



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 356 371**

51 Int. Cl.:
A61K 45/06 (2006.01)
A61K 31/557 (2006.01)
A61P 37/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **02726291 .4**
96 Fecha de presentación : **10.05.2002**
97 Número de publicación de la solicitud: **1385550**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **04.02.2004**

54 Título: **Medicamentos terapéuticos para inducir tolerancia.**

30 Prioridad: **11.05.2001 GB 0111497**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
07.04.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
07.04.2011

73 Titular/es: **MEDICAL RESEARCH COUNCIL**
20 Park Crescent
London W1B 1AI, GB

72 Inventor/es: **Kelly, Rodney, William**

74 Agente: **Urizar Anasagasti, José Antonio**

ES 2 356 371 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Medicamentos terapéuticos para inducir tolerancia.

5 La presente invención trata de medicamentos terapéuticos y usos; en particular de los medicamentos que inducen la tolerancia hacia un antígeno en un paciente.

10 La inmunidad de un organismo hacia un antígeno surge como consecuencia de un primer encuentro con el antígeno y la subsiguiente producción de las moléculas de inmunoglobina, por ejemplo, anticuerpos, capaces de aglutinar selectivamente ese antígeno. Además, la respuesta inmune está controlada por células T que pueden ser específicas del antígeno. La inmunidad permite la rápida captación, usualmente por estimulación a una respuesta inflamatoria, de las células que pueden desechar al antígeno extraño. Bajo ciertas circunstancias, el sistema de respuesta inmune hacia los antígenos no se produce debido a los mecanismos llamados de "tolerancia". Por ejemplo, un sistema inmune puede normalmente discriminar antígenos extraños y constituyentes del propio organismo, debido al mecanismo a través del cual todos los linfocitos B que podrían producir potencialmente anticuerpos a los elementos constituyentes de su propio organismo ("antígenos propios") son destruidos durante el desarrollo, eliminan de por ello la capacidad del organismo para producir anticuerpos directos a un antígeno propio.

20 La tolerancia es probablemente un proceso activo. Esto significa que la tolerancia periférica se adquiere donde un antígeno se presenta a una célula T en un medio particular (ej, altos niveles de IL-10 y bajos niveles de IL-12). Las células T entonces circulan y cuando se encuentran con ese antígeno específico otra vez, no montan una respuesta inmune (células T anérgicas) o aumentan una respuesta acallada (células T regulatorias). Un papel para las células T regulatorias ha sido propuesto en la tolerancia. Las células T regulatorias están programadas por el medio de la célula que presenta el antígeno para reaccionar con su antígeno cognado mediante la liberación de citoquinas "reguladores-bajos". Las primeras células regulatorias tales descritas fueron inducidas por IL-10 (Groux *et al.*, 1997, Nature 389:737-742).

30 Donde la tolerancia falla, el organismo podría producir una respuesta celular inmune (incluyendo células T citotóxicas) a los constituyentes normales del organismo, produciendo una "enfermedad autoinmune". Ejemplos de enfermedades autoinmunes incluyen lupus eritematoso sistémico (SLE), esclerosis múltiple (SE) y enfermedad de Hashimoto.

35 En algunas circunstancias, incluso una respuesta normal del sistema inmune hacia los antígenos extraños pueden producir resultados indeseables, tal como en el caso del tejido o injerto de órgano o trasplante, donde el sistema inmune del tejido o del órgano receptor reconoce injerto del tejido u órgano o el trasplante como extraño y actúa rechazándolo.

40 Uno de los inconvenientes de los métodos existentes en el tratamiento o las condiciones o las enfermedades inmunes o inflamatorias, sin embargo, es el rango limitado de opciones y su inadecuación terapéutica. Por ejemplo, los glucocorticosteroides usados para el tratamiento de la enfermedad respiratoria tienen efectos tóxicos en muchos pacientes, y las alternativas como la ciclosporina A o el interferon γ son de alto riesgo, caras y generalmente insatisfactorias.

45 Inesperadamente, el inventor ha encontrado que hay un efecto de sinergia entre una prostaglandina que estimula la producción de cAMP en macrófagos y un inhibidor selectivo tipo IV de la fosfodiesterasa (PDE) en la liberación de interleucina - 10 (IL-10) de las células del sistema inmune. Por otra parte, el inventor ha encontrado que hay una marcada estimulación de la IL-10 e inhibición de la interleucina-12 (IL-12) en las células del sistema inmune cuando una prostaglandina que estimula la producción de cAMP en los macrófagos y un inhibidor selectivo tipo IV de la PDE se utilizan en combinación. En presencia de un inhibidor selectivo tipo IV de la PDE, la estimulación de la IL-10 por ambos PGE y 19-hidroxi PGE se incrementó notablemente.

50 Los inhibidores selectivos tipo IV de la PDE tales como Rolipram son conocidos por aumentar los niveles del cAMP y de IL-10 en monocitos/macrófagos estimulados con la capa bacterial del lipopolisacárido (LPS) (Strassman *et al.*, 1994 J. Exp. Med. 180: 2365-70; Kraan *et al.*, 1995 J. Exp. Med. 181: 775-9; Kambayashi *et al.*, 1995 J. Immunol. 155: 4909-16). Inesperadamente, el inventor ha encontrado que hay un efecto sinérgico entre una prostaglandina que estimula la producción de cAMP en los macrófagos y un inhibidor selectivo tipo IV de la PDE sobre la liberación de IL-10 a partir de células del sistema inmunológico, que resulta en un gran aumento en la liberación de IL-10.

60 El inventor también muestra un aumento en la actividad de la PDE que se deriva de la aplicación tanto de PGE y de 19-hidroxi PGE. Se trata de una retroalimentación negativa directa para reducir el efecto del estímulo. El uso de un PGE y un inhibidor efectivo tipo IV de la PDE aumenta el mensaje de PDE aún más, pero entonces la fosfodiesterasa sintetizada es anulada por la presencia del inhibidor.

65 En las enfermedades derivadas de una respuesta inmune anormal o no deseada, a menudo hay una deficiencia en IL-10 y/o un aumento de la IL-12. Este desequilibrio en la IL-10 puede ser perjudicial para el desarrollo de células T cooperadoras útiles, en particular las células T reguladoras; un predominio de las células T cooperadoras tipo 1 sobre las tipo 2 se cree que es característico de enfermedad autoinmune. Por lo tanto, la estimulación de la producción de IL-10 y la inhibición de la IL-12 se cree que induce un entorno de tolerancia para la activación de células T.

El inventor propone ahora el uso de un tipo de inhibidor de tipo IV selectivo de la PDE en combinación con una prostaglandina o de agonista de la misma que estimula la producción de cAMP en los macrófagos en la inducción de la tolerancia, o la tolerancia a un antígeno en un paciente.

5 Además, la combinación de un inhibidor tipo IV selectivo de la PDE y una prostaglandina o agonista de la misma que estimula la producción de cAMP en los macrófagos es considerada por el inventor que logra el efecto deseable de reducir la cantidad de prostaglandina o agonista de la misma que estimula la producción de cAMP en los macrófagos o inhibidor PDE necesario para lograr un grado útil de un beneficio terapéutico, y/o reducir los efectos secundarios de la administración de prostaglandina o agonista de la misma que estimula la producción de cAMP en los
10 macrófagos.

Por lo que el inventor es consciente, no ha habido ninguna sugerencia de que una combinación de una prostaglandina o agonista de la misma que estimula la producción de cAMP en los macrófagos y un tipo de inhibidor selectivo tipo IV de la PDE podría utilizarse para estimular la producción de IL-10, y no ha habido ninguna sugerencia de que
15 un tratamiento con esta combinación para estimular la IL-10. Por otra parte, nunca ha habido ninguna sugerencia de que esta combinación puede ser utilizada para inhibir la producción de IL-12, o para inducir un ambiente de tolerancia para la activación de células T, o para inducir la tolerancia a un antígeno en un paciente.

