercaptoethanol). PLP was added at a final concentration of 5 µg/ml. The cells were incubated at 37 °C in 5% CO₂. After the incubation, PLP-stimulated effector cells were harvested, washed with phosphate-buffered saline and injected i.p. into ovariectomized female (6-8 weeks old) SJL mice (1.5x10⁷ cells/mouse). Onset of disease typically occurs 7-14 days post-transfer (PT) of cells.

The degree of disease severity was monitored daily using the scale shown in Table 1.

Table 1: Scale of Disease Severity	
0	no overt signs of disease
1	limp tail
2	limp tail/hind limb weakness (observed as a waddling gait; mouse's hind limbs fall through wire cage tops)
3	partial hind limb paralysis (mouse can no longer maintain rump posture but can still move one or both limbs to some extent)
4	complete hind limb paralysis (complete loss of movement in hind limbs; animal drags hind limbs; can grasp bar and pull itself up with no difficulty)
5	complete hind limb paralysis and/or mild fore limb weakness (can still grasp bar; but has some difficulty pulling itself up)
6	complete hind limb paralysis with severe fore limb weakness or paralysis; moribund

X 16

To evaluate the effect of compounds on disease, recipient mice were administered compounds daily (s.c. or p.o.) at the doses indicated, using a 10% ethanol/90% corn oil vehicle. Control animals received vehicle only. Mice were dosed beginning 5-7 days prior to the adoptive transfer of donor cells.

5

Histological Analysis. At peak disease (14 days PT), mice were euthanized with CO₂. Brains and spinal cords were removed at necropsy and fixed in 10% buffered formalin. Brains were cut into three segments (roughly, anterior cerebrum, midbrain and cerebellum) and embedded as a single block. The spinal cord was decalcified in 10% HCl and cut into cervical, thoracic and lumbar segments embedded as a single block. A standard H&E (hematoxylin and eosin) glass slide was prepared from each tissue block (brain and spinal cord) from each mouse submitted with two resulting H&E slides per mouse evaluated.

10

15

Slides were evaluated and lesions seen were graded subjectively for presence (P=present) and/or severity. Severity grades are 0 = WNL (within normal limits), 1 = slight or minimal, 2 = mild, 3 = moderate, 4 = marked, and 5 = severe. The location of findings, relative to the organ, was denoted as perivascular, periventricular, ependymal or meningeal, and also as focal (in small areas or not throughout the section), or diffuse (throughout the section examined). Focal was defined as very localized and not affecting every structure. Findings not defined as focal were diffuse or affecting every structure (e.g. all vessels). Leukocytes seen were primarily lymphocytes and macrophages with occasional neutrophils. Demyelination was observed as distinct open holes in white matter tracts in the spinal cord.

20

25

Typical murine models of EAE have scattered foci of slight to moderate-sized aggregates of leukocytes and rarely have diffuse infiltrates in the affected tissues.

30

Analysis of PLP-specific Recall Responses: Cytokine Production. To examine the effect of compounds administered in vivo on cytokine production by splenocytes from mice with EAE, mice were euthanized with CO₂ at peak disease (14 days PT), and spleens were collected. Spleens were individually processed

26
17

into single cell suspensions. After lysis of red blood cells, the cells were resuspended in RPMI-10 and were cultured in 24-well tissue culture plates at a concentration of 5×10^6 cells/ml. Cells were stimulated with 5 μ g/ml PLP. Supernatants were collected after 3 days and frozen until use at -20°C . Cytokines (TNF- α , IFN- γ , IL-5, IL-4, IL-2) were measured in the supernatants using a commercially available flow cytometry kit (Cytometric Bead Array, Becton Dickinson BioSciences, San Diego, CA). IL-10 was measured using an IL-10-specific ELISA kit (Becton Dickinson BioSciences).

To examine *in vitro* the effect of compounds on cytokine production by PLP-primed effector cells, SJL mice were immunized with PLP emulsified in CFA. After 10 days, spleens were collected and single cell suspensions were made. After lysis of red blood cells, splenocytes were stimulated with 5 μ g/ml PLP in the presence of compound for 3 days at 37°C , 5% CO_2 . Control samples were not stimulated and cultured in medium only ("medium"). Compounds were added at a final concentration of 1 μ M. After the 3-day incubation, supernatants were collected and stored at -20°C . Cytokines (TNF- α , IFN- γ , IL-5, IL-4, IL-2) were measured in the supernatants using a Cytometric Bead Array kit.

Effect of compounds on proliferation of effector T cells upon antigen stimulation To examine the effect of proliferation of effector T cells *in vitro* in response to PLP stimulation, T-cell proliferation was examined by flow cytometry using the following assay. SJL mice were immunized with PLP emulsified in CFA. After 10 days, spleens were collected and single cell suspensions were made. After lysis of red blood cells, splenocytes were labeled with carboxy fluorescein succinimidyl ester (CFSE). CFSE-labeled cells were then incubated with PLP for 3 days at 37°C , 5% CO_2 . Compounds were added at a final concentration of 1 μ M. To determine the percentage of CD4^+ cells that divided, the CFSE-labeled cells were stained with antibodies specific for the CD4 marker prior to flow cytometric analysis.

201 18

Results**I. Effect of SERMs/Tissue-Selective Estrogens on EAE induced by the adoptive transfer of PLP-primed effector cells**

As shown previously, treatment with 17 β -estradiol (E2) resulted in a delay in onset as well as decreased incidence and severity of disease (Figure 1A; refs. 9, 11-13). To determine whether the protective effects of estrogen in this model were estrogen receptor-mediated, mice were treated with both E2 and the estrogen receptor antagonist ICI 182,780. ICI abolished the effect of E2 on disease (Figure 1A).

Treatment with E2 or with the SERMs raloxifene or Compound A [2-(hydroxyphenyl)-3-methyl-1-[4-(2-piperidin-1-yl-ethoxy)benzyl]-1H-indol-5-ol hydrochloride monohydrate] resulted in a delay in onset as well as decreased incidence and severity of disease (Figure 1B and Table II). Consistent with the effects of these compounds on the clinical signs of disease, there was a reduction in the amount of inflammatory cells infiltrating the spinal cords and brains from mice treated with Compound A compared to mice from other treatment groups. In addition, no demyelination was detected in spinal cords from Compound A-treated mice.

Table II. Histological Findings

Treatment	Brain Meningeal/ Perivascular Leukocyte Infiltrates	Distribution of Brain Lesions	Spinal Cord Meningeal/ Perivascular Leukocyte Infiltrates	Spinal Cord Demyelination
Vehicle	3/3 ^a (2.33) ^b	Meningeal, Perivascular and Perilependymal	3/3 (2)	3/3 (2)
E2	4/4 (2.5)	Meningeal, Perivascular and Perilependymal	1/4 (1.7)	1/4 (1.3)
Raloxifene	5/5 (2.4)	Meningeal, Perivascular and Perilependymal	5/5 (1.4)	5/5 (1.2)
Compound A	3/5 (2.7)	Meningeal, Perivascular and Perilependymal	1/5 (1)	0/5

a = number of brains with finding/total number evaluated
b = average severity grade of lesions seen;
0 = within normal limits, 1 = slight, 2 = mild, 3 = moderate, 4 = marked, 5 = severe

20 19

II. Effect of Estrogen Receptor-Selective Agonists on EAE Induced by the adoptive transfer of PLP-primed effector cells

Treatment with E2 or the ER α -selective agonist PPT (propylpyrazole triol) resulted in a delay in onset as well as decreased incidence and severity of disease (Figure 2). In addition, mice treated with PPT had reduced inflammation in the brain and spinal cords compared with mice treated vehicle, or with an ER β -selective agonist (Table III). Histologic examination revealed that mice which were administered PPT had the most normal tissues compared to the vehicle control mice. All four had slight leukocyte infiltrates in the meninges but only at the base of the brain (around the hindbrain/cerebellum/pons/medulla on the ventral surfaces only). None of these mice had spinal cord lesions; the spinal cords of these mice were all within normal limits.

Table III.

Treatment	Brain Meningeal/ Perivascular Leukocyte Infiltrates	Distribution of Brain Lesions	Spinal Cord Meningeal/ Perivascular Leukocyte Infiltrates	Spinal Cord Demyelination
Vehicle	4/4 ^a (2.75) ^b	Periventricular and Ependymal Meningeal	4/4 (2)	1/4 (1)
E2	3/4 (1.7)		2/4 (1)	1/4 (1)
ER α -PPT (ER α)	4/4 (1)	Base of the Brain	0/4	0/4
ER β -041 (ER β)	4/4 (2.3)	Periventricular and Ependymal	2/4 (1.5)	2/4 (1.5)

a = number of brains with finding/total number evaluated
b = average severity grade of lesions seen;
0=within normal limits, 1=slight, 2=mild, 3=moderate, 4=marked, 5=severe

III. Effect of ER-Selective Agonists on PLP-specific Recall Responses: Cytokine Production

Consistent with the effect of the ER α -selective agonist PPT on disease, treatment of mice with PPT resulted in decreased cytokine production upon stimulation of splenocytes with PLP in vitro (Figure 3). Both Th1/pro- (TNF- α , IFN- γ , IL-2) and Th2/anti-inflammatory (IL-4, IL-5, IL-10) cytokines were suppressed by in vivo treatment with PPT, indicating that PPT may suppress disease by inhibiting T cell activation, rather than by immune deviation from a pathogenic Th1 response to a

2X 20

protective Th2 response. In contrast, the ER α -selective agonist had no effect on cytokine production (*, $p < 0.05$ compared to vehicle group).

Example II - Effect of Compounds on Antigen-Specific Immune Responses In Vitro

The effect of tissue selective estrogens (Compound A) and ER α -selective ligands (PPT) on antigen-specific immune responses was examined in vitro.

A. Effect of compounds on proliferation of effector T cells upon antigen stimulation

Treatment of PLP-primed effector cells with the tissue-selective estrogen Compound A or with ER α -selective agonist PPT resulted in decreased proliferation of antigen-specific T cells (Figure 4). Proliferation of both CD4 $^{+}$ and CD4 $^{-}$ cell populations was suppressed. These results suggest that each of these compounds may potentially act in part by limiting the clonal expansion of antigen-specific T cells.

B. Effect of compounds on cytokine production by effector cells upon antigen

Treatment of PLP-primed effector cells with the tissue-selective estrogen Compound A or with α -selective agonist (PPT) resulted in decreased cytokine production upon antigen stimulation (Figure 5). Both compounds inhibited the production of the pro-inflammatory (TH-1) cytokine TNF- α . Both Compound A and the ER α -selective agonists PPT also suppressed IFN- γ production. Incubation of these cells with the tissue-selective estrogen Compound A also resulted in a concomitant increase in the anti-inflammatory cytokine IL-4, whereas the other compounds had no effect. These results suggest that ER α -selective agonists (PPT) may have different effects than tissue-selective estrogens on antigen-specific cytokine production. Whereas the former may suppress EAE by inhibiting the production of pro-inflammatory (TH-1) cytokines, tissue-selective estrogens may in addition promote immune deviation to a protective anti-inflammatory/TH-2 immune response.

Conclusions

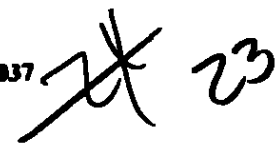
5 Treatment with the SERMs/TSEs raloxifene and Compound A, as well as the
ER α -selective agonist PPT, suppressed EAE, resulting in delayed onset of
disease, as well as decreased incidence and severity. The suppression of the
clinical signs of disease in mice treated with these compounds was associated
with reduced pathology and leukocyte infiltration in the brains and spinal cords.
10 This suggests that these compounds may reduce disease by limiting trafficking of
pathogenic cells into the brains and spinal cords, for example, by decreasing
adhesion molecule expression and/or by affecting chemokine/chemokine receptor
expression. Suppression of disease induced by the adoptive transfer of PLP-
primed effector cells with SERMs/TSEs and ER α -selective agonists suggests that
these compounds have the capacity to alter the activity of encephalitogenic
15 effector cells. These findings are in contrast to the notion that differentiated
effector cells are more refractory to the effects of estrogens compared with naïve
cells¹³.

20 In vitro data presented herein suggests that ER α -selective agonists, preferentially
SERMs or ER-anti-inflammatory ligands, may have direct effects on antigen-
specific T cell proliferation and cytokine production, thereby limiting the expansion
and differentiation of pathogenic T cells. All three types of ligands are effective in
suppressing the production of the pro-inflammatory (TH-1) cytokines. Tissue-
selective estrogens, however, may in addition promote the production of
25 protective anti-inflammatory (TH-2) cytokines, which suggests that these
molecules may have differential effects on PLP-specific immune responses.

30 The observation that SERMs/TSEs are capable of altering the course of disease
in this model is somewhat surprising, given the known effects of SERMs and
estrogen antagonists in murine systemic lupus erythematosus, the mouse model
for lupus. SERMs have been shown to have beneficial therapeutic effects in
lupus, an autoimmune disease in which the disease is exacerbated by
estrogens¹⁴⁻¹⁸. Since SERMs appear to act in an antagonist fashion in lupus, it



was anticipated that SERMs would have similar antagonist activity in EAE. Therefore, the prediction would be that SERMs would either have no effect, or would exacerbate EAE. Instead, SERMs demonstrated disease-suppressing activity.



REFERENCES

1. Whitacre C.C. 2002. Sex differences in autoimmune disease. *Nat Immunol.* 2:777-780.
2. Abramsky O. 1994. Pregnancy and multiple sclerosis. *Ann Neurol.* 36(suppl):S38-S41.
3. Confavreux C, Hutchinson M, Hours M.M. et al. 1998. Rate of pregnancy-related relapse in multiple sclerosis. *Pregnancy in Multiple Sclerosis Group. N Engl J Med.* 339:285-291.
4. Damek D.M., Shuster E.A. 1997. Pregnancy and multiple sclerosis. *Mayo Clin Proc.* 72:977-989.
5. Scotte N.L., Liva S.M., Klutch R. et al. 2002. Treatment of multiple sclerosis with the pregnancy hormone estriol. *Ann Neurol.* 52:421-428.
6. Gilmore W., Weiner L.P., Correale J. 1997. Effect of estradiol on cytokine secretion by proteolipid protein-specific T cell clones isolated from multiple sclerosis patients and normal control subjects. *J. Immunol.* 158:448-451.
7. Correale J., Arias M., Gilmore W. 1998. Steroid hormone regulation of cytokine secretion by proteolipid protein-specific CD4+ T cell clones isolated from multiple sclerosis patients and normal control subjects. *J. Immunol.* 161:3365-3374.
8. Zang Y.C.Q., Halder J.B., Hong, J., Rivera V.M., Zhang J.Z. 2002. Regulatory effects of estriol on T cell migration and cytokine profile: inhibition of transcription factor NF- κ B. *J. Neuroimmunol.* 124:106-114.
9. Jansson L., Olsson T., Holmdahl R. 1994. Estrogen induces a potent suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis and collagen-induced arthritis in mice. *J Neuroimmunol.* 53:203-207.
10. Kim S., Liva S.M., Dalal M.A., Verity M.A., Voskuhl R.R. 1999. Estriol ameliorates autoimmune demyelinating disease: Implications for multiple sclerosis. *Neurol.* 52:1230-1238.
11. Offner H., Adlard K., Zamora A., Vandenbark A.A. 2000. Estrogen potentiates treatment with T-cell receptor protein of female mice with experimental encephalomyelitis. *J Clin Invest.* 105:1465-1472.