El uso de una combinación de una prostaglandina y un inhibidor de PDE para aliviar los síntomas de la soriasis y trastornos proliferativos relacionados con la piel, ha sido sugerido en U.S. 4.034.087, sin facilitar realmente ningún ejemplo de uso de una prostaglandina y un inhibidor de PDE para tratarlas. Tal aplicación de un inhibidor de la PDE y PGE es antiinflamatoria más que inmunomoduladora. Moriuchi *et al.*, 1998 Arthritis and Rheumatism 41
20 (9) S161 revela la uso de la pentoxifilina rolipram o en combinación con la PGE1 en el tratamiento de la artritis reumatoide.

El receptor principal de la prostaglandina E2 (PGE2) son los subtipos EP2 y EP4, sin embargo, otros receptores de sub-tipos existen, nombrados como, EP1 y EP3. Los receptores EP2 y EP4 se acoplan con adenilciclasa y usan cAMP elevado como sistema mensajero. Los niveles de cAMP en los tejidos se rigen tanto por la síntesis y catabolismo de la PDE. PDE puede ser bloqueado por inhibidores específicos. El inventor cree, pero sin estar relacionado
30 por ninguna teoría, que la administración de inhibidor selectivo tipo IV de la PDE aumentará el efecto de una prostaglandina o agonista de la misma que estimula la producción cAMP en los macrófagos en la inducción de tolerancia a un antígeno en un paciente. Por lo tanto, el inventor cree, sin estar vinculado a cualquier teoría, que el efecto de una prostaglandina o agonista de la misma que estimula la producción de cAMP en macrófagos (como PGE) que actúa en sus receptores EP2 y EP4 debe estimular la cAMP y la adición del inhibidor selectivo tipo IV de la PDE
35 proporciona una acción sinérgica en monocitos y macrófagos resultando en una reducción de la respuesta inmune que es mayor que el efecto de la suma de la misma cantidad de cualquiera de la prostaglandina o agonista de la misma que estimula la producción de cAMP en los macrófagos o en el inhibidor selectivo tipo IV de la PDE administrado solo.

40 Un primer aspecto de la invención proporciona el uso de una prostaglandina o agonista de la misma, que estimula la producción de la cAMP en los macrófagos o de un inhibidor selectivo tipo IV de la PDE, o una combinación de los mismos en la fabricación de un medicamento para inducir la tolerancia a un antígeno en un paciente, según lo establecido en las reivindicaciones 1 a 3.

45 En inducir la tolerancia a un antígeno, nosotros incluimos el significado de que el sistema inmunológico del paciente puede llegar a ser tolerante de un antígeno ante el que era intolerante antes, o el sistema inmunológico puede montar una respuesta reducida o nula respuesta (es decir, una respuesta no detectable) a un estímulo inmunológico, como un antígeno.

50 Un efecto del tratamiento de un paciente con una prostaglandina o un agonista de la misma que estimula la producción de cAMP en los macrófagos y un inhibidor selectivo tipo IV de la PDB puede ser el facilitar o mejorar de la tolerancia a un antígeno. El antígeno puede ser ajeno al paciente, tal como un antígeno que interviene en el síndrome de intestino irritable.

55 Se apreciará que la inducción de la tolerancia al antígeno en un paciente por administración de prostaglandina o agonista de la misma que estimula la producción de cAMP en macrófagos y el inhibidor selectivo tipo IV de PDE podrían conducir a supresión del antígeno específico inmune. Por lo tanto, la invención incluye la fabricación de un medicamento para inducir la tolerancia a un antígeno en un paciente para crear una supresión inmune en el paciente, comprendiendo una prostaglandina o agonista de la misma que estimula la producción de cAMP en macrófagos o un
60 inhibidor selectivo tipo IV de PDE o combinación de los mismos. Tal estado de supresión inmune es caracterizado por el aumento del umbral de la respuesta inmune mediada por célula en cualquier estímulo antigénico.

Por lo tanto, se verá que la invención también proporciona el uso de la combinación de una prostaglandina o agonista de la misma que estimula la producción de cAMP en los macrófagos y un inhibidor de la PDE en la fabricación
65 de un inmunosupresor.

La invención incluye por ello la fabricación de los medicamentos para la supresión el sistema inmune en un paciente. Por "supresión" nosotros incluimos el significado de que la respuesta del sistema inmune está alterada de

ES 2 356 371 T3

forma tal que el sistema inmune provoca una respuesta reducida o no presenta respuesta ante un estímulo inmune. De acuerdo con la invención, se incluye la fabricación del medicamento para inducir tolerancia al antígeno en el paciente que conduce a una mejora de o una respuesta inmune no deseada o aberrante en el paciente.

5 El medicamento fabricado relacionado con la invención también incluye aquellos que inducen la tolerancia a un antígeno en un paciente para el tratamiento de enfermedades o condiciones donde hay una respuesta inmune no deseable.

10 La invención incluye la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad autoinmune en un paciente, que comprende una prostaglandina o agonista de la misma que estimula la producción de cAMP en los macrófagos o un inhibidor selectivo tipo IV de la PDE o combinaciones de ellos. Estas enfermedades autoinmunes incluyen: mixedema primario, tirotoxicosis, anemia perniciosa, enfermedades autoinmunes gástricas atroficas, enfermedad de Addison, diabetes mellitus insulino-dependiente (IDDM), síndrome de Goodpasture, la miastenia gravis, oftalmia simpática, MS, anemia hemolítica autoinmune, leucopenia idiopática, la colitis ulcerosa, dermatomiositis, esclerodermia, enfermedad mixta del tejido conectivo, síndrome de intestino irritable, SLE, enfermedad de Hashimoto, 15 la tiroiditis, enfermedad de Behcet, enfermedad celíaca/dermatitis herpetiforme, y enfermedad desmielinizante.

20 La invención incluye la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad autoinmune, con la excepción de la artritis reumatoide, en un paciente, que comprende una prostaglandina o agonista de la misma que estimula la producción de cAMP en los macrófagos o un tipo de inhibidor selectivo de tipo IV de la PDE o una combinación de ambos.

25 El medicamento se cree que es capaz de combatir la respuesta indeseable autoinmune directamente como el tratamiento de los síntomas con un papel pro-inflamatorio mediante las células T.

30 Sin estar sujeto a la teoría, el inventor cree que los medicamentos de la presente invención puede afectar a la programación de las células T para que sean reguladoras o de supresión, más que las células T pro-inflamatorias. Cuando una célula T se encuentra con un antígeno, en presencia de una prostaglandina que estimula la producción de cAMP en los macrófagos y el inhibidor selectivo tipo IV de la PDE, se liberará una citoquina supresiva como IL-10 y no una citoquina inflamatoria como la IL-12. El tratamiento con una prostaglandina que estimula la producción de cAMP en los macrófagos y el inhibidor selectivo tipo IV selectivo de la PDE es en lo que se cree para evitar o minimizar la respuesta inflamatoria en desarrollo. Así, el tratamiento con una prostaglandina que estimula la producción de cAMP en los macrófagos y el inhibidor selectivo tipo IV de la PDE se puede utilizar profilácticamente, o cuando los primeros 35 síntomas de, por ejemplo, una enfermedad autoinmune, aparecen. Además, debido a que las células T están presentes en todo el cuerpo, pueden ser programadas o estar preparadas en un sitio remoto de su localización final de la acción. Del mismo modo, a diferencia de otras formas de tratamiento de ciertas enfermedades autoinmunes, el medicamento puede ser útil en la prevención de la respuesta inflamatoria antes de su comienzo. Así, el medicamento puede ser útil en el tratamiento de los pacientes que, por ejemplo, debido a su edad o los factores genéticos, están predispuestos a una enfermedad autoinmune, antes de cualquier síntoma inflamatorio mostrado.

40 Así pues, la invención también incluye la fabricación de un medicamento para inducir la tolerancia a un antígeno en una paciente para inhibir o disminuir una respuesta inmune o inflamatoria en el paciente. Por “la inhibición o disminución” se incluyen el aumento del nivel de IL-10, y/o disminución del nivel de IL-12 que conduce a un aumento en la respuesta de Th2 y una disminución en la respuesta Th1.

45 La invención también incluye la fabricación de un medicamento para inducir la tolerancia a un antígeno en un paciente que conduce a la mejoría de una respuesta inflamatoria desviada o no deseada en el paciente. La respuesta inflamatoria desviada o no deseada no está asociada con la psoriasis, o un trastorno proliferativo de la piel relacionado.

50 Por “respuesta inflamatoria o desviada o inmune no deseada” se incluyen las enfermedades o condiciones que causan la presencia de una inflamación visible o medida dentro de un tejido en un individuo o paciente. Por ejemplo, el tejido que forma parte de un aloinjerto o los tejidos de un receptor que ha recibido un aloinjerto, o el sistema nervioso central de una persona con MS, o insulinitis en un paciente con diabetes tipo 1.

55 La invención incluye la fabricación de un medicamento para inducir la tolerancia a un antígeno en un paciente suprimiendo así una respuesta inmune anormal o no deseada o inflamatoria en el paciente, tales como una respuesta relacionada con el rechazo del trasplante.

60 La invención incluye por lo tanto la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad o condición asociada con el rechazo del trasplante, tales como un injerto contra la enfermedad del receptor o el receptor contra la enfermedad del injerto, por ejemplo, en el órgano o trasplante de piel. En estos casos, una inhibición o disminución de una respuesta inmune o inflamatoria puede ser requerida. Así, la invención incluye la lucha contra el rechazo del trasplante.

65 Las enfermedades o condiciones en las que existe una respuesta inmune anormal o no deseada o inflamatoria también puede incluir alergias, en donde la respuesta no deseada es una respuesta alérgica. En tal condición o enfermedad, el antígeno que tolera es inducido para ser un alérgeno.

ES 2 356 371 T3

Así, la invención incluye la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad alérgica o enfermedad en un paciente, que comprende una prostaglandina o agonista de la misma que estimula la producción de cAMP en los macrófagos o de un inhibidor selectivo tipo IV de la PDE o una combinación de ambos.

5 La alergia puede ser cualquier alergia, como la alergia a la caspa de gato, ácaros del polvo, hierba o polen de los árboles, hongos, mohos, alimentos, picaduras de insectos, etc.

En una realización preferida, la condición alérgica o la enfermedad es la alergia al asma, y el PG que estimula la producción de cAMP en los macrófagos y el inhibidor selectivo tipo IV de la PDE es preferiblemente administrado a los pulmones o al árbol bronquial, preferentemente a través de un aerosol. Esta incorporación puede ser especialmente ventajosa como en algunas prostaglandinas 19-hidroxi análogas en las que funcionan como broncodilatadoras, tales como se describe en la patente US Patente No. 4.127.612. La razón por la PG no se utiliza ampliamente en el tratamiento del asma es que hacen que el paciente tosa. La administración de un inhibidor selectivo tipo IV de PDE permitiría a la PG que estimula la producción de cAMP en los macrófagos administrarse a una concentración inferior proporcionando así los beneficios terapéuticos minimizando al mismo tiempo los efectos secundarios.

Así, la invención incluye el uso de un PGE o 19-hidroxi PGE y un inhibidor selectivo tipo IV de la PDE en la fabricación de un medicamento para el tratamiento por inhalación del asma debido a la alergia.

20 Sea o no un paciente en particular que espera beneficiarse del tratamiento determinado por el médico.

La prostaglandina o agonista de la misma que estimula la producción de cAMP en los macrófagos y el inhibidor selectivo tipo IV de PDE podría ser administrado en cualquier orden. Preferentemente, son co-administrados. Sin embargo, podrían ser administrados de modo que el inhibidor selectivo tipo IV de PDE puede surgir efecto en el acceso de las células antes de la administración de la prostaglandina, o agonista de la misma que estimula la producción de cAMP en los macrófagos. La prostaglandina o agonista de la misma que estimula la producción de cAMP en los macrófagos y el inhibidor selectivo tipo IV de PDE pueden ser administrados sustancialmente simultáneamente, por ejemplo, en la misma composición. El orden y el tiempo de administración pueden ser determinados por el médico utilizando el conocimiento de las propiedades de la prostaglandina que estimula la producción de cAMP en los macrófagos y el inhibidor selectivo de tipo IV de la PDE. Por ejemplo, la prostaglandina que estimula la producción de cAMP en los macrófagos (como la misoprostol) puede estar activa durante un período de 4 horas tras la administración. El inhibidor selectivo tipo IV de la PDE puede tomar del orden de 30 minutos para entrar en vigor después de la administración. Así pues, los tiempos adecuados de administración pueden fácilmente concebirse de esta información.

35 Cuando la tolerancia a un antígeno desea ser localizada en un órgano determinado, por ejemplo, la piel o el árbol bronquial y los pulmones, es preferible si la prostaglandina o agonista de la misma que estimula la producción de cAMP en los macrófagos se administra localmente en el sitio de la afección. La prostaglandina o agonista de la misma que estimula la producción de cAMP en los macrófagos puede ser administrada en forma de gel o crema de vapor o spray o en un "parche" en el caso de una enfermedad localizada en la piel, o como una inhalación de vapor o spray donde está el sitio de los pulmones o el árbol bronquial.

Como se describe en detalle más adelante, la prostaglandina o agonista de la misma que estimula la producción de cAMP en los macrófagos puede ser administrada en forma sistemática, como por vía oral. Por ejemplo, la prostaglandina o agonista de la misma que estimula la producción de cAMP en los macrófagos puede ser administrada en el sistema inmunitario de las mucosas, por ejemplo, a través de un supositorio, y se espera que actúe en sitios de la mucosa alejados de donde se ha administrado.

El inhibidor selectivo tipo IV de la PDE puede ser administrado por cualquier vía adecuada. El inhibidor selectivo tipo IV de PDE puede llegar al lugar deseado de la inhibición de la PDE tipo IV, que son típicamente los leucocitos en relación con la presente invención utilizando diferentes vías de administración. Normalmente, en una realización, el inhibidor selectivo tipo IV de la PDE se administra por vía sistemática. Formas adecuadas de la administración sistémica incluyen la vía oral, transcutánea o en supositorios. El inhibidor selectivo tipo IV de la PDE puede ser administrado con el sistema inmunitario de las mucosas, por ejemplo, a través de un supositorio, y se espera que actúe en los sitios de la mucosa remotos a su administración. Los inhibidores selectivos tipo IV de la PDE están disponibles por vía oral, por lo que pueden ser convenientes para la administración del inhibidor selectivo tipo IV de la PDE por vía oral.

También es conveniente administrar el inhibidor selectivo tipo IV de la PDE a nivel local. Así, el inhibidor selectivo tipo IV de la PDE puede ser transportado a nivel local, como en la piel, usando, por ejemplo, un gel o crema de vapor o spray o en un "parche" como se describe anteriormente relacionado con la administración de la prostaglandina o agonista de la misma que estimula la producción de cAMP en los macrófagos. Del mismo modo, en el caso de administración a través del árbol bronquial o pulmonar se puede administrar como un aerosol o vapor.