2/24

12. Ito A., Bebo B.F., Jr., Matejuk A., Zamora A., Silverman M., Fyfe-Johnson A., Offner H. 2001. Estrogen treatment down-regulates TNF- α production and reduces the severity of experimental autoimmune encephalomyelitis in cytokine knockout mice. *J Immunol.* 167:542-552.
- 5 13. Bebo B.F., Jr., Fyfe-Johnson A., Adlard K., Beam A.G., Vandenbark A.A., Offner H. 2001. Low-dose estrogen therapy ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis in two different inbred mouse strains. *J Immunol.* 166:2080-2089.
- 10 14. Duvic M., Steinberg A.D., Klassen L.W. 1978. Arthritis and Rheumatism. 21:414-17.
- 15 15. Sturgess A.D., Evans D.T.P., Mackay I.R., Riglar A. 1984. Effects of the oestrogen antagonist tamoxifen on disease indices in systemic lupus erythematosus. *J. Clin. Lab. Immunol.* 13:11-14.
- 16 16. Sthoeger Z.M., Bentwich Z., Zinger H., Mozes E. 1994. The beneficial effect of the estrogen antagonist, Tamoxifen, on experimental lupus erythematosus. *J. Rheumatol.* 21:2231-2238.
- 20 17. Apeltgren L.D., Bailey D.L., Fouts R.L., Short L., Bryan N., Evans G.F., Sandusky G.E., Zuckerman S.H., Glasebrook A., Bumol T.F. 1996. The effect of a selective estrogen receptor modulator on the progression of spontaneous autoimmune disease in MRL *lpr/lpr* mice. *Cell. Immunol.* 173:55-63.
- 25 18. Wu W-M., Lin B-F., Su Y-C., Suen J-L., Chiang B-L. 2000. Tamoxifen decreases renal inflammation and alleviates disease severity in autoimmune NZB/W F1 mice. *Scand. J. Immunol.* 52:393-400.
19. Kankaanpaa JTJ. October, 1999. Raloxifene – a multifunctional medicine: review. *APIMALL General Practice Issue* 1.0.
20. Leonard, J.P., Wadlbarger K.E., Goldman S.J., 1995. *J. Exp. Med.* 181:P381-386.

25

What is claimed is:

1. A method of treating an autoimmune pathology in a mammal, comprising administering at least one agent having estrogen receptor α agonist activity to the mammal in an amount sufficient to decrease production of TH-1 and/or TH-2 cytokines.
2. The method of claim 1, wherein the autoimmune pathology is selected from the group consisting of multiple sclerosis, rheumatoid arthritis, psoriasis, autoimmune thyroiditis, uveitis, inflammatory bowel disease and Sjögren's syndrome.
3. The method of claim 1, wherein the mammal is female.
4. The method of claim 1, wherein the mammal is male.
5. The method of claim 1, wherein the mammal is human.
6. The method of claim 1, wherein the mammal is non-human.
7. The method of claim 1, wherein the agent is administered by a route selected from oral, transdermal, respiratory, subcutaneous and intravenous routes.
8. The method of claim 1, wherein the TH-1 cytokine is selected from the group consisting of TNF- α , IFN- γ and IL-2.
9. The method of claim 1, wherein the TH-2 cytokine is selected from the group consisting of IL-4, IL-5 and IL-10.
10. The method of claim 1, wherein the agent decreases Nuclear Factor- κ B activity.
11. The method of claim 1, wherein the agent is non-steroidal.

12. The method of claim 1 wherein the agent is a selective estrogen receptor modulator administered in an amount sufficient to decrease production of TH-1 and TH-2 cytokines.

5

13. The method of claim 12, wherein the autoimmune pathology is selected from the group consisting of multiple sclerosis, rheumatoid arthritis, psoriasis, autoimmune thyroiditis, uveitis, inflammatory bowel disease and Sjögren's syndrome.

10

14. The method of claim 12, wherein the mammal is female.

15. The method of claim 12, wherein the mammal is male.

15

16. The method of claim 12, wherein the mammal is human.

17. The method of claim 12, wherein the mammal is non-human.

20

18. The method of claim 12, wherein the selective estrogen receptor modulator is administered by a route selected from oral, transdermal, respiratory, subcutaneous and intravenous routes.

25

19. The method of claim 12, wherein the TH-1 cytokine is selected from the group consisting of TNF- α , IFN- γ and IL-2.

20. The method of claim 12, wherein the TH-2 cytokine is selected from the group consisting of IL-4, IL-5 and IL-10.

30

21. The method of claim 12, wherein the selective estrogen receptor modulator decreases Nuclear Factor- κ B activity.

28.27

22. The method of claim 12, wherein the selective estrogen receptor modulator is selected from the group consisting of raloxifene, tamoxifen, lasofoxifene, idoxifene, droloxifene, bazedoxifene, and toremifene.

5 23. A method of selecting compounds useful for the treatment of multiple sclerosis, comprising selecting a compound which has estrogen receptor α agonist activity.

10 24. The method of claim 23, wherein the compound is a selective estrogen receptor modulator.

15 25. The method of claim 23, wherein the compound decreases TNF α production by at least about 20%.

15

20

25

30

35

26X 28

1/7

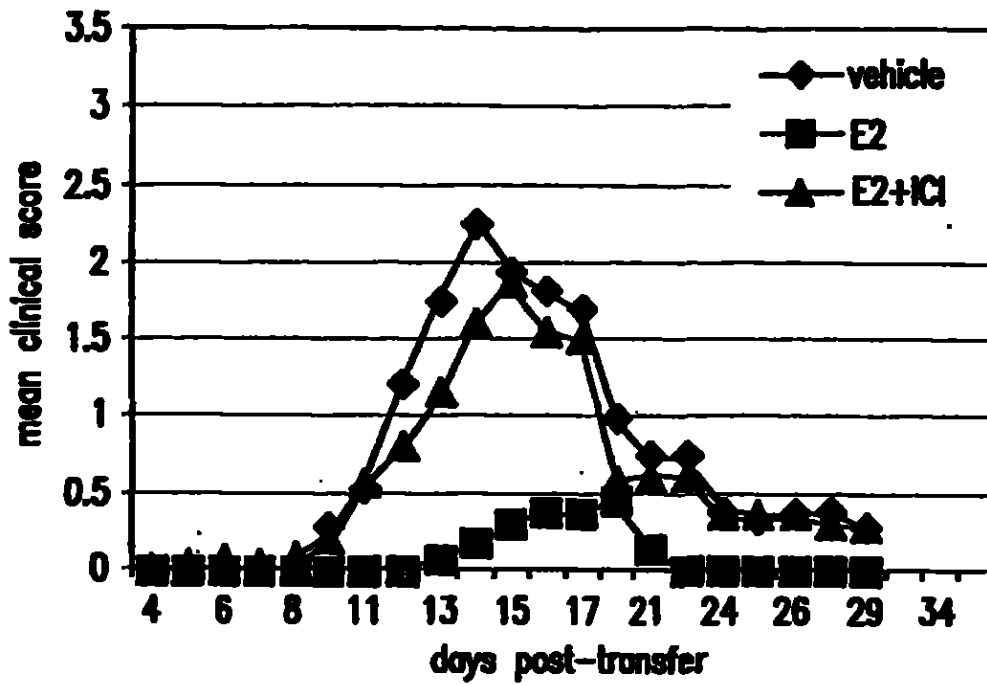


FIG. 1A

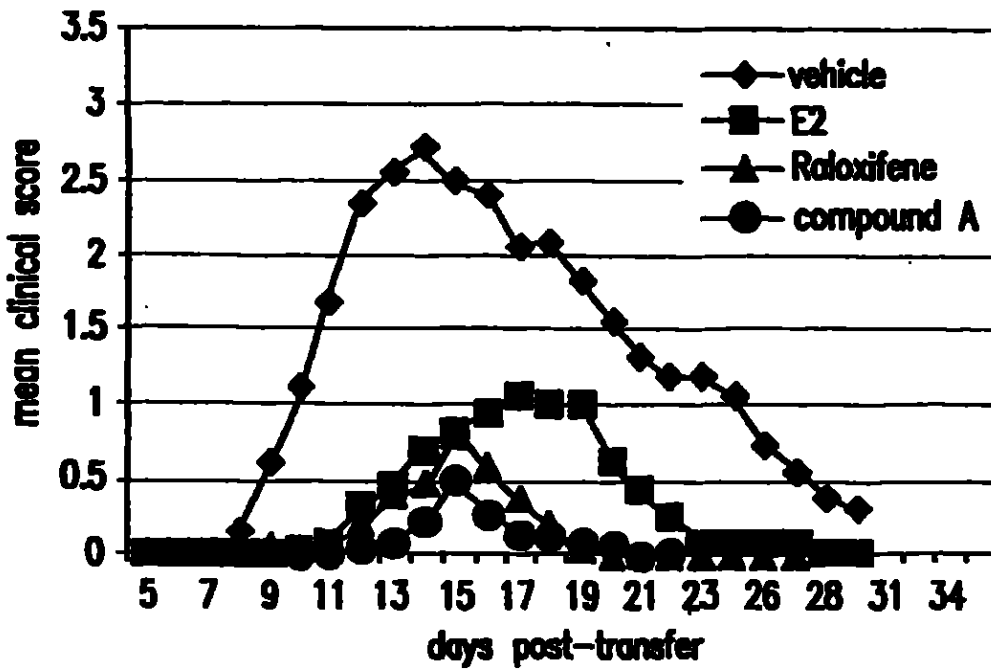


FIG. 1B

29

2/7

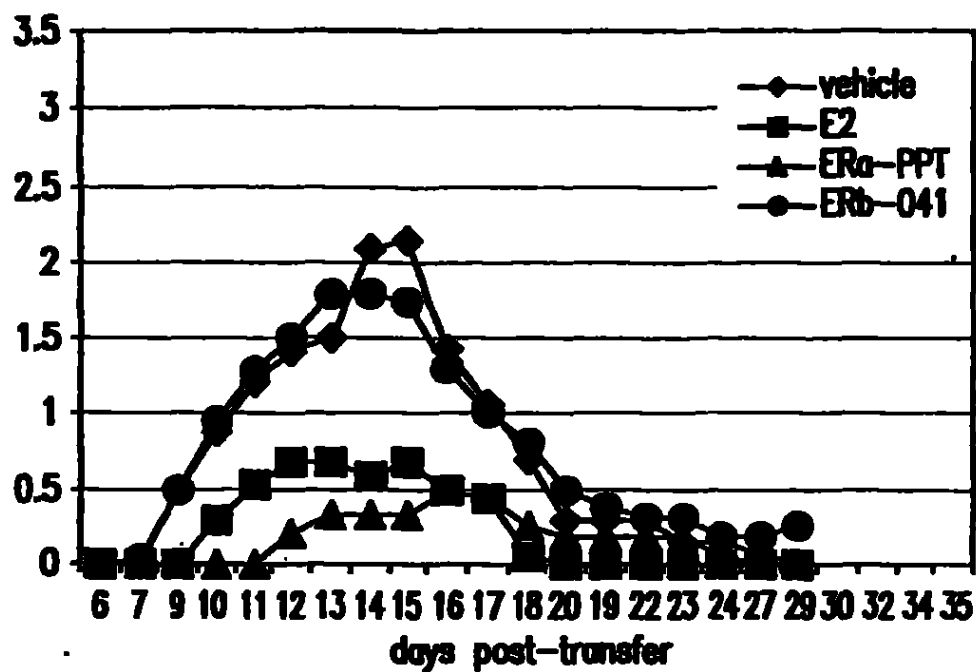


FIG.2

3/30

3/7

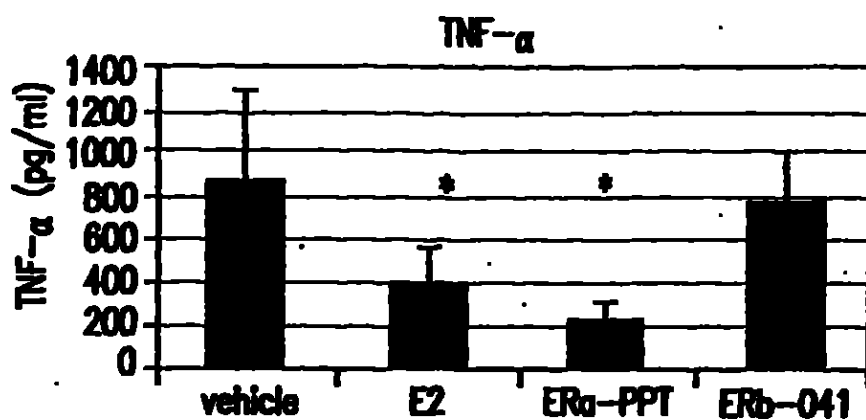


FIG.3A

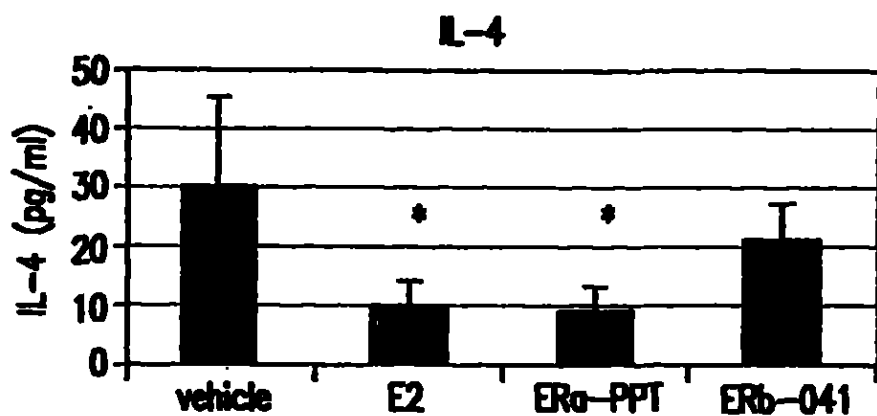


FIG.3B

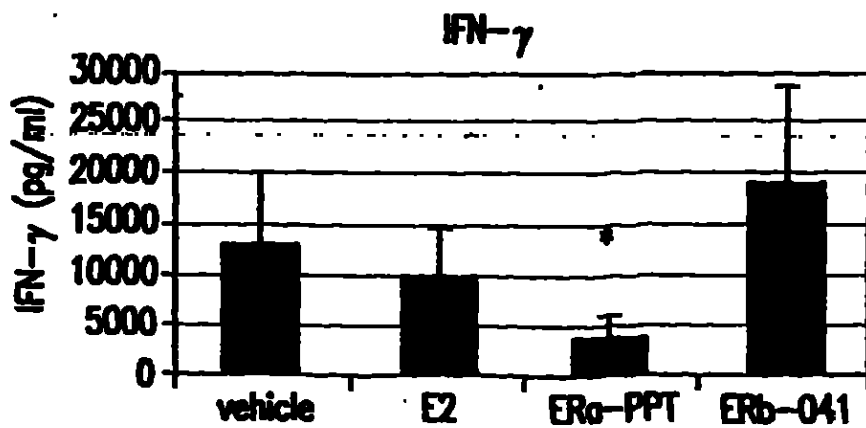


FIG.3C

32 31

4/7

IL-5

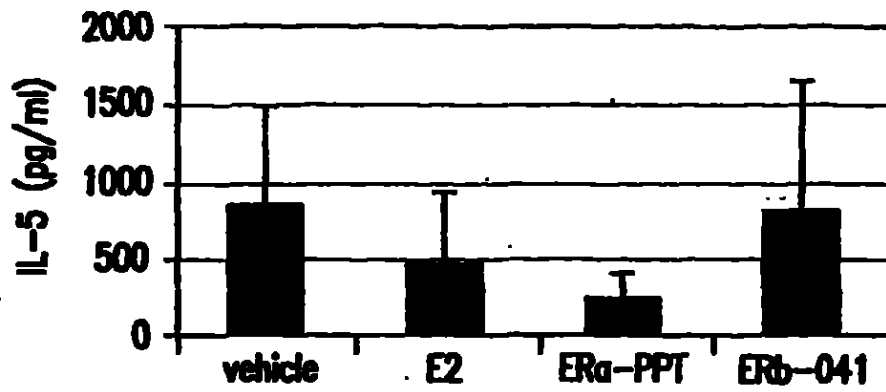


FIG.3D

IL-2

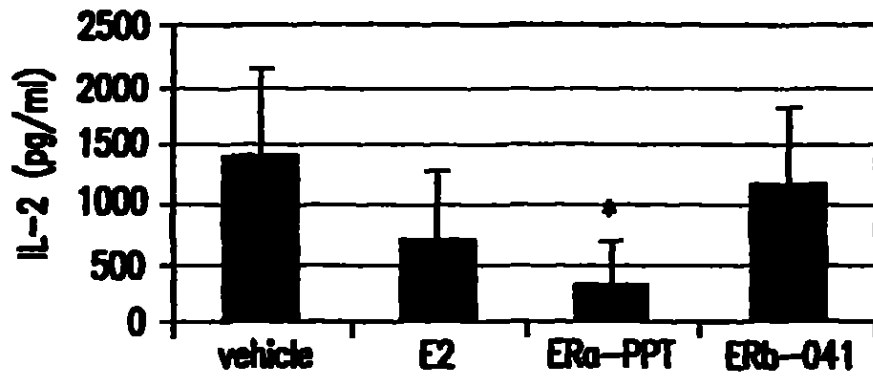
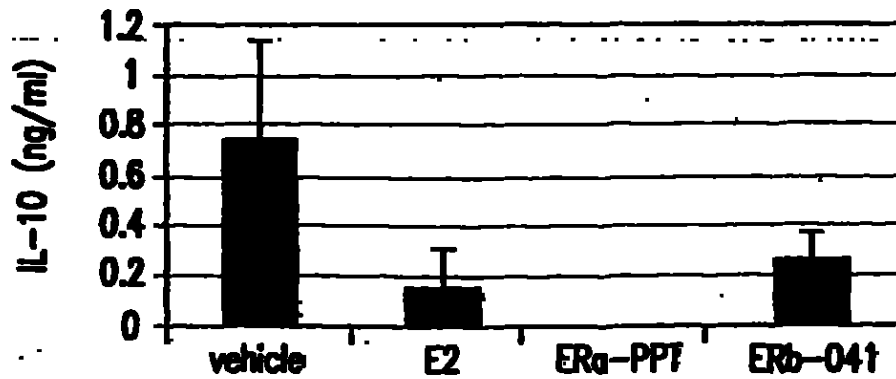