En realizaciones preferidas de la invención la prostaglandina o agonista de la misma que estimula la producción de cAMP en los macrófagos y el inhibidor selectivo tipo IV de la PDE se pueden combinar en la misma fórmula para el transporte de forma simultánea. Así, la prostaglandina o agonista de la misma que estimula la producción de cAMP en los macrófagos y el inhibidor de PDE pueden combinarse en un gel o una crema o un vapor o un aerosol o "patch" o supositorio y administrarse juntos al paciente.

ES 2 356 371 T3

En una realización preferida, un supositorio que contiene PGE o PGE 19 hidroxilado y un inhibidor selectivo tipo IV de PDE tiene un recubrimiento entérico que sólo libera los agentes activos en el intestino cuando el pH ha aumentado. Este tipo de preparación ha tenido éxito en el transporte de los glucocorticoides en el intestino (ficha de datos Entocort CR).

Alternativamente, el PG que estimula la producción de cAMP en los macrófagos y los inhibidores de la PDE puede ser administrado en una forma de cápsula adecuada o de otro tipo que se ingiera. La cápsula u otro modo, tiene un recubrimiento entérico, que es sensible al pH, conducen a la liberación en un lugar adecuado del tracto gastrointestinal, donde se desea hacerlo, por lo general en el íleon distal o el colon.

Alternativamente, la prostaglandina que estimula la producción de cAMP en los macrófagos y/o el inhibidor selectivo tipo IV de la PDE pueden ser administrados directamente en el colon o el íleon distal a través de un tubo no soluble o sistema de tuberías, tales como las producidas por Egalet.

Un supositorio contiene PGE o PGE 19 hidroxilado y un inhibidor selectivo tipo IV de la PDE que pueden ser eficaces para el tratamiento de la enfermedad inflamatoria intestinal, causada por la respuesta inmune específica hacia el antígeno (Groux *et al*).

La administración de la prostaglandina que estimula la producción de cAMP en los macrófagos y el inhibidor selectivo tipo IV de PDE en un sitio remoto de la mucosa donde se localiza la inflamación, por ejemplo; por co-administración como un supositorio en el tratamiento de la artritis, puede ser especialmente ventajosa en los cambios patológicos del tracto gastrointestinal en el que están asociados con dolencias clínicas en múltiples órganos, incluyendo el sistema musculoesquelético (Alghafeer ER & Sigal, Boletín de Enfermedades reumáticas, 51 (2): http://www.arthritis.org/research/bulletin/vol51no2/51_2printable.asp). Algunas artritis reactivas pueden ser desencadenadas por enfermedades intestinales inflamatorias, y los linfocitos de la mucosa intestinal emigran al tejido articular en la artritis enteropática (Salmi y Jalkanen (2001) J Immunol., 166 (7): 4650-7).

La prostaglandina o agonista de la misma que estimula la producción de cAMP en los macrófagos puede ser cualquier prostaglandina adecuada o agonista de la misma que estimula la producción de cAMP en los macrófagos. Por "prostaglandina o agonista" nosotros entendemos todo compuesto que actúa como una prostaglandina o agonista que estimula la producción de cAMP en los macrófagos en un receptor de prostaglandina. La prostaglandina o agonista que estimula la producción de cAMP en los macrófagos no necesita ser un prostanoides. Normalmente, el agonista es el que une los receptores EP2 y EP4. Es preferible que la prostaglandina que estimula la producción de cAMP en los macrófagos sea un PGE o un PGL. Preferentemente, la prostaglandina que estimula la producción de cAMP en los macrófagos no es un PGF o agonista de la misma. Es preferible que la prostaglandina o agonista de la misma que estimula la producción de cAMP en los macrófagos es un PGE2 o un análogo sintético de la misma. Análogos sintéticos son los modificados en la posición 15 o 16 por la adición de un grupo metilo o aquellos en los que el hidroxilo se ha transpuesto desde la posición 15 a la posición 16. Ejemplos de preferencia análogos de la prostaglandina que estimula la producción de cAMP en los macrófagos incluyen Butaprost (un agonista receptor EP2), y 11-desoxi PGE1 (un agonista receptor EP4). Para evitar dudas, el término "prostaglandina" incluye una prostaglandina que se da de manera natural estimulando la producción de cAMP en los macrófagos, así como un análogo de la prostaglandina sintética que estimula la producción de cAMP en los macrófagos.

Una prostaglandina adecuada o agonista de la misma que estimula la producción de cAMP en los macrófagos incluye dinoprostona (se vende como PropessTM por Ferring en Europa y los bosques en los EE.UU.; se vende como ProstinTM E2 por Pharmacia), gemeprost (se vende por Farillon), el misoprostol (que se vende como CytotecTM por Searle y Pharmacia), alprostadil (que se vende como CaverjectTM por Pharmacia y ViridalTM por Schwarz y MUSETM de AstraZeneca) y limaprost.

El misoprostol es un análogo de PGE que tiene efectos agonistas de EP2 y EP3. Su estructura química es (\pm) metilo 11 α , 16-dihidroxi-16-metil-9-oxoprost-13 enoato.

Un ejemplo de un compuesto no prostanoides que actúa como un agonista de la prostaglandina que estimula la producción de cAMP en los macrófagos es AH23848, un agonista del receptor EP4.

Agonistas EP2 pueden ser útiles en la práctica de la invención, incluyen AH13205.

Una prostaglandina adecuada de la misma que estimula la producción de cAMP en los macrófagos también incluyen 19-hidroxi - PGE1 y 19-hidroxi PGE2. Las prostaglandinas agonistas se describen en el EP 1 097 922 y EP 1114 816.

Una de las prostaglandinas adecuada o agonista de la misma que estimula la producción de cAMP en los macrófagos puede también incluir cualquiera de la prostaglandina análoga de la 19-hidroxi descrito en Patente U.S. nº 4.127.612.

Es preferible que la prostaglandina que estimula la producción de cAMP en los macrófagos sea la prostaglandina E2 (PGE2). Una de las prostaglandinas y agonista de la misma que estimula la producción de cAMP en los macrófagos como PGE2, está comercialmente disponible, por ejemplo, de Pharmacia and Upjohn como ProstinTM E2.

ES 2 356 371 T3

El inhibidor selectivo tipo IV de la PDE puede ser cualquier inhibidor selectivo tipo IV de la PDE, de preferencia, el inhibidor selectivo tipo IV de PDE inhibe a los tipos IV EDP, que son conocidos por ser activos en la degradación de cAMP. Por "selectivo" nosotros incluimos el inhibidor que inhibe a los tipos IV de PDEs más potentemente que otro tipo. Preferentemente, el inhibidor selectivo tipo IV de la PDE es por lo menos 2 veces más potente que otro tipo de PDE. Más preferentemente, el inhibidor selectivo tipo IV es al menos 5 veces, 10 veces, 20 veces, 30 veces, 40 veces, 50 veces, 100 veces, 200 veces, 500 veces o 1000 veces más potente que otro tipo de inhibidor tipo IV de PDE. Normalmente, el inhibidor tipo IV de PDE es alrededor 5 a 50 veces más potente que otro tipo de PDE. Normalmente, el inhibidor de tipo IV de PDE es 5 a 50 veces más potente que un inhibidor que se considera no selectivo como la teofilina. Así, la teofilina es 30 veces menos eficaz que el rolipram.

Preferiblemente, la inhibición selectiva está determinada por la comparación de los niveles de IC₅₀ (Dousa (1999) *Kidney International* 55: 29-62).

La Patente U.S. n° 6.127.378 revela Fenantridinas sustituidas en la posición 6, que se describen como inhibidores selectivos de la PDE (principalmente de tipo IV), que pueden ser adecuados para su uso en la fabricación de los medicamentos de la invención.

Inhibidores específicos (o selectivos) de tipo IV de PDE incluyen rolipram (4-[3-cyclopentyloxy-4-metoxifenil]-2-pirrolidinona) y Ro-20-1724 (4-[3-butoxi-4-metoxibencil]-2-imidazolidinona). La IC₅₀ para rolipram es 800 nm, y la IC₅₀ para Ro-20-1724 es de 2 μM.

Otro tipo de inhibidor selectivo tipo IV de la PDE es denbufilina (1,3-di-n-butyl-7-(2-oxopropil)-xantina).

CP 80 633 (Hanifin *et al* (1996) *J. Invest. Dermatol.* 107, 51-56), CP 102 y 995 CP 76 593 son también todos los potentes inhibidores de tipo IV (disponible en la Central Research Division, Pfizer Inc, Groton, CT).

Otro tipo de inhibidores selectivos de alta afinidad tipo IV incluyen CPD 840, PR 73401 y RS 33793 (Dousa, 1999). Los inhibidores selectivos de alta afinidad tipo IV de la PDE tiene una Ki de aproximadamente 1 nM mientras que los inhibidores de menor afinidad tienen una Ki de aproximadamente 1 μM.

Los artículos de Dousa (1999), Müller *et al* (1996, *Trends Pharmacol. Sci.* 17: 294-298); Palfreyman & Souness (1996, *Prog Med Chem* 33: 1-52); Stafford y Feldman (1996, *Informes Anuales en Química Médica* (Vol. 31) pp 71-80; Ed. Bristol, Academic Press, NY, EE.UU.), y Teixeira *et al* (1997, *Trends Pharmacol. Sci.* 18: 164-171) contienen revelaciones relacionadas con los inhibidores selectivos tipo IV de la PDE.

Normalmente, cuando un inhibidor selectivo tipo IV de la PDE se administra por vía oral, se utiliza alrededor de 1 a 30 mg. Así, una dosis oral típica de rolipram o denbufilina es de 1 mg o 5 mg o 5 mg o 10 mg o 30 mg.

En una fabricación de la prostaglandina o agonista de la misma que estimula la producción de cAMP en los macrófagos se administra por vía oral. En particular, la prostaglandina o agonista de la misma que estimula la producción de cAMP en los macrófagos es una prostaglandina análoga, que ha sido modificada para reducir su catabolismo y que está disponible por vía oral (como el misoprostol).

Aunque el inhibidor selectivo tipo IV de la PDE puede ser administrado mediante cualquier medio adecuado y de acuerdo a cualquier ruta, cuando la prostaglandina o agonista de la misma que estimula la producción de cAMP en los macrófagos se administra por vía oral es preferible que el inhibidor selectivo tipo IV de la PDE también sea administrado por vía oral. También es preferible que la prostaglandina o agonista de la misma que estimula la producción de cAMP en los macrófagos y el inhibidor selectivo tipo IV de la PDE sean administrados simultáneamente, por ejemplo, en la misma composición.

Así, en una realización preferida, el medicamento fabricado de acuerdo con la invención es para administración oral de una prostaglandina análoga que estimula la producción de cAMP en los macrófagos que ha sido modificada para reducir su catabolismo y que está disponible por vía oral (como misoprostol) y por administración oral del inhibidor selectivo tipo IV de la PDE, como rolipram. Las ventajas de la administración oral es que generalmente tiene un buen cumplimiento en comparación con otros modos de administración.

El inventor cree que la combinación del inhibidor selectivo tipo IV de la PDE con prostaglandinas disponibles orales o agonistas de la mismas que estimulan la producción de cAMP en los macrófagos significará que una menor dosis de prostaglandina oral será necesaria en la ausencia del inhibidor selectivo tipo IV de la PDE. Se cree, por el inventor, que esto tendrá la ventaja de reducir los efectos secundarios causados por la prostaglandina oral o agonista de la misma que estimula la producción de cAMP en los macrófagos, tales como los calambres musculares.

Por lo general, 0,1 a 100 μg, de 19-hidroxi PGE y 1 -250 mg Rolipram en 5 ml de solución salina sería administrado.

Por vía tópica, de 100 a 800 μg de misoprostol se administra por vía oral diariamente con 1 a 30 mg de rolipram o denbufilina.

ES 2 356 371 T3

Como se describió anteriormente, la prostaglandina o agonista de la misma que estimula la producción de cAMP en los macrófagos puede ser utilizada por vía oral en combinación con un inhibidor de la PDE en una dosis más baja que en ausencia del inhibidor de la PDE.

5 Normalmente, la dosis del inhibidor selectivo tipo IV de la PDE es como se describe anteriormente y de la prostaglandina que estimula la a producción de cAMP en los macrófagos, tal como el misoprostol, es administrada a una dosis de 100 a 400 μg .

10 Los datos descritos en las figuras y los ejemplos muestran que por lo general, una mayor concentración de 19-hidroxi PGE sería necesaria para lograr efectos similares de los PGE. Sin embargo, el 19-hidroxi PGE tiene la ventaja de ser más rápidamente catabolizada.

15 Por lo tanto, de preferencia, la combinación de un inhibidor selectivo tipo IV de la PDE y la prostaglandina o agonista de la misma que estimula la producción de cAMP en los macrófagos, cuenta con un inhibidor selectivo tipo IV de la PDE y 19-hidroxi PGE.

20 Un segundo aspecto de la invención proporciona el uso de una prostaglandina o agonista o de la misma que estimula la producción de cAMP en los macrófagos en la fabricación de un medicamento para inducir la tolerancia a un antígeno en un paciente al que se administra un inhibidor selectivo tipo IV de PDE y en donde la combinación de la prostaglandina o agonista de la misma y el inhibidor selectivo tipo IV de la PDE se utiliza para inducir la tolerancia a un antígeno en un paciente. Así, el paciente podría haberle sido administrado el inhibidor selectivo tipo IV de la PDE antes de la administración de la prostaglandina o agonista de la misma que estimula la producción de cAMP en los macrófagos, o el inhibidor selectivo tipo IV de PDE se administra al mismo tiempo, como la prostaglandina o agonista de la misma que estimula la producción de cAMP en los macrófagos o será administrado el inhibidor selectivo tipo IV de la PDE después de la administración de la prostaglandina o agonista de la misma que estimula la producción de cAMP en los macrófagos.

30 Un tercer aspecto de la invención es el uso de un inhibidor selectivo tipo IV de la PDE en la fabricación de un medicamento para la inducción de la tolerancia a un antígeno en un paciente en el que al paciente se le administra una prostaglandina o agonista de la misma que estimula la producción de cAMP en los macrófagos y en donde la combinación de la prostaglandina o de su agonista y el inhibidor selectivo tipo IV de PDE se utiliza para inducir la tolerancia a un antígeno en un paciente. Así, al paciente podría habersele administrado la prostaglandina o agonista de la misma que estimula la producción de cAMP en los macrófagos antes de la administración del inhibidor selectivo tipo IV de la PDE, o se administra la prostaglandina o agonista de la misma que estimula la producción de cAMP en los macrófagos al mismo tiempo que el inhibidor selectivo tipo IV de PDE o será administrado la prostaglandina o agonista de la misma que estimula la producción de cAMP en los macrófagos después de la administración del inhibidor selectivo tipo IV de la PDE.

40 Un cuarto aspecto de la invención proporciona el uso de una combinación de una prostaglandina o agonista de la misma que estimula la producción de cAMP en los macrófagos y un inhibidor selectivo tipo IV de la PDE en la fabricación de un medicamento para la inducción de la tolerancia a un antígeno en un paciente. Así, la prostaglandina o agonista de la misma que estimula la producción de cAMP en los macrófagos y el inhibidor selectivo tipo IV de la PDE se pueden combinar en el mismo medicamento antes de la administración para el paciente.

45 Preferentemente, el uso de acuerdo a los aspectos segundo, tercero y cuarto en el tratamiento de una respuesta inmune anormal o no deseada o inflamatoria en el paciente.