FIG.3E

IL-10



3/32

5/7

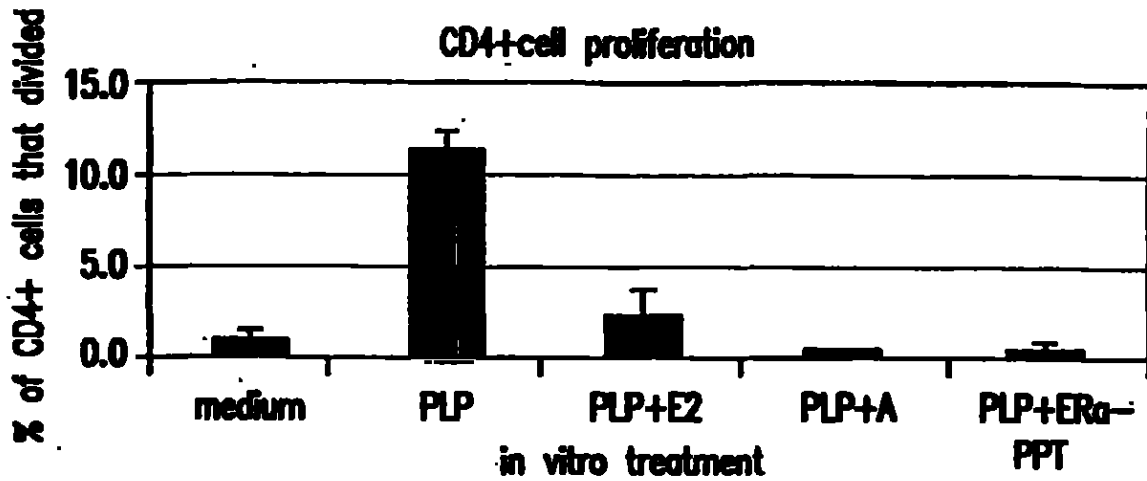


FIG.4A

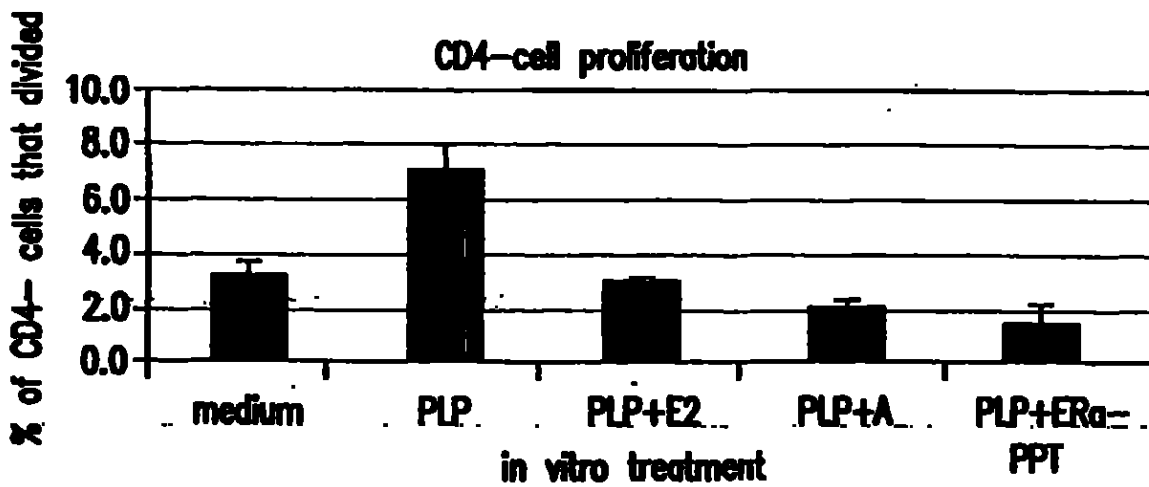
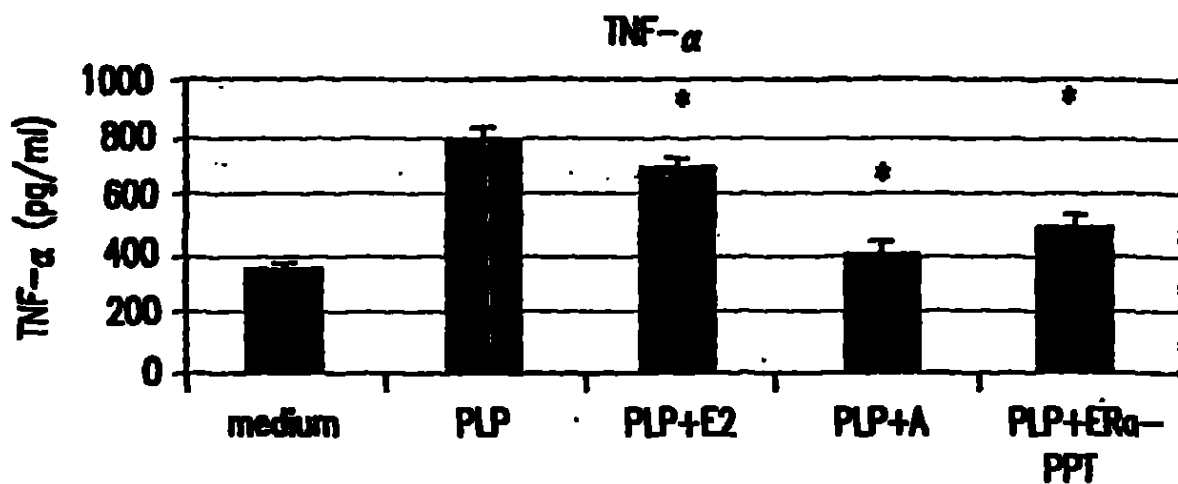


FIG.4B

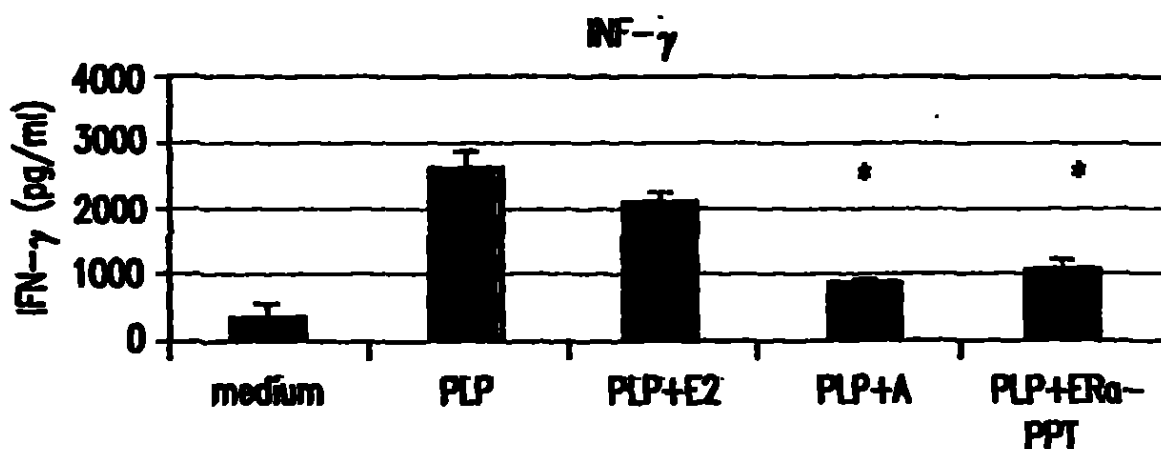
24/33

6/7



in vitro treatment

FIG.5A



in vitro treatment

FIG.5B

34

7/7

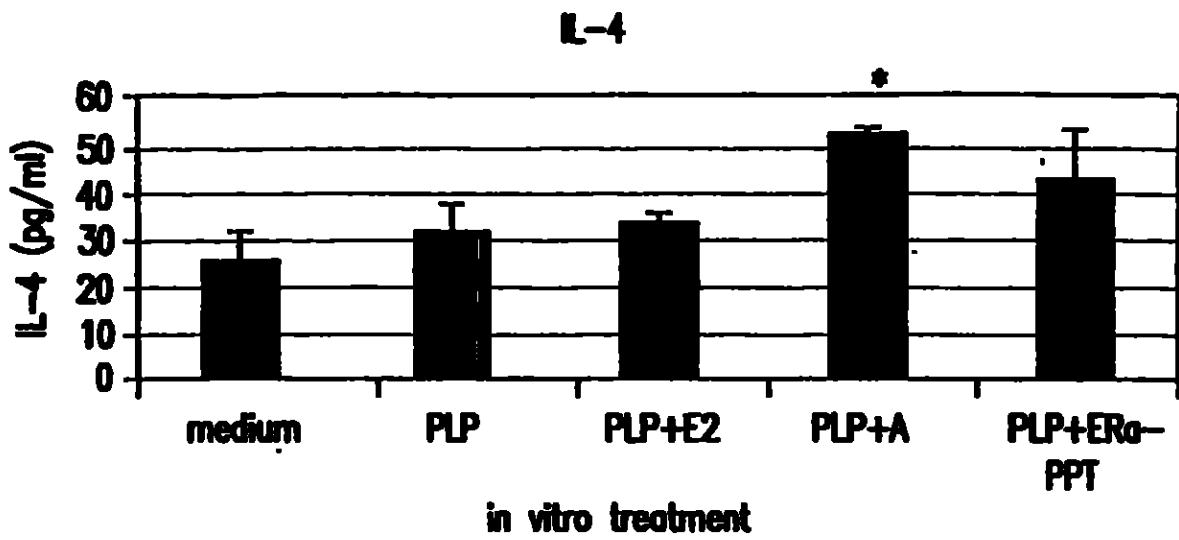


FIG.5C

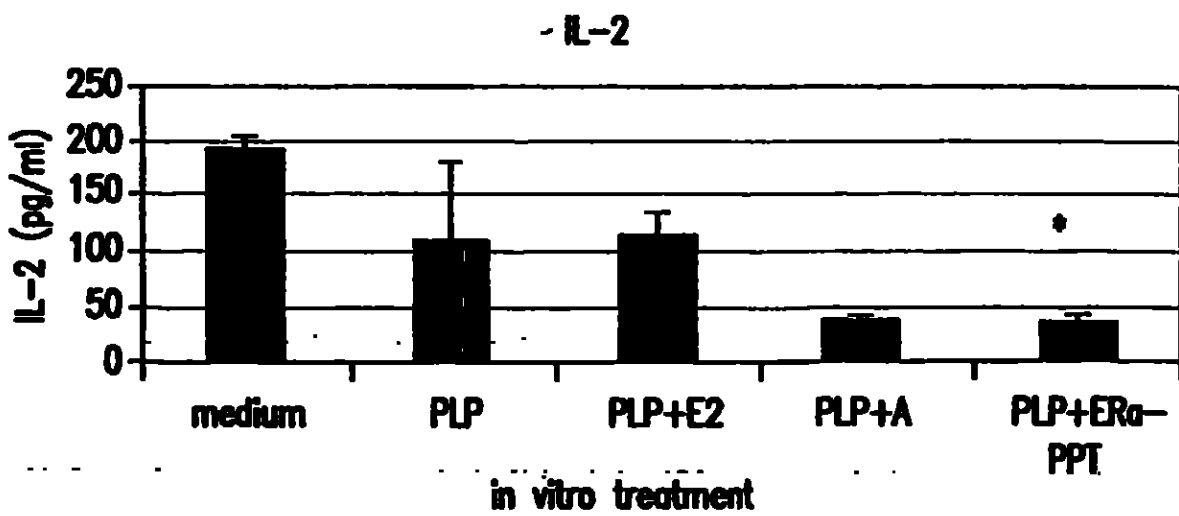


FIG.5D

97.402
26 35
(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA SEGÚN EL TRATADO DE COOPERACIÓN INTERNACIONAL
EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de Propiedad Intelectual
Oficina Internacional



(43) Fecha de Publicación Internacional
29 de julio de 2004 (29.07.2004)

(10) Número de Publicación Internacional

PCT

WO 2004/062653 A3

(51) Clasificación Internacional de Patentes⁷: A61K 31/00,
31/4535, 31/138, 31/140, 31/55, A61P 37/00, 37/08

CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(21) No. Solicitud Internacional: PCT/US2004/000037

Declaraciones bajo la Regla 4.17:

(22) Fecha de Presentación Internacional:
5 de Enero de 2004 (05.01.2004)

(25) Idioma de Presentación: Inglés

(26) Idioma de Publicación: Inglés

(30) Datos relativos a la Prioridad:
60/438,123 8 de Enero de 2003 (06.01.2003) US

(71) Solicitante (para todos los países destinatarios con
excepción de US): WYETH [US/US]; Five Giralda Farms,
Madison, NJ 07940 (US).

(72) Inventores, e

(75) Inventores/Solicitantes (para US únicamente):
ELLOSO, M., Merle [US/US]; 311 Spencer Road,
Devon, PA 19333 (US). MITCHELL, Robert [US/US]:
26 Lenape Lane, Doylestown, PA 18901 (US).
HARNISH, Douglas, C. [US/US]; 2715 Kutztown
Road, Pennsburg, PA 18073 (US). ADELMAN,
Steven, J. [US/US]; 342 Windy Run Drive,
Doylestown, PA 18901 (US).

(74) Agentes: WEBSTER, Darryl, L., Wyeth, patent Law
Department, Five Giralda Farms, Madison, NJ 07940
(US).

(51) Países designados (a menos que se indique lo
contrario para cada clase de protección disponible): AE,
AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ,
CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC,
EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL,
IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU,
LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO,
NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK,
SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC,
VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(54) Países designados (a menos que se indique lo
contrario para cada clase de protección disponible):
ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ,
TZ, UG, ZM, ZW), Eursialtica (AM, AZ, BY, KG, KZ,
MD, RU, TJ, TM), Europea (AT, BE, BG, CH, CY, CZ,
DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC,
NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI,

— en cuanto al derecho del solicitante de solicitar y
que se le conceda una patente (Regla 4.17(II))
para las siguientes designaciones AE, AG, AL, AM,
AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH,
CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG,
ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS,
JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV,
MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ,
OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK,
SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VC,
VN, YU, ZA, ZM, ZW, patente ARIPO (BW, GH, GM,
KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),
patente Eursialtica (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU,
TJ, TM), patente Europea (AT, BE, BG, CH, CY, CZ,
DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU,
MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), Patente OAPI
(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML,
MR, NE, SN, TD, TG)

— en cuanto al derecho del solicitante a reivindicar
prioridad de la solicitud anterior (Regla 4.17(III)) para
todas las designaciones AE, AG, AL, AM, AT, AU,
AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO,
CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI,
GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE,
KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD,
MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG,
PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY,
TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VC, VN, YU,
ZA, ZM, ZW, patente ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS,
MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), patente
Eursialtica (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
patente Europea (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK,
EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL,
PT, RO, SE, SI, SK, TR), patente OAPI (BF, BJ, CF,
CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN,
TD, TG)

Publicado:

— con informe internacional de búsqueda
— antes del vencimiento del tiempo límite para
modificar las reivindicaciones y para volver a
publicar en el caso de recibo de modificaciones

(55) Fecha de publicación del Informe de búsqueda
Internacional:

4 de Noviembre de 2004

Para códigos de dos letras y otras abreviaturas,
remítase a las "Notas Guía sobre Códigos y
Abreviaturas" que aparece al comienzo de cada edición
regular del Boletín Oficial PCT.

(54) Título: EL USO DE MODULADORES DE RECEPTOR α DE ESTRÓGENO PARA EL TRATAMIENTO DE
ESCLEROSIS MÚLTIPLE

(57) Extracto: La presente invención provee métodos de tratar una patología autoinmunitaria en un mamífero,
que comprende administrar un agente con actividad agonista de receptor α de estrógeno, en particular un
modulador selectivo de receptor de estrógeno, al mamífero en una cantidad suficiente para disminuir la
producción de citocinas TH-1 y/o TH-2. Se ofrece asimismo un método de seleccionar compuestos útiles para el
tratamiento de esclerosis múltiple, que comprende seleccionar un compuesto que posee actividad agonista de
receptor α de estrógeno.

WO 2004/062653 A3

EL USO DE MODULADORES DE RECEPTOR α DE ESTRÓGENO
PARA EL TRATAMIENTO DE ESCLEROSIS MÚLTIPLE

CAMPO DE LA INVENCION

Esta invención se refiere generalmente a terapias para tratar enfermedades autoinmunitarias y, más específicamente, al uso de compuestos que poseen actividad agonista de receptor α de estrógeno (ER α) para el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias. En particular, la invención se relaciona con el uso de moduladores selectivos de receptor de estrógeno (SERMS) para el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias. Más aún, la presente invención concierne a métodos de seleccionar compuestos útiles para el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La esclerosis múltiple (MS) es una enfermedad autoinmunitaria del sistema nervioso central (CNS) en el cual el sistema inmunitario da una respuesta inmunitaria inapropiada a componentes de mielina. Se caracteriza por inflamación del CNS y daño de la mielina. Los linfocitos T-cooperador-1 (TH-1) CD4⁺ y sus productos (verbigracia, Factor α de Necrosis Tumoral (TNF- α), Interferón- γ (IFN- γ), y metaloproteinasas) median una gran parte de la patología inmunitaria.

Al igual que con un número de enfermedades autoinmunitarias, la incidencia de esclerosis múltiple es más alta (2 a 3 veces) en las hembras en comparación con los machos¹. Se han demostrado los efectos inmunomoduladores de los estrógenos en la MS. Por ejemplo, la enfermedad clínica mejora durante el embarazo, cuando los niveles de estrógeno son elevados, y empeora durante el período pos-parto²⁻⁴. Además, se ha informado la mejora de los síntomas en pacientes con MS, a

27/37

quienes se administró estradiol⁵. Los estrógenos parecen afectar directamente la función de los linfocitos T, y se ha demostrado la modulación de la producción de citocinas por clones de linfocitos T de pacientes con MS⁵⁻⁸. Adicionalmente, se demostró la inhibición del factor NF- κ B por el estriol en estas células⁸.

Se ha demostrado asimismo que los estrógenos modulan la actividad de la enfermedad en encefalomiелitis autoinmunitaria experimental (EAE) murina, un modelo bien definido de esclerosis múltiple⁹⁻¹³. Este modelo se empleó para probar el tratamiento con SERMS/Estrógenos Selectivos de Tejido (TSEs) y agonistas selectivos de receptor α de estrógeno.

Los SERMS son una clase de medicamentos que se fijan al receptor de estrógeno y muestran efectos selectivos de tejido. Por ejemplo, el SERM raloxifeno posee efectos agonistas de estrógeno sobre el hueso, los lípidos y los factores de coagulación, y efectos antagonistas de estrógeno sobre el seno y el útero.¹⁹ Los SERMS pueden incluir 1) agentes previamente conocidos como anti-estrógenos, tales como 16-epiestriol, etamoxitriptol, clomifeno, y tamoxifeno; 2) un derivado de 19-nortestosterona, tibolone; 3) raloxifeno y sus análogos; y 4) derivados más recientes de trifeniletileno, tales como droloxifeno, toremifeno, idoxifeno, y levormeloxifeno.¹⁹ Los SERMS compiten con estrógenos endógenos en fijarse al receptor y pueden activar o bloquear la acción del estrógeno.¹⁹

Un objeto de la presente invención es ofrecer nuevos métodos de tratar una patología autoinmunitaria mediante la administración de agentes que poseen actividad de receptor α de estrógeno, particularmente SERMS.

SUMARIO DE LA INVENCION

La presente invención ofrece un método de tratar una patología autoinmunitaria en un mamífero, que comprende administrar por lo menos

34
38

un agente, que posee actividad agonista de receptor α de estrógeno, al mamífero en una cantidad suficiente para disminuir la producción de citocinas TH-1 y/o TH-2.

La presente invención facilita asimismo un método de tratar una patología autoinmunitaria en un mamífero, que comprende administrar un modulador selectivo de receptor de estrógeno al mamífero en una cantidad suficiente para disminuir la producción de citocinas TH-1 y/o TH-2.

La presente invención proporciona además un método de seleccionar compuestos útiles para el tratamiento de esclerosis múltiple, que comprende seleccionar un compuesto que posee actividad agonista de receptor α de estrógeno.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La invención puede entenderse más completamente a partir de la descripción detallada y los dibujos acompañantes que forman parte de esta solicitud.

Figura 1A muestra el efecto del antagonista ER ICI sobre la supresión, mediada por estrógeno, de la enfermedad.

Figura 1B muestra el efecto de Raloxifeno vs. Compuesto A sobre EAE.

Figura 2 muestra el efecto de ligandos selectivos de ER sobre EAE.

Figura 3A muestra el efecto de la administración *in vivo* de ligandos selectivos de ER sobre la producción de TNF- α por esplenocitos de ratones con EAE.

Figura 3B muestra el efecto de la administración *in vivo* de ligandos

~~39~~

selectivos de ER sobre la producción de IL-4 por esplenocitos de ratones con EAE.

Figura 3C muestra el efecto de la administración *in vivo* de ligandos selectivos de ER sobre la producción de IFN- γ por esplenocitos de ratones con EAE.

Figura 3D muestra el efecto de la administración *in vivo* de ligandos selectivos de ER sobre la producción de IL-5 por esplenocitos de ratones con EAE.

Figura 3E muestra el efecto de la administración *in vivo* de ligandos selectivos de ER sobre la producción de IL-2 por esplenocitos de ratones con EAE.

Figura 3F muestra el efecto de la administración *in vivo* de ligandos selectivos ER sobre la producción de IL-10 por esplenocitos de ratones con EAE.

Figura 4A muestra el efecto de compuestos sobre la proliferación de células CD4- a la estimulación del antígeno.

Figura 4B muestra el efecto de compuestos sobre la proliferación de células CD4+ a la estimulación del antígeno.

Figura 5A muestra el efecto de compuestos sobre la producción de TNF- α por linfocitos T efectores a la estimulación del antígeno.

Figura 5B muestra el efecto de compuestos sobre la producción de IFN- γ por linfocitos T efectores a la estimulación del antígeno.

Figura 5C muestra el efecto de compuestos sobre la producción de IL-4 por

linfocitos T efectores a la estimulación del antígeno.

Figura 5D muestra el efecto de compuestos sobre la producción de IL-2 por linfocitos T efectores a la estimulación del antígeno.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Tal como se divulga aquí, la administración de un agente, que posee actividad agonista de receptor α de estrógeno, a un mamífero reduce la gravedad de patologías autoinmunitarias. Estos efectos parecen deberse, en parte, al efecto de tales agonistas en reducir la producción de citocinas TH-1 y/o TH-2 por linfocitos T en la periferia y el sitio de patología.

Por lo tanto, la presente invención ofrece un método de tratar una patología autoinmunitaria en un mamífero, que comprende administrar un agente que posee actividad agonista de receptor α de estrógeno al mamífero en una cantidad suficiente para disminuir la producción de citocinas TH-1 y/o TH-2. De igual manera, la presente invención proporciona un método de tratar una patología autoinmunitaria en un mamífero, que comprende administrar un modulador selectivo de receptor de estrógeno al mamífero en una cantidad suficiente para disminuir la producción de citocinas TH-1 y/o TH-2.

Los métodos de la invención pueden ponerse en práctica con respecto a una variedad de patologías autoinmunitarias. Tales patologías son conocidas en el arte e incluyen, pero sin limitarse a, esclerosis múltiple, artritis reumatoide, psoriasis, tiroiditis autoinmunitaria, uveítis, myasthenia gravis, enfermedad inflamatoria intestinal y síndrome de Sjögren. En incorporaciones preferidas de la invención, el mamífero puede ser una hembra, un macho, un humano o un no humano.

En una incorporación de la invención, el agente que posee actividad

42
41

agonista de receptor α de estrógeno se administra por una vía seleccionada de las vías orales, transcutáneas, respiratorias, subcutáneas e intravenosas.

En incorporaciones preferidas de la invención, la citocina TH-1 se selecciona del grupo conformado por TNF- α , IFN- γ e IL-2, y la citocina TH-2 se selecciona del grupo conformado por IL-4, IL-5 e IL-10. Las personas expertas en el arte observarán que una respuesta inmunitaria mediada por TH-1 se caracteriza por la secreción de citocinas pro-inflamatorias, que incluyen TNF- α , IFN- γ , IL-2. Una respuesta mediada por TH-2 se caracteriza por secreción de citocinas anti-inflamatorias tales como IL-4, IL-5 y IL-10. En una incorporación preferida de la invención, la producción de citocinas TH-1 se suprime por la administración del agente. En otra incorporación preferida de la invención, se suprime la producción de las dos citocinas TH-1 y TH-2. En una incorporación más de la invención, se suprime la producción de citocinas TH-1 y se aumenta la producción de citocinas TH-2.

Como una incorporación preferida, el agonista de ER α exhibe una actividad anti-inflamatoria, verbigracia una reducción de la actividad NF- κ B. En otra incorporación preferida, el agonista de ER α es no esteroide.

En una incorporación adicional de la invención, el SERM se selecciona del grupo que comprende raloxifeno, tamoxifeno, lasofoxifeno, idoxifeno, droloxifeno, bazedoxifeno, toremifeno y sus derivados y análogos. En otra incorporación de la invención el modulador selectivo de receptor de estrógeno ejerce un efecto biológico sobre el cerebro o el sistema nervioso central.

La presente invención ofrece además un método de seleccionar compuestos útiles para el tratamiento de esclerosis múltiple, que comprende seleccionar un compuesto que posee actividad agonista de receptor α de estrógeno. Análisis convencionales para determinar la actividad del agonista *in vitro*,

42

usando receptores tales como luciferasa, son bien conocidos en el arte. Son ilustrativas de análisis de agonista las siguientes publicaciones, las cuales se incorporan por referencia con respecto a sus análisis de agonista de ER α : Lyttle CR, Damian-Matsumura P., Juul H., Butt TR, Human estrogen receptor regulation in a yeast model system and studies on receptor agonists and antagonists, J. Steroid Biochem Mol Biol 42:677-685 (1992); Katzenellenbogen BS, Bhardwaj B, Fang H, Ince BA, Pakdel F, Reese JC, Schodin D, Wrenn CK, Hormone binding and transcription activation by estrogen receptors: analyses using mammalian and yeast systems, J Steroid Biochem Mol Biol 47:39-48 (1993); PCT International Publication No. WO 00/37681; Webb P, Lopez GN, Greene GL, Baxter JD, Kushner PJ, 1992, The limits of the cellular capacity to mediate an estrogen response, Mol Endocrinology, 6(2): 157-67. Preferiblemente, en tales análisis, un "agonista de receptor α de estrógeno" se define como un compuesto que sustancialmente imita la actividad ER- α de 17- β estradiol, tal como se mide en el análisis seleccionado para determinar la actividad estrógena.

En una incorporación preferida de la invención, el compuesto es un SERM. En una incorporación más de la invención, el compuesto disminuye la producción de TNF α en por lo menos alrededor de 20%-100%, como se describe en el Ejemplo II del presente texto. En incorporaciones alternativas, la disminución puede ser por lo menos 30, 40, 50, 60 u 80%.

Definiciones de abreviaturas y términos:

Las siguientes definiciones se ofrecen para una completa comprensión de los términos y abreviaturas usados en esta especificación.

Tal como se emplea aquí y en las reivindicaciones anexas, las formas del singular "un", "uno" y "el" incluyen la referencia al plural, a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Así, por ejemplo, una referencia a "un agonista de receptor α de estrógeno" incluye una pluralidad de tales agonistas.

~~43~~
43

Las abreviaturas en la especificación corresponden a unidades de medida, técnicas, propiedades o compuestos en la siguiente forma: "µg" significa microgramo(s), "ml" significa mililitro(s), "µM" significa micromol(es), "mM" significa milimol(es), "s.c." significa subcutáneo, "i.p." significa intraperitoneal, y "p.o" significa oral.

"Esclerosis múltiple" se abrevia MS.

"Sistema nervioso central" se abrevia CNS.

"T-cooperador-1" y "T-cooperador-2" se abrevian TH-1 y TH-2, respectivamente.

"Factor de Necrosis Tumoral-α" se abrevia TNF-α.

"Interferón-γ" se abrevia IFN-γ.

"Factor Nuclear-κB" se abrevia NF-κB.

"Encefalomiелitis Autoinmunitaria Experimental" se abrevia EAE.

"Moduladores selectivos de receptor de estrógeno" SERMS.

"Estrógenos Selectivos de Tejido " se abrevia TSEs.

"Receptor de Estrógeno" se abrevia ER.

"Interleucina" se abrevia IL

"Péptido de proteína proteolipídica" se abrevia PLP.

"Coadyuvante Completo de Freund" se abrevia CFA.

"Pos-transferencia" se abrevia PT.

Tal como se emplea aquí, el término "patología autoinmunitaria" se refiere a una patología mediada por una respuesta autoinmunitaria perjudicial. En la mayoría de las patologías autoinmunitarias, los linfocitos T reconocen un componente anfitrión en uno o más tejidos como extraños y atacan ese tejido.

El término "tratamiento", tal como se emplea aquí, incluye el tratamiento preventivo (verbigracia, profiláctico), curativo, o paliativo y "tratar", tal como se emplea aquí, incluye asimismo el tratamiento preventivo, curativo

y paliativo. "Tratar", con referencia a una patología autoinmunitaria, se refiere a cualquier efecto observable del tratamiento. El efecto benéfico puede evidenciarse por la manifestación retardada de síntomas clínicos en un mamífero susceptible, una reducción en la gravedad de algunos o todos los síntomas clínicos de la enfermedad, una evolución más lenta de la enfermedad, una reducción en el número de recaídas de la enfermedad, una reducción en el número o actividad (verbigracia, secreción de citocinas) de linfocitos T patógenos en el sitio de patología o en la circulación, una mejora en la salud general o bienestar del individuo, o por otras características bien conocidas en el arte, que son específicas de la enfermedad particular.

Tal como se divulga aquí, el término "agente que posee actividad de receptor α de estrógeno" es un agente que exhibe actividad ER α e incluye, pero sin limitarse a, los moduladores selectivos de receptor de estrógeno y estrógenos selectivos de tejido. El término puede incluir también agonistas parciales, péptidos, polipéptidos, genes, fragmentos de genes, moléculas pequeñas no peptídicas, productos naturales, ADN complementario y mARN.