50 Las preferencias de la prostaglandina o agonista de la misma que estimula la producción de cAMP en los macrófagos, los inhibidores selectivos tipo IV de la PDE, vías de administración, dosis y así sucesivamente para los aspectos segundo, tercero y cuarto, de la invención son las mismas que para el primer aspecto de la invención.

55 Un quinto aspecto de la invención proporciona un sistema terapéutico para el uso en la inducción de tolerancia a un antígeno, el sistema que comprende una prostaglandina o agonista de la misma que estimula la producción de cAMP en los macrófagos y un inhibidor selectivo tipo IV de la PDE. El sistema terapéutico también puede ser llamado un "kit de piezas".

60 Preferentemente, el sistema terapéutico contiene una prostaglandina preferida o agonista de la misma que estimula la producción de cAMP en los macrófagos como se define en el primer aspecto de la invención. Sin embargo, preferentemente, el sistema terapéutico contiene un inhibidor selectivo tipo IV de PDE preferido como se define en el primer aspecto de la invención. El sistema terapéutico o kit de las partes podría contener tanto la prostaglandina o agonista de la misma que estimula la producción de cAMP en los macrófagos y el inhibidor selectivo tipo IV de la PDE envasados y presentados en formulaciones adecuadas para su uso en combinación, ya sea para la administración simultánea o para la administración separada en el tiempo. Así, por ejemplo, en una realización donde la prostaglandina o agonista de la misma que estimula la producción de cAMP en los macrófagos y el inhibidor selectivo tipo IV de PDE son administrados simultáneamente a nivel local en la piel, el sistema terapéutico puede contener un gel o crema o spray o de vapor o "parche" que contiene una combinación de la prostaglandina o agonista de la misma que estimula la producción de cAMP en los macrófagos y los inhibidores de la PDE. Alternativamente, en otra realización, donde la prostaglandina o agonista de la misma que estimula la producción de cAMP en los macrófagos y el inhibidor selectivo

ES 2 356 371 T3

tipo IV de la PDE se administran por separado en un régimen de tratamiento especial, la prostaglandina o agonista de la misma que estimula la producción de cAMP en los macrófagos e inhibidores de la PDE se empaquetan o se formulan por separado. Por ejemplo, la prostaglandina o agonista de la misma que estimula la producción de cAMP en los macrófagos pueden ser formuladas para la administración local utilizando una crema o gel o de aerosol o de vapor o “parche”, y el inhibidor selectivo tipo IV de la PDE se envasa o formula para una administración sistémica tal como la administración oral.

Las formulaciones de la prostaglandina o agonista de la misma que estimula la producción de cAMP solo en los macrófagos o el inhibidor selectivo tipo IV de la PDE solos o la combinación de los mismos, puede ser convenientemente presentada en forma de unidad de dosis y puede ser preparada por cualquiera de los métodos bien conocidos en materia de farmacia. Esos métodos incluyen el paso de asociar los ingredientes activos utilizados en la invención con el portador que constituye uno o más ingredientes accesorios. En general, las formulaciones se preparan de manera uniforme e íntimamente consiguiendo la asociación del ingrediente activo con los líquidos portadores o sólidos finamente divididos, o ambos, y luego, si es necesario, la configuración del producto.

Formulaciones relacionadas con la presente invención, adecuadas para la administración oral (por ejemplo, del inhibidor selectivo tipo IV de la PDE o de una apropiada prostaglandina o agonista de la misma que estimula la producción de cAMP en los macrófagos) pueden ser presentadas como unidades discretas como cápsulas, píldoras o comprimidos, conteniendo cada uno una cantidad predeterminada de ingrediente activo; en forma de polvo o gránulos: como una solución o una suspensión en un líquido acuoso o líquido no acuoso; o como una emulsión líquida aceite en agua o una emulsión líquida de agua en el aceite. El ingrediente activo también puede presentarse como un bolo, electuario o pasta.

Una pastilla puede ser hecha por compresión o por moldeo de piezas de fundición, opcionalmente con uno o más ingredientes añadidos. Las pastillas comprimidas pueden ser preparadas por compresión en una máquina adecuada, el ingrediente activo en forma de fluido libre como polvo o gránulos, opcionalmente mezclado con un aglutinante (por ejemplo, povidona, gelatina, hidroxipropilmetilcelulosa), lubricante, disolvente inerte, sin conservantes, desintegrante (por ejemplo, almidón glicolato de sodio, povidona entrecruzada, carboximetilcelulosa de sodio entrecruzada), superficie activa o agente dispersante. Comprimidos moldeados pueden fabricarse por moldeo en una máquina adecuada de mezcla de compuestos en polvo humedecido con un disolvente líquido inerte. Los comprimidos pueden ser recubiertos con una película opcionalmente y pueden ser formulados con el fin de proporcionar la liberación lenta o bajo el control del ingrediente activo en ella, utilizando, por ejemplo hidroxipropilmetilcelulosa en proporciones variables para proporcionar perfil de liberación deseado.

Las formulaciones de unidades de dosificación recomendadas son las que contienen una dosis diaria o unidad, sub-dosis diaria o de una adecuada fracción, de un ingrediente activo.

Debe entenderse que, además de los ingredientes antes mencionados sobre las formulaciones de esta invención, podrían incluir otros agentes convencionales en la materia teniendo en cuenta el tipo de formulación en cuestión, para ejemplo, las adecuadas para la administración oral que pueden incluir agentes aromatizantes.

Para la administración local en la piel, puede ser conveniente formular la prostaglandina o agonista de la misma que estimula la producción de cAMP en los macrófagos y/o el inhibidor selectivo tipo IV de la PDE en combinación con un agente dispersivo o agente que permite el aumento de la transferencia o penetración transdérmica o transmucosa, como el dimetilsulfóxido (DMSO) y similares. Agentes adecuados son aquellos que son compatibles con la prostaglandina o agonista de la misma que estimula la producción de cAMP en los macrófagos y/o el inhibidor selectivo tipo IV de la PDE (por ejemplo, son los disolventes del mismo).

Una composición que comprende una prostaglandina o agonista de la misma que estimula la producción de cAMP en los macrófagos y un inhibidor selectivo tipo IV de la PDE es útil en la práctica de la invención.

Normalmente, la composición está empaquetada y presentada para su uso en medicina. La composición puede ser utilizada en medicina humana o veterinaria; preferentemente, se utiliza en medicina humana.

Normalmente, la composición contiene además un portador farmacéuticamente aceptable. Así, una composición farmacéutica (o también llamada formulación), que comprende una prostaglandina o agonista de la misma que estimula la producción de cAMP en los macrófagos, un inhibidor selectivo tipo IV de la PDE y un portador farmacéuticamente aceptable es de utilidad en la práctica de la invención. El portador(es) debe ser “aceptable” en el sentido de ser compatible con la composición de la invención y no perjudicial para los beneficiarios de la misma. Normalmente, los portadores serán agua o solución salina que serán esterilizados y libres de pirógenos.

El paciente en el que se utiliza el medicamento es preferiblemente un ser humano, aunque el paciente puede ser cualquier mamífero como un gato, perro, caballo, vaca, oveja, caballo, cerdo, etc.

Se puede apreciar que el medicamento puede ser utilizado antes de que los síntomas indiquen la necesidad de inducir la tolerancia de un antígeno que se manifiesta en el paciente a ser tratado, o bien, alternativamente o además, la utilización del medicamento puede ser usado después de que los síntomas o signos sean evidentes. Así, en el caso de un paciente que recibe un órgano o un trasplante de tejidos, podría ser beneficioso administrar la prostaglandina

ES 2 356 371 T3

o agonista de la misma que estimula la producción de cAMP en los macrófagos y el inhibidor selectivo tipo IV de la PDE antes de que la cirugía del trasplante se haya iniciado. Puede ser aún más beneficioso continuar la administración durante o después de la finalización de la cirugía de trasplante o injerto. La dosis necesaria puede ser determinada por el médico, según el grado de tolerancia que se requiera.