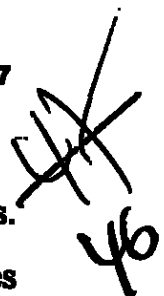
Tal como se emplea aquí, el término "mamífero" se refiere a un humano, un primate no humano, canino, felino, bovino, ovino, porcino, murino u otro mamífero veterinario o de laboratorio. Las personas expertas en el arte reconocen que una terapia que reduzca la gravedad de una enfermedad inmunitaria en una especie de mamífero es predictiva del efecto de la terapia sobre otra especie de mamífero. La persona experta es consciente igualmente de que se conocen modelos animales creíbles de enfermedades inmunitarias humanas, incluida EAE, que es un modelo animal creíble de esclerosis múltiple.

Una "cantidad eficaz para disminuir la producción de citocinas TH-1 y/o TH-2" se refiere a una cantidad eficaz, con posologías y durante períodos

de tiempo necesarios para lograr el resultado deseado de tratar una patología autoinmunitaria. Se observará que la cantidad de agonista de receptor α de estrógeno, eficaz para disminuir la producción de citocinas TH-1 y/o TH-2 en los métodos de la presente invención, variarán de un individuo a otro no sólo con el agonista particular seleccionado, la vía de administración y la capacidad del agonista de provocar una respuesta deseada en el individuo, sino también con factores tales como el estado de la enfermedad o la gravedad de la afección a aliviar, edad, sexo, peso del individuo, el estado de salud del paciente, y la gravedad de la condición patológica que se está tratando, la medicación concurrente o dietas especiales que sigue en ese entonces el individuo particular, y otros factores que reconocerán aquellas personas expertas en el arte, hallándose en última instancia la posología apropiada a discreción del médico encargado. Los regímenes de posología pueden ajustarse para proporcionar la respuesta terapéutica mejorada. Una "cantidad eficaz para disminuir la producción de citocinas TH-1 y/o TH-2" es además una en la cual los efectos terapéuticamente benéficos superan cualesquiera efectos tóxicos o perjudiciales del agonista.

Preferiblemente, los agonistas de receptor α de estrógeno se administran en los métodos de la presente invención con una posología y durante un tiempo tales que se disminuya la producción de citocinas TH-1 y/o TH-2, comparada con la producción de estas citocinas al inicio del tratamiento. Del mismo modo, tal tratamiento puede ser benéfico para reducir la gravedad general de los síntomas de una enfermedad autoinmunitaria, comparados con la gravedad de los síntomas antes del inicio del tratamiento. En una incorporación preferida, las posologías varían desde 5mg/kg/día a 500 mg/kg/día, y, alternativamente, en por lo menos alrededor de 10, 50, 100 ó 150 mg/kg/día.

EJEMPLOS



La presente invención se define con más detalle en los siguientes Ejemplos. Hay que entender que estos Ejemplos, aunque indican incorporaciones preferidas de la invención, se dan a modo de ilustración únicamente. A partir de la discusión anterior y estos Ejemplos, una persona experta en el arte puede verificar las características esenciales de esta invención y, sin apartarse del espíritu y el ámbito de la misma, puede introducir varios cambios y modificaciones de la invención para adaptarla a diferentes usos y condiciones.

**Ejemplo 1 – Efecto de la Administración *In Vivo* de
Compuestos en un Modelo Animal de Esclerosis Múltiple**

Este Ejemplo muestra que, en un modelo animal de esclerosis múltiple, la administración *in vivo* de agonistas selectivos de receptor α de estrógeno tiene como resultado una manifestación retardada y una incidencia y gravedad disminuidas de la enfermedad.

Materiales y Métodos

Animales. Veinticinco ratones SJL hembra intactos (6-8 semanas de edad) (Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME) se usaron como ratones donantes en el modelo de transferencia adoptiva de EAE.

Inducción de la Encefalomiелitis Autoinmunitaria Experimental (EAE).

La EAE se indujo por la transferencia adoptiva de células del bazo, sensibilizadas con PLP, usando una modificación de los métodos descritos previamente.²⁰ Los ratones se inmunizaron con péptido de proteína de proteolípido 139-151 (PLP) emulsionada en coadyuvante completo de Freund (CFA). Cada animal recibió 150 μ g de PLP en un volumen de 0.2 ml CFA, que contenía 4 mg/ml de *Mycobacterium tuberculosis* inactivado y secado por calor (cepa H37RA). La emulsión de PLP/CFA se inyectó s.c. en dos sitios (en el lomo, y en la base de la cola). Se inyectó 0.1 ml en cada sitio. Diez días después, los ratones se sometieron a eutanasia y se

recogieron los bazos. Se prepararon suspensiones individuales de células de los bazos. Después de la lisis de los eritrocitos, las células se cultivaron con una concentración de 5×10^6 células/ml durante 3 días en matraces de cultivo de tejido de 75 cm² en RPMI-10 (medio RPMI que contenía 10% de suero fetal bovino inactivado por calor, 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina, 2mM de glutamina, 50 µM 2-mercaptoetanol). Se agregó PLP con una concentración final de 5 µg/ml. Las células se incubaron a 37 °C en 5% CO₂. Luego de la incubación, se cosecharon las células efectoras estimuladas por PLP, se lavaron con salina tamponada con fosfato y se inyectaron i.p. en ratones SJL hembras, a las que se les habían extirpado los ovarios (6-8 semanas de edad) (1.5×10^7 células/ratón). La manifestación de la enfermedad ocurre por lo general 7-14 días post-transferencia (PT) de las células.

El grado de gravedad de la enfermedad se monitoreó diariamente usando la escala mostrada en Tabla 1.

Tabla 1: Escala de Gravedad de la Enfermedad

- | | |
|---|---|
| 0 | Sin signos manifiestos de enfermedad |
| 1 | Cola flácida |
| 2 | Cola flácida/debilidad de las extremidades posteriores (observada como un contoneo, el ratón pierde el control de las extremidades posteriores que pasan a través de los vanos de la jaula) |
| 3 | Parálisis parcial de las extremidades posteriores (el ratón ya no puede apoyarse sobre las partes traseras pero puede mover aún una o ambas extremidades en cierta medida) |
| 4 | Parálisis completa de las extremidades posteriores (pérdida completa de movimiento en las extremidades posteriores; el animal arrastra las extremidades posteriores; puede agarrar una barra y erguirse sin dificultad) |

- 5 Parálisis completa de las extremidades posteriores y/o debilidad moderada de las extremidades anteriores (el ratón puede agarrar todavía una barra, pero tiene cierta dificultad en erguirse)
 - 6 Parálisis completa de las extremidades posteriores con debilidad severa de las extremidades anteriores o parálisis; moribundo
-

Para evaluar el efecto de los compuestos sobre la enfermedad, se administraron compuestos diariamente a los ratones receptores (s.c. o p.o.) en las dosis indicadas, usando un vehículo de 10% etanol/90% aceite de maíz. Los animales de control recibieron sólo vehículo. Los ratones recibieron las dosis con 5-7 días de anticipación a la transferencia adoptiva de las células de los donantes.

Análisis Histológico. Al pico de la enfermedad (14 días PT), los ratones se sometieron a eutanasia con CO₂. Se extirparon los cerebros y las médulas espinales en la necropsia y se fijaron en formalina tamponada al 10%. Los cerebros se cortaron en tres segmentos (en líneas generales, cerebro anterior, cerebro medio y cerebelo) y se compactaron como un sólo bloque. La médula espinal se descalcificó en 10% HCl y se cortó en segmentos cervicales, torácicos y lumbares compactados como un solo bloque. Se preparó una laminilla de vidrio H&E (hematoxilina y eosina) estándar de cada bloque de tejido (cerebro y médula espinal) de cada ratón entregado, evaluándose dos laminillas H&E resultantes por ratón.

Se evaluaron las laminillas y las lesiones observadas se calificaron subjetivamente con respecto a la presencia (P = presente) y/o gravedad. Las calificaciones de gravedad son 0 = WNL (dentro de los límites normales), 1 = leve o mínima, 2 = benigna, 3 = moderada, 4 = marcada y 5 = grave. La ubicación de los resultados, en relación con el órgano, se denotó como perivascular, periventricular, endimaria o menígea, y

también focal (en áreas pequeñas o no a través de toda la sección), o difusa (a través de toda la sección examinada). Focal se definió como muy localizada y que no afectaba a cada estructura. Los resultados no definidos como focales eran difusos o afectaban a cada estructura (verbigracia, todos los vasos). Los leucocitos observados eran principalmente linfocitos y macrófagos con neutrófilos ocasionales. La desmielinación se observó como huecos abiertos distinguibles en trayectos de materia blanca en la médula espinal.

Los modelos murinos típicos de EAE tienen focos diseminados de agregados, de tamaño leve a moderado, de leucocitos y raramente tienen infiltrados difusos en los tejidos afectados.

Análisis de Respuestas de Repetición específicas de PLP: Producción de Citocinas.

Para examinar el efecto de compuestos administrados *in vivo* sobre la producción de citocinas por esplenocitos de ratones con EAE, los ratones se sometieron a eutanasia con CO₂ al pico de la enfermedad (14 días PT), y se recogieron los bazos. Los bazos se procesaron individualmente en suspensiones individuales de células. Luego de la lisis de los eritrocitos, las células se re-suspendieron en RPMI-10 y se cultivaron en placas de cultivo de tejido de 24 pozos con una concentración de 5×10^5 células/ml. Las células se estimularon con 5 µg/ml PLP. Se recogieron los sobrenadantes después de 3 días y se congelaron hasta el momento de su utilización a -20°C. Se cuantificaron las citocinas (TNF-α, IFN-γ, IL-5, IL-4, IL-2) en los sobrenadantes usando un estuche de citometría de flujo, disponible en el comercio (Cytometric Bead Array, Becton Dickinson BioSciences, San Diego, CA). Se cuantificó la IL-10 usando un estuche ELISA específico de IL-10 (Becton Dickinson BioSciences).

Para examinar *in vitro* el efecto de compuestos sobre la producción de citocinas por células efectoras cebadas con PLP, se inmunizaron ratones

X/50

SJL con PLP emulsionado en CFA. Después de 10 días, se recogieron los bazo y se prepararon suspensiones individuales de células. Luego de la lisis de los eritrocitos, los esplenocitos se estimularon con 5 µg/ml PLP en la presencia de compuesto durante 3 días a 37 °C, 5% CO₂. Las muestras de control no se estimularon y se cultivaron en medio únicamente ("medio"). Los compuestos se agregaron con una concentración final de 1 µM. Después de 3 días de incubación, se recogieron los sobrenadantes y se almacenaron a -20 °C. Se cuantificaron las citocinas (TNF-α, IFN-γ, IL-5, IL-4, IL-2) en los sobrenadantes usando un estuche Cytometric Bead Array.

Efecto de compuestos sobre la proliferación de linfocitos T efectores a la estimulación con antígeno

Para examinar el efecto de la proliferación de linfocitos T efectores *in vitro* en respuesta a la estimulación con PLP, se estudió la proliferación de linfocitos T mediante citometría de flujo usando el siguiente análisis. Se inmunizaron ratones SJL con PLP emulsionado en CFA. Luego de 10 días, se recogieron los bazo y se prepararon suspensiones individuales de células. Después de la lisis de los eritrocitos, los esplenocitos se etiquetaron con succinimidil éster de carboxifluoresceína (CFSE). Seguidamente las células etiquetadas con CFSE se incubaron con PLP durante 3 días a 37 °C, 5% CO₂. Los compuestos se agregaron con una concentración final de 1 µM. Para determinar el porcentaje de células CD4⁺ que se dividieron, las células etiquetadas con CFSE se tinturaron con anticuerpos específicos para el marcador CD4 antes del análisis citométrico de flujo.

Resultado

I. Efecto de SERMs/Estrógenos Selectivos de Tejido sobre EAE inducida por la transferencia adoptiva de células efectoras cebadas con PLP

Tal como se indicó previamente, el tratamiento con 17β -estradiol (E2) se tradujo en un retardo en la manifestación así como en una incidencia y gravedad reducidas de la enfermedad (Figura 1A; referencias 9, 11-13). Para determinar si los efectos protectores del estrógeno en este modelo eran mediados por el receptor de estrógeno, los ratones se trataron con E2 y el antagonista de receptor de estrógeno ICI 182,780. ICI abolió el efecto de E2 sobre la enfermedad (Figura 1A).

El tratamiento con E2 o con los SERMs raloxifeno o Compuesto A [2-(hidroxifenil)-3-metil-1-[4-(2-piperidin-1-il-etoxi)bencil]-1*H*-indol-5-ol clorhidrato monohidrato] tuvo como resultado un retardo en la manifestación, así como una incidencia y gravedad reducidas de la enfermedad (Figura 1B y Tabla II). Consistentes con los efectos de estos compuestos sobre los signos clínicos de la enfermedad, hubo una reducción en la cantidad de células inflamatorias que infiltraban las médulas espinales y los cerebros de los ratones tratados con Compuesto A, comparados con los ratones de otros grupos de tratamiento. Además, no se detectó desmielinación en las médulas espinales de ratones tratados con Compuesto A.

Tabla II. Hallazgos Histológicos

Tratamiento	Infiltrados de leucocitos meníngeos / perivasculares en el cerebro	Distribución de lesiones cerebrales	Infiltrados de leucocitos meníngeos / perivasculares en la médula espinal	Desmielinación de la médula espinal
Vehículo	3/3 ^a (2.33) ^b	Meníngea, perivascular y periependimaria	3/3 (2)	3/3 (2)
E2	4/4 (2.5)	Meníngea, perivascular y periependimaria	¾ (1.7)	¾ (1.3)
Raloxifeno	5/5 (2.4)	Meníngea, perivascular y periependimaria	5/5 (1.4)	5/5 (1.2)
Compuesto A	3/5 (2.7)	Meníngea, perivascular y periependimaria	1/5 (1)	0/5

a = Número de cerebros con hallazgo / número total evaluado

8/52

b = Grado promedio de gravedad de las lesiones observadas;
 0 = Dentro de los límites normales, 1=leve, 2=benigna, 3=moderada, 4=marcada, 5=grave

II. Efecto de Agonistas Selectivos de Receptor de Estrógeno sobre EAE inducida por la transferencia adoptiva de células efectoras cebadas con PLP

El tratamiento con E2 o el agonista selectivo de ER α PPT (propilpirazol triol) tuvo como resultado un retraso en la manifestación, así como una incidencia y gravedad reducidas de la enfermedad (Figura 2). Además, los ratones tratados con PPT presentaron una inflamación reducida en el cerebro y las médulas espinales, comparada con ratones tratados con vehículo, o con agonista selectivo de ER β (Tabla III). El examen histológico reveló que los ratones a los que se administró PPT tenían los tejidos más normales comparados con los ratones de control con vehículo. Todos los cuatro tenían infiltrados leves de leucocitos en las meninges, pero únicamente en la base del cerebro (alrededor del cerebro posterior/cerebelo/puente de Varolio/médula sobre las superficies ventrales únicamente). Ninguno de estos ratones presentaba lesiones de la médula espinal; las médulas espinales de estos ratones estuvieron todas dentro de los límites normales.

Tabla III

Tratamiento	Infiltrados de leucocitos meníngeos / perivasculares en el cerebro	Distribución de lesiones cerebrales	Infiltrados de leucocitos meníngeos / perivasculares en la médula espinal	Desmielinación de la médula espinal
Vehículo	4/4 ^a (2.75) ^b	Periventricular y ependimaria	4/4 (2)	¼ (2)
E2	3/4 (1.7)	Meníngea	2 /4 (1)	1/4 (1)
ER α -PPT (ER α)	4/4 (1)	Base del cerebro	0/4	0/4
ER β -041 (ER β)	4/4 (2.3)	Periventricular y ependimaria	2/4 (1.5)	2/4 (1.5)

a = Número de cerebros con hallazgo / número total evaluado

2/3

b = Grado promedio de gravedad de las lesiones observadas;
0 = Dentro de los límites normales, 1=leve, 2=benigna, 3=moderada, 4=marcada, 5=grave

III. Efecto de Agonistas Selectivos de ER sobre las Respuestas de Repetición específicas de PLP: Producción de Citocinas

Consistente con el efecto del agonista selectivo de ER α PPT sobre la enfermedad, el tratamiento de ratones con PPT tuvo como resultado una producción disminuida de citocinas a la estimulación de esplenocitos con PLP *in vitro* (Figura 3). Tanto la citocina Th1/pro-inflamatoria (TNF- α , IFN- γ , IL-2) como la citocina Th2/anti-inflamatoria (IL-4, IL-5, IL-10) se suprimieron por un tratamiento *in vivo* con PPT, indicando que PPT puede suprimir la enfermedad inhibiendo la activación de linfocitos T, más que por la desviación inmunitaria de la respuesta Th1 patógena a la respuesta Th2 protectora. En contraste, el agonista selectivo de ER α no tuvo efecto sobre la producción de citocinas (*, $p < 0.05$ comparada con el grupo de vehículo).

Ejemplo II – Efecto de Compuestos sobre Respuestas Inmunitarias Específicas de Antígeno *In Vitro*

Se examinó *in vitro* el efecto de estrógenos selectivos de tejido (Compuesto A) y ligandos selectivos de ER α (PPT) sobre respuestas inmunitarias específicas de antígeno *in vitro*.

A. Efecto de Compuestos sobre la Proliferación de linfocitos T efectores a la estimulación del antígeno

El tratamiento de células efectoras, cebadas con PLP, con el estrógeno selectivo de tejido Compuesto A o con el agonista selectivo de ER α PPT tuvo como resultado una proliferación disminuida de linfocitos T específicos de antígeno (Figura 4). Se suprimió la proliferación de ambas

1
X
54

poblaciones de células CD4+ y CD4-. Estos resultados sugieren que cada uno de estos compuestos puede actuar limitando potencialmente en parte la expansión clonal de linfocitos T específicos del antígeno.

B. Efecto de compuestos sobre la producción de citocinas por células efectoras a la estimulación del antígeno

El tratamiento de células efectoras, cebadas con PLP, con el estrógeno selectivo de tejido Compuesto A o con agonista selectivo de α (PPT) resultó en una producción disminuida de citocinas a la estimulación del antígeno (Figura 5). Ambos compuestos inhibieron la producción de la citocina pro-inflamatoria (TH-1) TNF- α . Tanto el Compuesto A como los agonistas selectivos de ER α PPT suprimieron igualmente la producción de IFN- γ . La incubación de estas células con el estrógeno selectivo de tejido Compuesto A tuvo asimismo como resultado un aumento concomitante en la citocina anti-inflamatoria IL-4, mientras que los otros compuestos no tuvieron efecto. Estos resultados sugieren que los agonistas selectivos de ER α (PPT) pueden tener efectos diferentes que los estrógenos selectivos de tejido sobre la producción de citocinas específicas del antígeno. Mientras que los primeros pueden suprimir EAE inhibiendo la producción de citocinas pro-inflamatorias (TH-1), los estrógenos selectivos de tejido pueden promover además la desviación inmunitaria a una respuesta inmunitaria protectora anti-inflamatoria/TH-2.

2055

Conclusiones

El tratamiento con los SERMs/TSEs raloxifeno y Compuesto A, así como el agonista selectivo de ER α PPT, suprimieron EAE, con el resultado de una manifestación retardada de la enfermedad, al igual que una incidencia y gravedad disminuidas. La supresión de los signos clínicos de la enfermedad en ratones tratados con estos compuestos se asoció con una patología reducida e infiltración de leucocitos en los cerebros y médulas espinales. Esto sugiere que estos compuestos pueden disminuir la enfermedad limitando el tráfico de células patógenas en los cerebros y médulas espinales, por ejemplo, aminorando la expresión de moléculas de adhesión y/o afectando la expresión de quimiocina/receptor de quimiocina. La supresión de la enfermedad, inducida por la transferencia adoptiva de células efectoras cebadas con PLP, con SERMs/TSEs y agonistas selectivos de ER α sugiere que estos compuestos tienen la capacidad de alterar la actividad de las células efectoras encefalitógenas. Estos hallazgos contrastan con la noción de que las células efectoras diferenciadas son más resistentes a los efectos de los estrógenos, comparadas con las células vírgenes¹³.

Los datos *in vitro* presentados aquí sugieren que los agonistas selectivos de ER α , preferencialmente SERMS o ligandos anti-inflamatorios ER, pueden tener efectos directos sobre la proliferación de linfocitos T específicos del antígeno y la producción de citocinas, limitando así la expansión y diferenciación de linfocitos T patógenos. Todos los tres tipos de ligandos son eficaces en suprimir la producción de las citocinas pro-inflamatorias (TH-1). No obstante, los estrógenos selectivos de tejido pueden promover además la producción de citocinas anti-inflamatorias (TH-2) protectoras, lo cual sugiere que estas moléculas pueden poseer efectos diferenciales sobre las respuestas inmunitarias específicas de PLP.

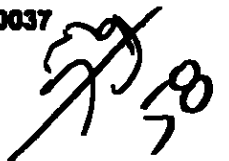
La observación de que los SERMs/TSEs son capaces de alterar el curso de



la enfermedad en este modelo es en cierta forma sorprendente, dados los efectos conocidos de los SERMs y los antagonistas de estrógeno en lupus eritematoso sistémico murino, el modelo de lupus en ratones. Se ha demostrado que los SERMs poseen efectos terapéuticos benéficos en lupus, una enfermedad autoinmunitaria en la cual la enfermedad se exacerba por estrógenos¹⁴⁻¹⁸. Puesto que los SERMs parecen actuar en una forma antagonista en el lupus, se ha anticipado que los SERMs tendrían una actividad antagonista similar en EAE. Por lo tanto, la predicción sería que los SERMs no tendrían efecto, o exacerbarían la EAE. En vez de ello, los SERMs demostraron actividad supresora de la enfermedad.

REFERENCIAS

1. Whitacre C.C. 2002. Sex differences in autoimmune disease. *Nat Immunol.* 2:777-780.
2. Abramsky O. 1994. Pregnancy and multiple sclerosis. *Ann Neurol.* 36 (suppl):S38-S41.
3. Confavreux C, Hutchinson M Hours M.M. et al. 1998. Rate of pregnancy-related relapse in multiple sclerosis. *Pregnancy in Multiple Sclerosis Group. N Engl J Med.* 339:285-291.
4. Damek D.M., Shuster EA 1997. Pregnancy and multiple sclerosis. *Mayo Clin Proc.* 72:977-989.
5. Sicotte N.L, Uva S.M., Klutch R. et al. 2002. Treatment of multiple sclerosis with the pregnancy hormone estriol. *Ann Neurol.* 52:421-428.
6. Gilmore W., Weiner L.P., Correale J. 1997. Effect of estradiol on cytokine secretion by proteolipid protein-specific T cell clones isolated from multiple sclerosis patients and normal control subjects. *J. Immunol.* 158:446-451.
7. Correale J. Arias M., Gilmore W. 1998. Steroid hormone regulation of cytokine secretion by proteolipid protein-specific CD4+ T cell clones isolated from multiple sclerosis patients and normal control subjects. *J. Immunol.* 161:3365-3374.
8. Zang Y.C.Q. Haider J.B., Hong, J. Rivera V.M., Zhang J.Z. 2002. Regulatory effects of estriol on T cell migration and cytokine profile: inhibition of transcription factor NF- κ B. *J. Neuroimmunol.* 124:106-114.
9. Jansson L, Olsson T., Holmdahl R. 1994. Estrogen induces a potent suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis and collagen-induced arthritis in mice. *J Neuroimmunol.* 53:203-207.
10. Kim S., Liva S.M., Dalal MA, Verity MA, Voskuhl R.R. 1999. Estriol ameliorates autoimmune demyelinating disease. Implications for multiple sclerosis. *Neurol.* 52:1230-1238.
11. Offner H., Adlard K., Zamora A, Vandenbark A.A. 2000. Estrogen potentiates treatment with T-cell receptor protein of female mice with



- experimental encephalomyelitis. *J Clin Invest.* 105:1465-1472.
12. Ito A., Bebo B.F., Jr., Matejuk A., Zamora A., Silverman M., Fyfe-Johnson A., Offner H. 2001. Estrogen treatment down-regulates TNF- α production and reduces the severity of experimental autoimmune encephalomyelitis in cytokine knockout mice. *J Immunol.* 167:542-552.
 13. Bebo B.F., Jr., Fyfe-Johnson A., Adlard K. Beam A.G., Vandembark A.A., Offner H. 2001. Low-dose estrogen therapy ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis in two different inbred mouse strains. *J Immunol.* 166:2080-2089.
 14. Duvic M., Steinberg A.D., Klassen L.W. 1978. Arthritis and Rheumatism. 21:414-17.
 15. Sturges A.D., Evans D.T.P., Mackay I.R., Riglar A. 1984. Effects of the oestrogen antagonist tamoxifen on disease indices in systemic lupus erythematosus. *J. Clin. Lab. Immunol.* 13:11-14.
 16. Stoecker Z.M. Bentwich Z., Zinger H., Mozes E. 1994. The beneficial effect of the estrogen antagonist, Tamoxifen, on experimental lupus erythematosus. *J. Rheumatol.* 21:2231-2238.
 17. Apeltgren L.D., Bailey D.L., Fouts R.L., Short L., Bryan N., Evans G.F., Sandusky G.E., Zuckerman S.H., Glasebrook A., Bumol T.F. 1996. The effect of a selective estrogen receptor modulator on the progression of spontaneous autoimmune disease in MRL *lpr/lpr* mice. *Cell. Immunol.* 173:55-63.
 18. Wu W-M., Lin B-F., Su Y-C, Suen J-L, Chiang B-L 2000. Tamoxifen decreases renal inflammation and alleviates disease severity in autoimmune NZB/W F1 mice. *Scand. J. Immunol.* 52:393-400.
 19. Kankaanpää J.T.J. October, 1999. Raloxifene - a multifunctional medicine:review. APIMALL General Practice Issue 1.0.
 20. Leonard, J.P., Waldburger K.E., Goldman S.J., 1995. *J. Exp. Med.* 181:P381-386.

**Lo que se reivindica es:**

1. Un método de tratar una patología autoinmunitaria en un mamífero, que comprende administrar por lo menos un agente, que posee actividad agonista de receptor α de estrógeno, al mamífero en una cantidad suficiente para disminuir la producción de citocinas TH-1 y/o TH-2.
2. El método de la reivindicación 1, en donde la patología autoinmunitaria se selecciona del grupo conformado por esclerosis múltiple, artritis reumatoide, psoriasis, tiroiditis autoinmunitaria, uveítis, enfermedad inflamatoria intestinal y síndrome de Sjögren.
3. El método de la reivindicación 1, en donde el mamífero es una hembra.
4. El método de la reivindicación 1, en donde el mamífero es un macho.
5. El método de la reivindicación 1, en donde el mamífero es un humano.
6. El método de la reivindicación 1, en donde el mamífero es un no humano.
7. El método de la reivindicación 1, en donde el agente se administra por una vía seleccionada de vías orales, transcutáneas, respiratorias, subcutáneas e intravenosas.
8. El método de la reivindicación 1, en donde la citocina TH-1 se selecciona del grupo conformado por TNF- α , IFN- γ e IL-2.
9. El método de la reivindicación 1, en donde la citocina TH-2 se selecciona del grupo conformado por IL-4, IL-5 e IL-10.

10. El método de la reivindicación 1, en donde el agente disminuye la actividad de factor Nuclear κ B.
11. El método de la reivindicación 1, en donde el agente es no esteroide.
12. El método de la reivindicación 1 en donde el agente es un modulador selectivo de receptor de estrógeno administrado en una cantidad suficiente para disminuir la producción de citocinas TH-1 y TH-2.
13. El método de la reivindicación 12, en donde la patología autoinmunitaria se selecciona del grupo conformado por esclerosis múltiple, artritis reumatoide, psoriasis, tiroiditis autoinmunitaria, uveítis, enfermedad inflamatoria y síndrome de Sjögren.
14. El método de la reivindicación 12, en donde el mamífero es una hembra.
15. El método de la reivindicación 12, en donde el mamífero es un macho.
16. El método de la reivindicación 12, en donde el mamífero es un humano.
17. El método de la reivindicación 12, en donde el mamífero es un no humano.
18. El método de la reivindicación 12, en donde el modulador selectivo de receptor de estrógeno se administra por una vía seleccionada de las vías orales, transcutáneas, respiratorias, subcutáneas e intravenosas.
19. El método de la reivindicación 12, en donde la citocina TH-1 se selecciona del grupo conformado por TNF- α , IFN- γ e IL-2.

20. El método de la reivindicación 12, en donde la citocina TH-2 se selecciona del grupo conformado por IL-4, IL-5 e IL-10.
21. El método de la reivindicación 12, en donde el modulador selectivo de receptor de estrógeno disminuye la actividad de Factor Nuclear κ B.
22. El método de la reivindicación 12, en donde el modulador selectivo de receptor de estrógeno se selecciona del grupo conformado por raloxifeno, tamoxifeno, lasofoxifeno, idoxifeno, droloxifeno, bazedoxifeno y toremifeno.
23. Un método de seleccionar compuestos útiles para el tratamiento de esclerosis múltiple, que comprende seleccionar un compuesto que posee actividad agonista de receptor α de estrógeno.
24. El método de la reivindicación 23, en donde el compuesto es un modulador selectivo de receptor de estrógeno.
25. El método de la reivindicación 23, en donde el compuesto disminuye la producción de TNF- α en por lo menos alrededor de 20%.