Además, se aprecia que cada una de las prostaglandinas o agonista de la misma que estimula la producción de cAMP en los macrófagos, el inhibidor selectivo tipo IV de la PDE pueden ser administrados como una dosis única o en varias dosis más pequeñas que logren los mismos efectos terapéuticos. La frecuencia de administración puede variar según el criterio del médico que administra la dosis o el paciente.

El embarazo es probable que sea una contraindicación para la presente invención. De hecho, el embarazo es una contraindicación de varias prostaglandinas como el misoprostol. TM Cytotec (misoprostol) no causa una hipertensión, pero puede ser un posible riesgo con el método de la invención.

La invención será ahora descrita con más detalle con la ayuda de las siguientes figuras y ejemplos.

Figura 1

La expresión de ARNm para las citoquinas IL-10 e IL-12 subunidad p35. El experimento se llevó a cabo en las células U937 (promonocitos) en presencia de Rolipram a $1 \mu\text{g/ml} = 4 \mu\text{M}$ e indometacina $10 \mu\text{M}$. La indometacina impide la síntesis de prostaglandinas de las células. Tenga en cuenta que el efecto de los PGE + Rolipram es una marcada estimulación de la IL-10 y una inhibición de IL-12, tanto para las células no estimuladas y células IFN γ estimuladas. La escala vertical es una medida de ARNm en comparación con un control de la muestra, medida por PCR en tiempo real cuantitativa (TaqMan).

Figura 2

La figura 2A es una gráfica que muestra el efecto de los PGE y Rolipram en la producción de IL-10 ARNm en las células U937. La figura 2B es una gráfica que muestra el efecto de LPS, PGE y Rolipram en la producción de IL-10 ARNm en las células U937. La figura 2C es una gráfica que muestra el efecto de LPS, PGE y Rolipram en la liberación de IL-10 a partir de células U937. La figura 2D es un gráfico que muestra el efecto de los PGE y Rolipram en la liberación de IL-10 a partir de células U937.

Figura 3

Un gráfico que muestra el efecto de 19 hidroxil PGE1 y 19 hidroxil PGE2 en la estimulación de la IL-10 en presencia y ausencia de rolipram.

Figura 4

Un gráfico que muestra el efecto de la PGE1 y la PGE2 sobre la estimulación de la IL-10 en presencia y ausencia de rolipram.

Figura 5

Un gráfico que muestra el efecto de PGE y 19 hidroxil PGE en la producción de la fosfodiesterasa IV b ARNm en presencia y ausencia rolipram.

Ejemplo 1

Efecto de la combinación de PGE y rolipramon en la producción de IL-10 e IL-12 por células U-937 (promonocitas)

Las células U 937 (línea celular de monocitos humanos) fueron cultivadas en RPMI (PAA Laboratories) en un medio con 10% de suero fetal bovino añadido (PAA Laboratories). Las células fueron tratadas con la prostaglandina E 2 a 10^{-6} Molar o con interferón- γ a 10 ng/ml durante 24 horas. Rolipram a $1 \mu\text{g/ml}$ y la indometacina en $10 \mu\text{M}$ estaba presente en todos los pocillos. Las células fueron granuladas y el ARNm se extrajo con el reactivo Tri (Sigma, Poole, Reino Unido). El ARN total fue obtenido mediante la adición de cloroformo y posterior precipitación isopropanol. El ARN fue transcrito al revés con la transcriptasa inversa (Applied Biosystems) y con hexámeros aleatorios (Applied Biosystems). Las sondas e iniciadores para IL-10 e IL-12 (p35) fueron diseñados utilizando Primer Express (Applied Biosystems) y fueron los siguientes:

Iniciadores IL-12 p35

5

CCACTCCAGACCCAGGAATG**TGTCTGGCCTTCTGGAGCAT**

10

Sonda IL-12

TCCCATGCCTTCACCACTCCCAA

15

Iniciadores, IL-10

20

CTACGGCGCTGTCATCGAT**TGGAGCTTATTAAAGGCATTCTCA**

25

Sonda IL-10

CTTCCCTGTGAAAACAAGAGCAAGGCC

30

La plantilla se amplió en una máquina de 7700 Taqman de 40 ciclos usando FAM/TAMRA tintes en la sonda. El Kit de Applied Biosystems fue utilizado para amplificar y detectar ARN ribosómico (18S) como control. Después de 40 ciclos, la Ct (relacionados al número de ciclo en el cual aparece la señal) para la FAM y el 18S (VIC) fueron registrados y la cuantificación relativa absoluta se logró mediante la fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

35

Los resultados de este experimento se describen en el pie de la Figura 1. Ellos muestran que existe una sinergia entre una prostaglandina (PGE2) y un inhibidor de la PDE (rolipram) sobre la liberación de IL-10 a partir de células del sistema inmune y que existe una marcada estimulación de la inhibición de IL-10 y de la IL-12 en las células del sistema inmune cuando una prostaglandina (PGE2) y un inhibidor de la PDE (rolipram) se utilizan en combinación.

40

Ejemplo 2

Estimulación de la producción de IL-10 lograda con o sin LPS

45

Las células U 937 fueron cultivadas en RPMI (PAA Laboratories) en un medio con 10% de suero fetal bovino añadido (PAA Laboratories). 2×10^6 células por matraz fueron tratadas con la prostaglandina E2 a 10^{-6} Molar o con Rolipram (4×10^{-6}) durante 24 horas. El medio fue retirado a las 20 horas y analizado por ELISA. Un anticuerpo de captura (Pharmingen) estaba cubierto en 96 placas de pocillo y el medio de cultivo se añadió en cada pocillo. Una curva estándar fue creada con la proteína recombinante IL-10. Después de incubación y el lavado, un anticuerpo monoclonal biotinado (Pharmingen) fue añadido, y tras la incubación y el lavado, se agregó estreptavidina peroxidada. Después de lavar el sustrato tetrametil bencidina se añadió color desarrollado en proporción a la IL-10 en la muestra original/estándar. El color fue leído mediante una placa de fotómetro (Labsystems, Multiskan). Las concentraciones medias (N = 3) en los controles sin lipopolisacárido (LPS) fueron 38.2 pg/ml y en presencia de LPS (100 nm) fueron 43,9 prostaglandina/ml.

55

Después de la incubación (20 horas), las células fueron granuladas y el ARNm se extrajo con Tri-reactivo (Sigma, Poole, Reino Unido). El ARN total fue obtenido mediante la adición de cloroformo y posterior precipitación isopropanol. El ARN fue transcrito a la inversa con la transcriptasa inversa (Applied Biosystems) y hexámeros aleatorios (Applied Biosystems). Sondas e iniciadores para la IL-10 e IL-12 (p35) fueron diseñados utilizando Primer Express (Applied Biosystems) y fueron los siguientes:

65

ES 2 356 371 T3

Iniciadores IL-12 p35

5 **CCACTCCAGACCCAGGAATG**
TGTCTGGCCTTCTGGAGCAT

Sonda IL-12

15 **TCCCATGCCTTCACCACTCCCAA**

Iniciadores IL-10

20 **CTACGGCGCTGTCATCGAT**
25 **TGGAGCTTATTAAAGGCATTCTTCA**

Sonda IL-10

30 **CTTCCCTGTGAAAACAAGAGCAAGGCC**

35 La Plantilla se amplió en una máquina de 7700 Taqman de 40 ciclos usando tintes FAM/TAMRA en la sonda. El Kit de Applied Biosystems fue utilizado para amplificar y detectar el ARN ribosómico (18S) (utilizando tintes VIC/TAMRA) como control interno en el mismo tubo de reacción. Después de 40 ciclos de la Ct (relacionado con el número de ciclo en el que aparece la señal) para la FAM y el 18S (VIC) se registraron y cuantificaron de forma relativa y absoluta logradas mediante la fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$ donde Δ se refiere a la diferencia entre la FAM y señal VIC relacionada con un comparador estándar incluidos en cada serie.