3/62

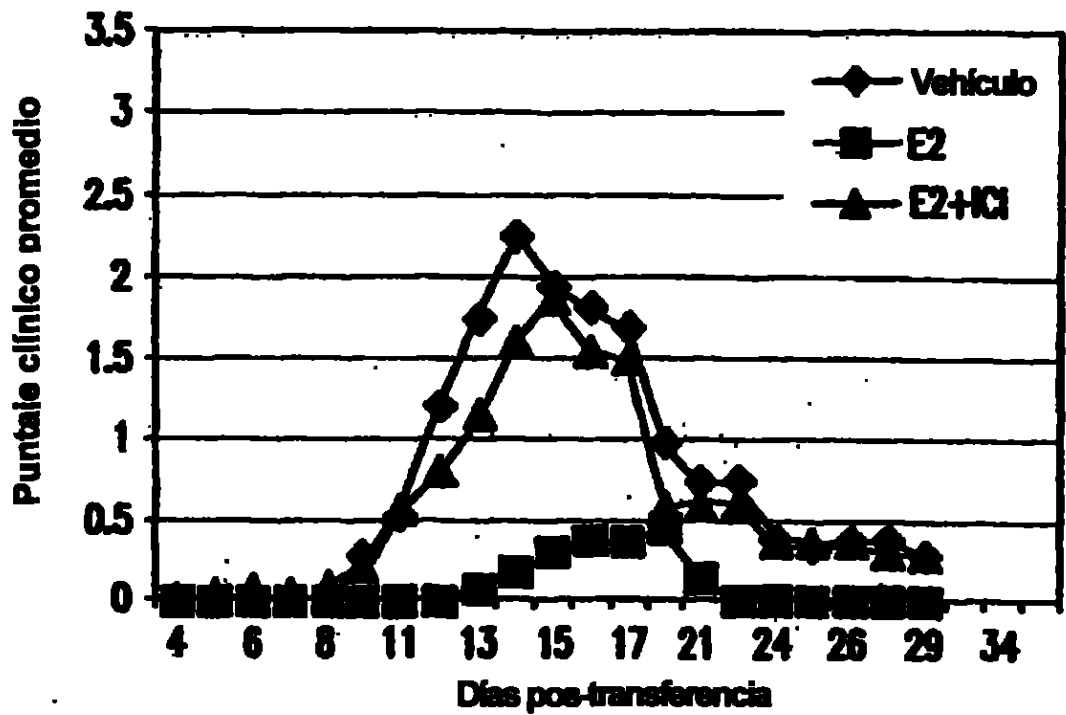


FIG. 1A

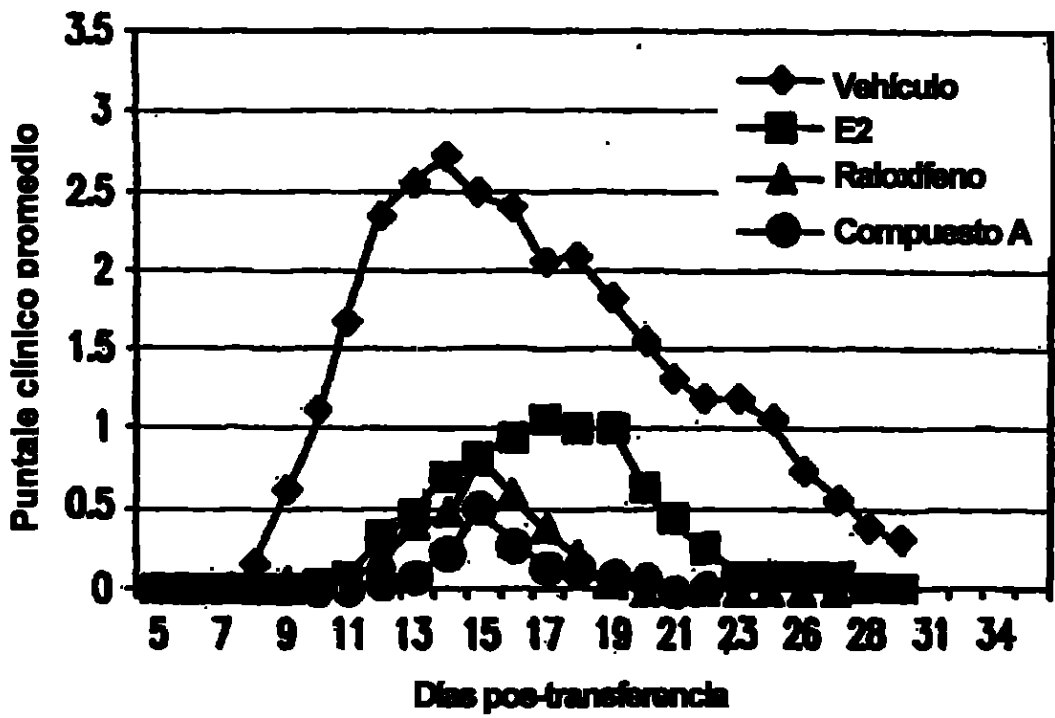


FIG. 1B

[Handwritten signature]
63

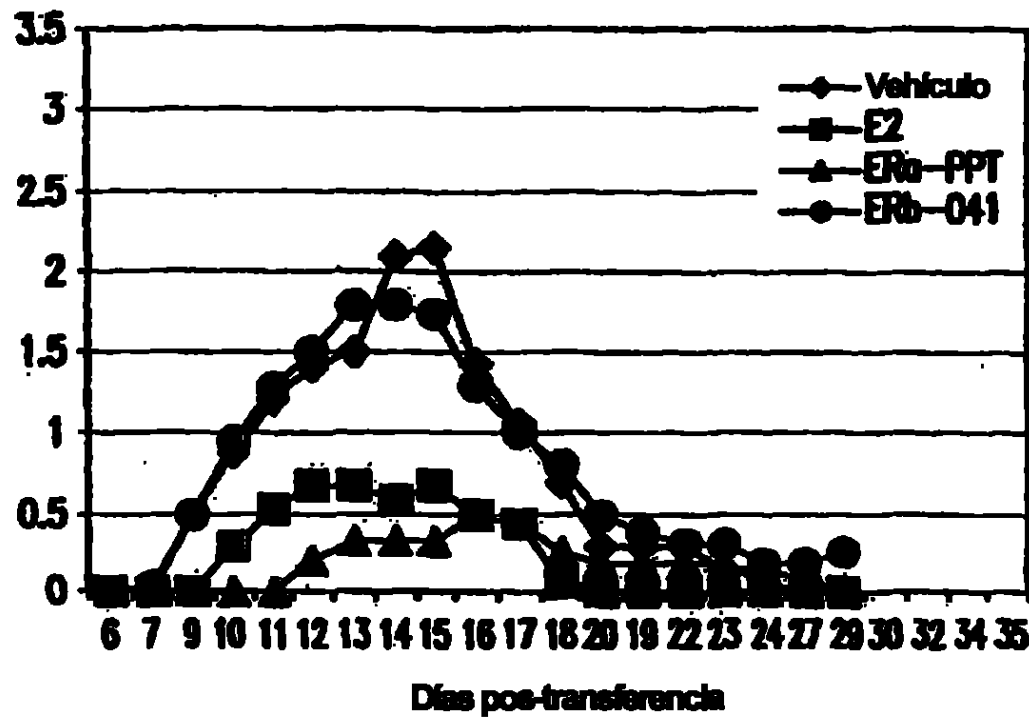


FIG. 2

64

3 / 7

TNF- α

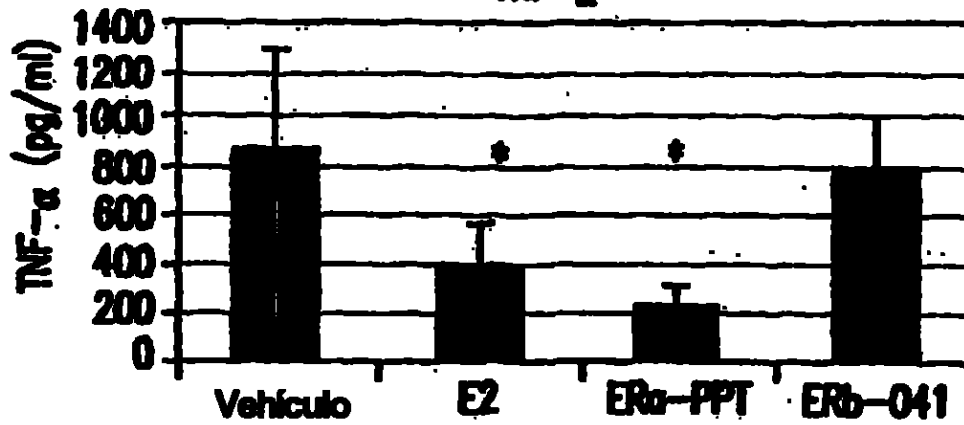


FIG.3A

IL-4

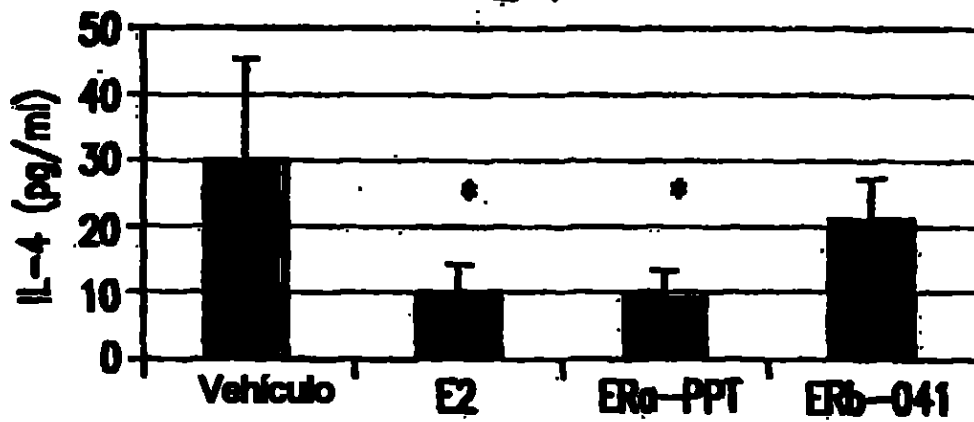


FIG.3B

IFN- γ

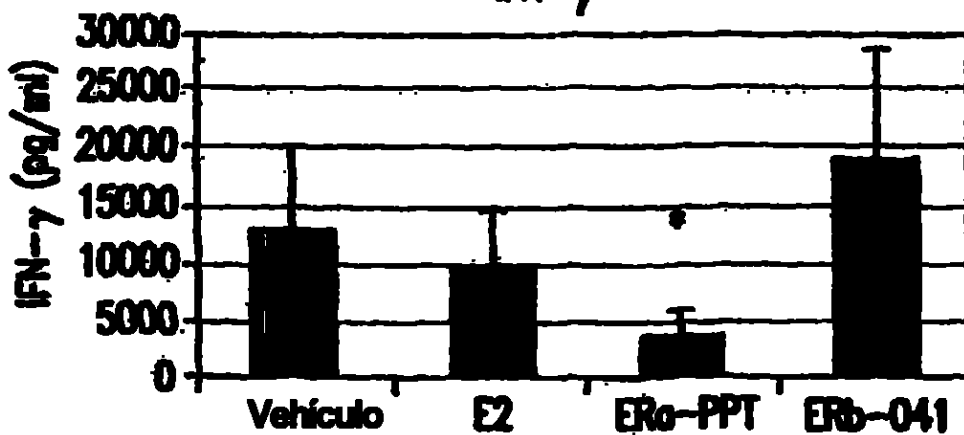


FIG.3C

Handwritten signature and number 65

4 / 7

IL-5

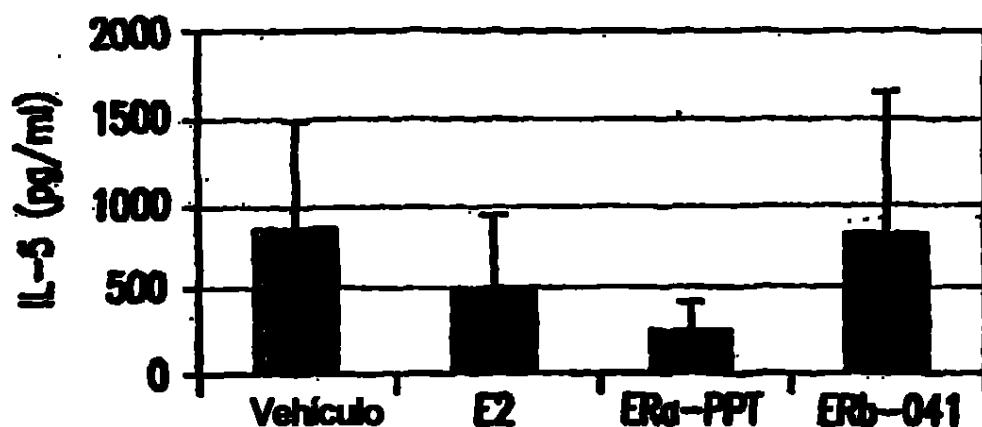


FIG.3D

IL-2

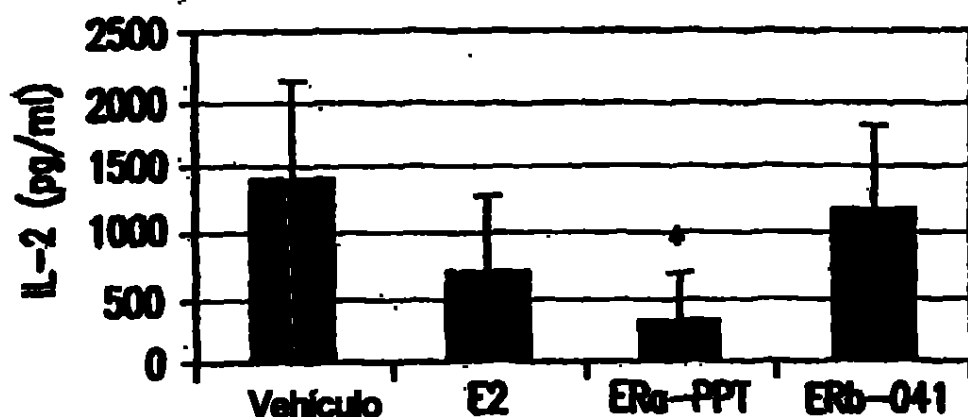
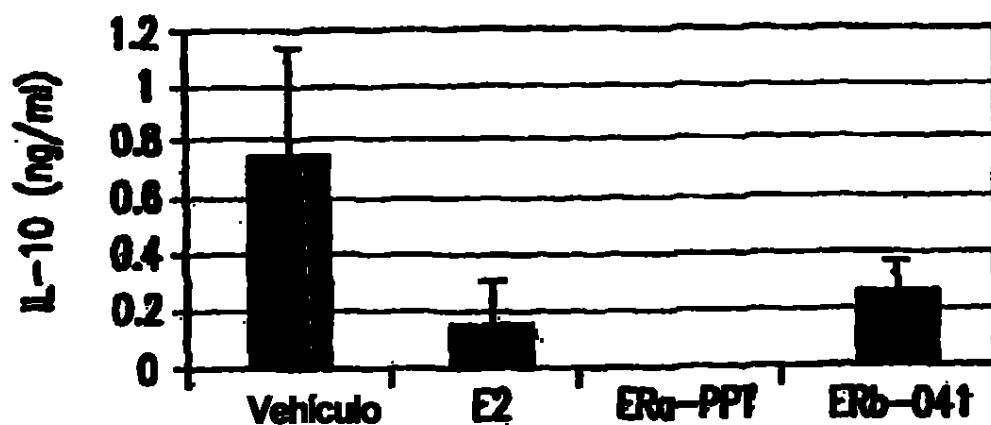


FIG.3E

IL-10



Handwritten signature and date 6/6

% de células CD4+ que se dividieron

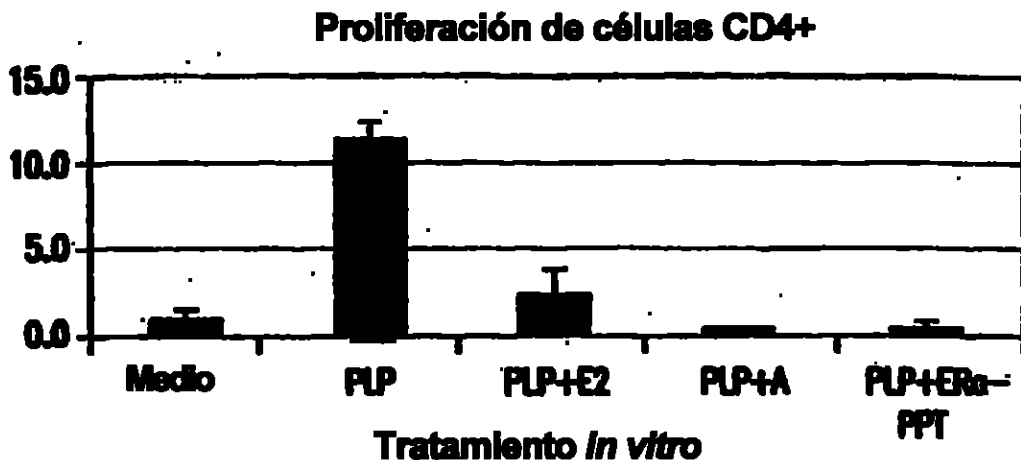


FIG.4A

% de células CD4- que se dividieron

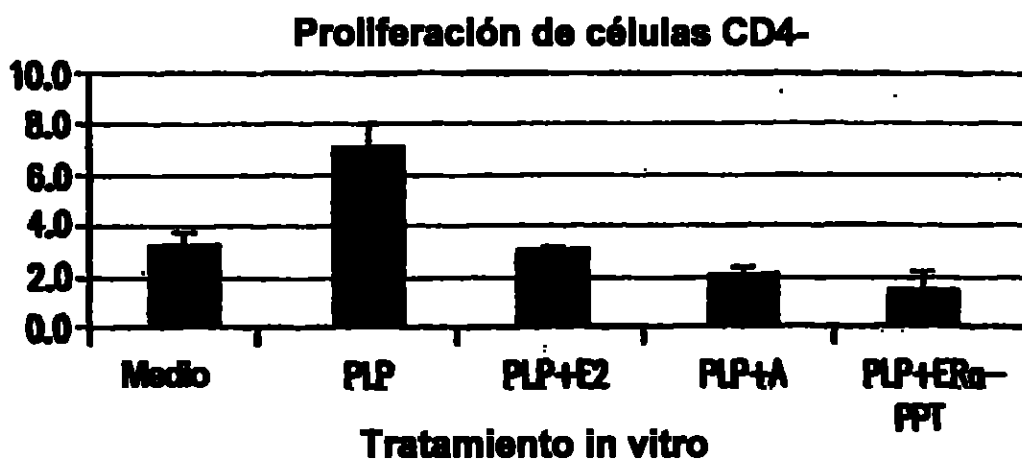
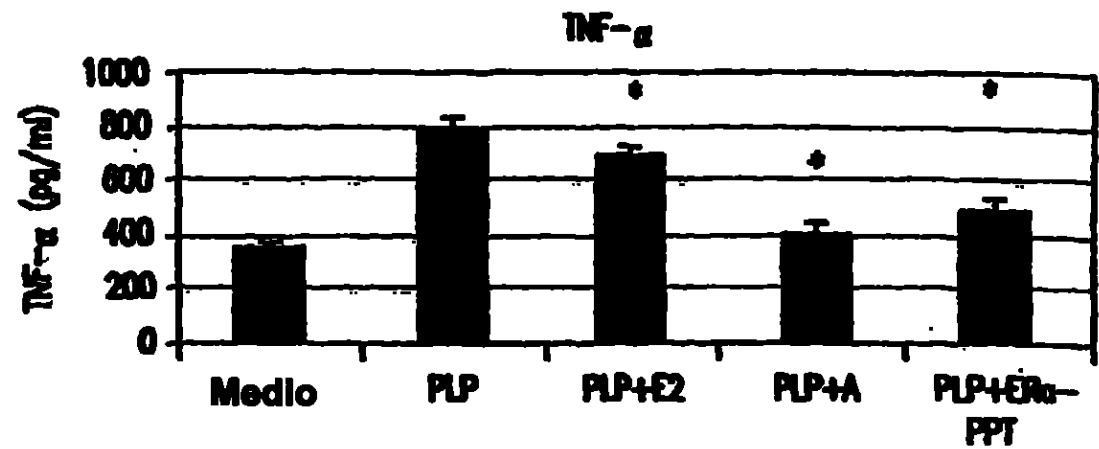


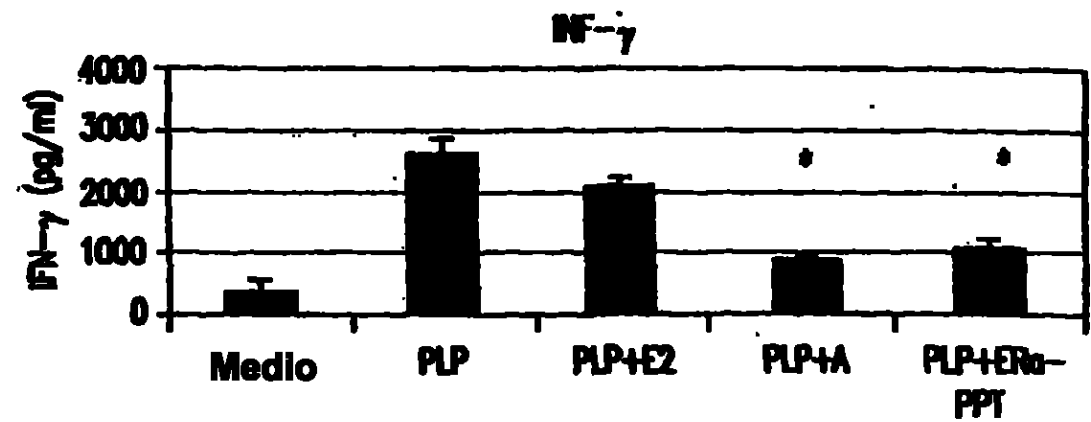
FIG.4B

67



Tratamiento *in vitro*

FIG.5A

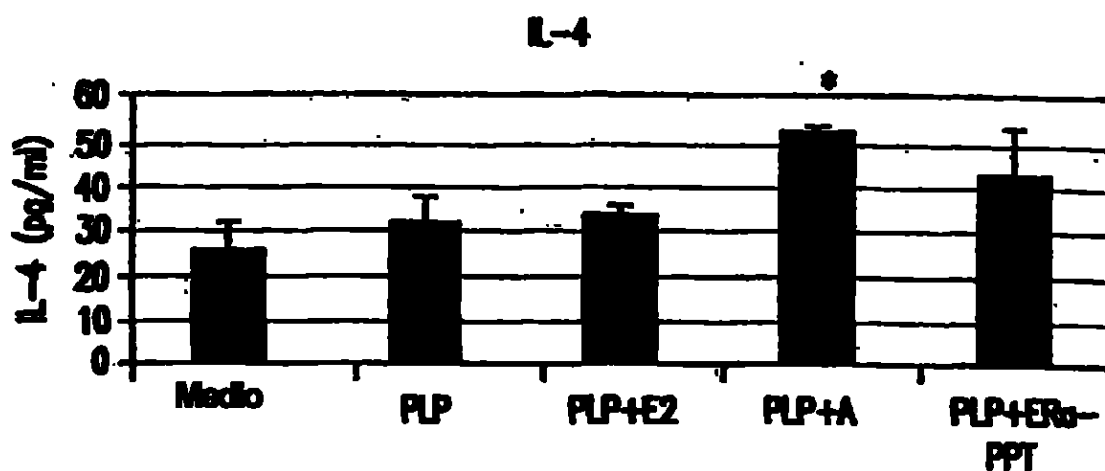


Tratamiento *in vitro*

FIG.5B

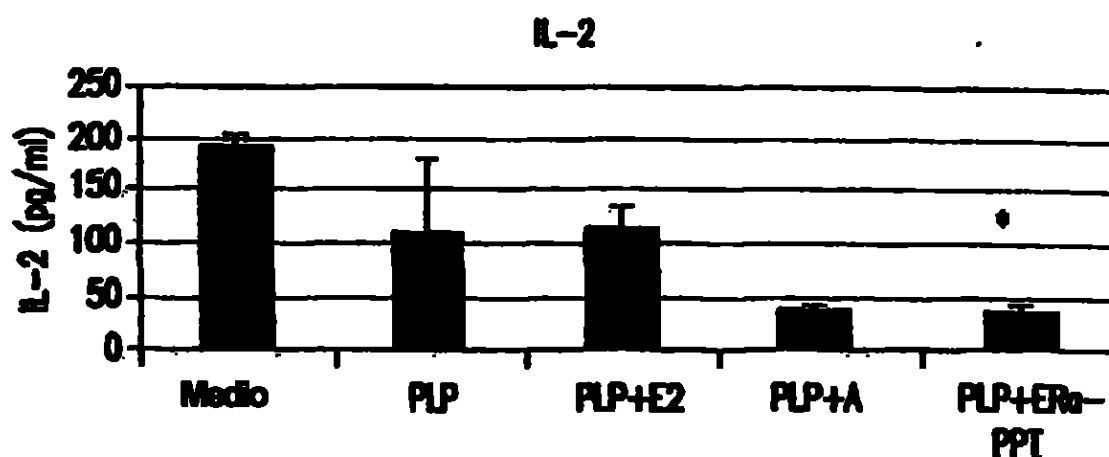
Handwritten: 6/6

7 / 7



Tratamiento *in vitro*

FIG.5C



Tratamiento *in vitro*

FIG.5D

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/US2004/000037

69

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 A61K31/00 A61K31/4535 A61K31/138 A61K31/40 A61K31/55 A61P37/00 A61P37/06		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 A61K A61P		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, PAJ, CHEM ABS Data, MEDLINE, BIOSIS, EMBASE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 01/85154 A (UNIV OREGON HEALTH SCIENCES ;OFFNER HALINA (US); US GOVERNMENT (US) 15 November 2001 (2001-11-15) abstract page 6, line 6 - page 7, line 30 page 12, line 11 - page 13, line 7 claims; examples I,IV -----	1-21,23, 25
X	WO 02/085374 A (UNIV CALIFORNIA ;VOSKUHL RHONDA R (US)) 31 October 2002 (2002-10-31) abstract page 8, paragraph 34 - paragraph 35 claims; example 1 ----- -/--	1-21,23
☒ Further documents are listed in the continuation of box C. ☒ Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document not published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document relating to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "A" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 2 July 2004		Date of mailing of the international search report -3 09 2004
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentkan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel (+31-70) 340-2040, Tx 31 651 apo nl, Fax (+31-70) 340-3016		Authorized officer Hoff, P

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2004/000937

20

Box II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Although claims 1-25 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this International application, as follows:

see additional sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
1-25 (partially)

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

2/21

International Application No. PCT/ US2004/ 000037

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box II.1

Although claims 1-25 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/US2004/000037

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0664125	A	NO 944925 A NZ 270184 A US 5700010 A ZA 9410095 A	22-06-1995 29-07-1999 13-01-1998 19-06-1996
EP 0668075	A 23-08-1995	US 5492927 A AU 701606 B2 AU 8153994 A CA 2138457 A1 CN 1108095 A CZ 9403228 A3 EP 0668075 A2 HU 71336 A2 IL 112029 A JP 7215863 A NO 944911 A NZ 270187 A RU 2146520 C1 US 5525624 A ZA 9410085 A	20-02-1996 04-02-1999 29-06-1995 22-06-1995 13-09-1995 13-09-1995 23-08-1995 28-11-1995 28-10-1999 15-08-1995 22-06-1995 27-07-1997 20-03-2000 11-06-1996 19-06-1996
EP 0966965	A 29-12-1999	AU 753035 B2 AU 4819299 A BR 9911224 A CA 2333384 A1 CN 1305342 T EP 0966965 A1 HR 20000860 A1 HU 0102383 A2 JP 2002518295 T NO 20006086 A PL 344841 A1 SK 18802000 A3 TR 200003713 T2 WO 9965306 A1 US 6353003 B1 ZA 200005884 A	03-10-2002 05-01-2000 20-02-2001 23-12-1999 25-07-2001 29-12-1999 31-10-2001 28-01-2002 25-06-2002 30-11-2000 19-11-2001 11-09-2001 20-04-2001 23-12-1999 05-03-2002 22-10-2001
EP 0747052	A 11-12-1996	US 6545027 B1 AU 6175596 A BR 9608585 A CA 2223092 A1 EP 0747052 A2 JP 11507645 T WO 9640137 A1	08-04-2003 30-12-1996 05-01-1999 19-12-1996 11-12-1996 06-07-1999 19-12-1996

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

From the INTERNATIONAL BUREAU

NOTIFICATION CONCERNING
SUBMISSION OR TRANSMITTAL
OF PRIORITY DOCUMENT

(PCT Administrative Instructions, Section 411)

To:

WEBSTER, Darryl, L.
Wyeth
Patent Law Department
Five Giralda Farms
Madison, NJ 07940
United States of America

MAY 04 2004

Date of mailing (day/month/year)
22 April 2004 (22.04.2004)Applicant's or agent's file reference
AM101281

IMPORTANT NOTIFICATION

International application No.
PCT/US2004/000037International filing date (day/month/year)
05 January 2004 (05.01.2004)International publication date (day/month/year)
Not yet publishedPriority date (day/month/year)
06 January 2003 (06.01.2003)

Applicant

WYETH et al

1. By means of this Form, which replaces any previously issued notification concerning submission or transmittal of priority documents, the applicant is hereby notified of the date of receipt by the International Bureau of the priority document(s) relating to all earlier application(s) whose priority is claimed. Unless otherwise indicated by the letters "NR", in the right-hand column or by an asterisk appearing next to a date of receipt, the priority document concerned was submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b).
2. (If applicable) The letters "NR" appearing in the right-hand column denote a priority document which, on the date of mailing of this Form, had not yet been received by the International Bureau under Rule 17.1(a) or (b). Where, under Rule 17.1(a), the priority document must be submitted by the applicant to the receiving Office or the International Bureau, but the applicant fails to submit the priority document within the applicable time limit under that Rule, the attention of the applicant is directed to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.
3. (If applicable) An asterisk(*) appearing next to a date of receipt, in the right-hand column, denotes a priority document submitted or transmitted to the International Bureau but not in compliance with Rule 17.1(a) or (b) (the priority document was received after the time limit prescribed in Rule 17.1(a) or the request to prepare and transmit the priority document was submitted to the receiving Office after the applicable time limit under Rule 17.1(b)). Even though the priority document was not furnished in compliance with Rule 17.1(a) or (b), the International Bureau will nevertheless transmit a copy of the document to the designated Offices, for their consideration. In case such a copy is not accepted by the designated Office as priority document, Rule 17.1(c) provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

Priority date	Priority application No.	Country or regional Office or PCT receiving Office	Date of receipt of priority document
06 Janu 2003 (06.01.2003)	60/438,123	US	16 April 2004 (16.04.2004)

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Authorized officer

Sylvie SOBEZYNSKI

Facsimile No. (41-22) 338.89.65

Telephone No. (41-22) 338 8087

Form PCT/IB/304 (January 2004)

008217139

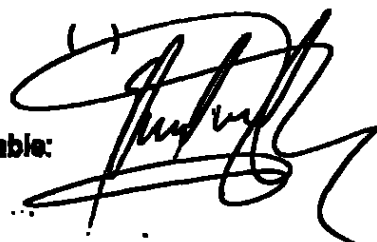
CC-TAPLOW

75
74

REQUISITOS NECESARIOS PARA PRESENTACION Y AGILIZACION DEL TRAMITE

	USUARIO	RADICADOR
PATENTE DE INVENCION	()	()
MODELO DE UTILIDAD	()	()
Indicación de que se solicita la concesión de una patente.	()	()
Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud.	()	()
Descripción de la invención.	()	()
Dibujos de ser estos pertinentes.	()	()
Comprobante de pago de las tasas establecidas.	()	()
COMPLETA ()	INCOMPLETA ()	()
DISEÑO INDUSTRIAL ()		
Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial	()	()
Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud.	()	()
Representación gráfica o fotográfica del Diseño Industrial o muestra del Material que incorpora el diseño.	()	()
Comprobante de pago de las tasas establecidas	()	()
COMPLETA ()	INCOMPLETA ()	()
ESQUEMA DE TRAZADO ()		
Indicación de que solicita el registro de un Esquema de trazado.	()	()
Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud.	()	()
Representación gráfica del esquema de trazado	()	()
Comprobante de pago de las tasas establecidas.	()	()
COMPLETA ()	INCOMPLETA ()	()

Firma Responsable:



Fecha:

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO

Radicación: 05070253 00000000

Folios: 74

Fecha (AMB): 2005-07-15 17:32:24

Trámite: 011 PCT-PATENT 379 FASE INCI 411 PRESENTAC

Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

76
75

REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y C MERCI

Bogotá,
2020

Doctor(a)
CADENA SARMIENTO JUAN PABLO

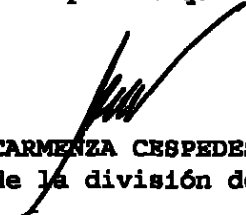
REFERENCIA	Radicación No.	5 70253
	Solicitud internacional	US2004/000037
	Fecha inicio fase nacional	06/08/2005
	Trámite	11
	Evento	379
	Actuación	430
	Oficio No.	8913

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

1. Si fuere el caso, el solicitante debe adjuntar la traducción de los anexos del reporte de examen preliminar internacional (Art. 36.2.b) del tratado PCT.
2. La solicitud no contiene la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante. (Art. 26-k) Decisión 486.
3. La solicitud no contiene el poder debidamente otorgado, con el lleno de los requisitos exigidos por los artículos 63 y subsiguientes del Código de Procedimiento Civil. Adicionalmente, deberá presentar el documento que acredita la existencia y representación legal de la sociedad solicitante, cuando ésta fuere persona jurídica.

En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Unica No.10 de 2001.


ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL
Jefe de la división de Nuevas Creaciones

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de
fecha 30 SET. 2005
adpal