40

Ejemplo 3

45 El efecto de la PGE1, PGE2, 19 hidroxil PGE1 y 19 hidroxil PGE2 en la estimulación de la IL-10 en presencia de y ausencia de rolipram fue investigado como se describió anteriormente en el Ejemplo 2. Los niveles de IL-10 fueron medidos utilizando un método de ensayo ELISA (de R & D Ltd, Oxford). Las medidas fueron adoptadas de conformidad con las instrucciones del fabricante. Los resultados son se muestra en las Figuras 3 y 4.

50 Ejemplo 4

El ARNm de la fosfodiesterasa IV-b fue medido como se describe en el Ejemplo 2. ARNm se extrajo después de cuatro horas de incubación. La concentración de los PGE fue de 1×10^{-6} y la de los 19-hidroxil PGE2 fue de 5×10^{-6} . Los siguientes iniciadores y sonda TaqMan se utilizaron para la cuantificación de la PDE IV b ARNm.

55

Siguiente

CCTTCAGTAGCACCGGAATCA

60 Inverso

CAAACAAACACACAGGCATGTAGTT

Sonda

65 **AGCCTGCAGCCGCTCCAGCC**

ES 2 356 371 T3

Los resultados se muestran en la Figura 5. Un aumento en la actividad de la PDE sigue a ambas aplicaciones de PGE y la 19 hidroxipGE, que parece ser una retroalimentación negativa para reducir el efecto de los estímulos. El uso de un PGE y un inhibidor selectivo tipo IV de PDE aumenta los niveles del mensaje PDE aún más, pero entonces la fosfodiesterasa sintetizada es anulada por la presencia del inhibidor.

5

Ejemplo 5

Tratamiento de la enfermedad desmielinizante

10

Un paciente con enfermedad desmielinizante se le administra el misoprostol 800 μg y 25 mg de rolipran por vía oral, todos los días.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

- 5 1. Uso de una prostaglandina o agonista de la misma que estimula la producción de cAMP en macrófagos en la fabricación de un medicamento para inducir tolerancia a un antígeno en un paciente en el que al paciente se le administra un inhibidor selectivo tipo IV de la PDE y en donde la combinación de la prostaglandina o agonista de la misma y el inhibidor selectivo tipo IV de la PDE se utiliza para inducir tolerancia a un antígeno en el paciente, con la excepción del tratamiento de artritis reumatoide.
- 10 2. Uso de un inhibidor selectivo tipo IV de la PDE en la fabricación de un medicamento para inducir tolerancia a un antígeno en un paciente en el que al paciente se le administra una prostaglandina o agonista de la misma que estimula la producción de cAMP en macrófagos y en donde la combinación de la prostaglandina o agonista de la misma y el inhibidor selectivo tipo IV de PDE se utiliza para inducir la tolerancia a un antígeno en el paciente.
- 15 3. Uso de una combinación de una prostaglandina o agonista de la misma que estimula la producción de cAMP en macrófagos y un inhibidor selectivo tipo IV de la PDE en la fabricación de un medicamento para inducir la tolerancia a un antígeno en un paciente.
- 20 4. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 en el que el inhibidor selectivo de la PDE tipo IV es uno de rolipram, CP80 633, CP102 995, CP76 593, Ro-20-1724, denbufilina, CDP 840, PR 73401 o RS 33793.
- 25 5. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 donde la prostaglandina o agonista de la misma es una de las prostaglandina E₂, como la prostaglandina E₂ o un análogo de la misma, carboprost, dinoprostona, gemeprost, el misoprostol, alprostadil, lamaprost, butaprost, 11-desoxi PGE₁, AH23848, AH13205, 19-hidroxi PGE₁ o 19-hidroxi PGE₂ o agonista de la misma.
- 30 6. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 donde la prostaglandina es una 19-hidroxi PGE.
- 30 7. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 en el que el medicamento es administrado localmente en un sitio donde la tolerancia es necesaria.
- 35 8. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 en el que el medicamento está formulado para ser administrado sistémicamente.
- 35 9. Uso según la reivindicación 8 en donde el medicamento está formulado para ser administrado oralmente.
- 40 10. Uso según la reivindicación 8 en donde el medicamento se formula como un supositorio o la cápsula.
- 40 11. Uso según la reivindicación 10 en el que el supositorio o la cápsula tiene un recubrimiento entérico para liberación de la prostaglandina o agonista de la misma y/o el inhibidor selectivo de tipo IV de la PDE en el intestino del paciente.
- 45 12. Uso según la reivindicación 11 para el tratamiento de la enfermedad inflamatoria intestinal.
- 45 13. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 para la luchar contra una enfermedad o condición asociada con rechazo de trasplante.
- 50 14. Uso según la reivindicación 13 donde la enfermedad o condición asociada con el rechazo de trasplantes incluye enfermedad del injerto contra el huésped o enfermedad del huésped contra el injerto.
- 50 15. Uso según la reivindicación 13 o 14 en el que el medicamento se administra antes del trasplante.
- 55 16. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 para el tratamiento de una enfermedad autoinmune que sea otra que la artritis reumatoide.
- 60 17. Uso según la reivindicación 16 donde la enfermedad autoinmune, es seleccionada de mixoedema primario, tirotoxicosis, anemia perniciosa, gastritis autoinmune atrofica, enfermedad de Addison, IDDM, el síndrome de Good-pasture, miastenia grave, oftalmía simpática, MS, anemia hemolítica autoinmune, leucopenia idiopática, colitis ulcerosa, dermatomiositis, esclerodermia, enfermedad mixta del tejido conectivo, síndrome de intestino irritable, SLE, enfermedad de Hashimoto, tiroiditis, enfermedad de Behcet, enfermedad celíaca/herpetiformis dermatitis y enfermedad desmielinizante.
- 65 18. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 para el tratamiento de una enfermedad o condición alérgica en el paciente.
- 65 19. Uso según la reivindicación 18 donde la enfermedad o condición alérgica es el asma alérgico.

ES 2 356 371 T3

20. Uso según la reivindicación 19 donde la prostaglandina es un 19-hidroxi PGE, y en donde el medicamento es formulado en forma de aerosol para la administración al árbol bronquial o los pulmones del paciente.

5 21. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 20 en el que la tolerancia a los antígenos es para tratar una respuesta inmune anormal o no deseada al antígeno en el paciente.

22. Uso según la reivindicación 21 donde la respuesta inmune anormal o no deseada implica una deficiencia en la producción de IL-10 y/o un aumento en la producción de IL-12.

10 23. Un sistema terapéutico para el uso en la inducción de tolerancia a un antígeno en un paciente, el sistema comprendiendo una prostaglandina o agonista de la misma que estimula la producción de cAMP en macrófagos y un inhibidor selectivo tipo IV de la PDE.

15 24. Un sistema terapéutico según la reivindicación 23 en el que el inhibidor selectivo tipo IV de la PDE está en una preparación para administración sistémica.

25. Un sistema terapéutico según la reivindicación 24 en el que el inhibidor selectivo tipo IV de la PDE se encuentra en una preparación para la administración oral.

20 26. Un sistema terapéutico según una cualquiera de las reivindicaciones 23 a 25 en el que la prostaglandina o agonista está en una preparación para la administración sistémica, como la administración oral.

25 27. Un sistema terapéutico según una cualquiera de las reivindicaciones 23 a 26 en donde la prostaglandina o agonista de la misma o del inhibidor selectivo tipo IV de la misma es como se definió en cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6.

28. Un sistema terapéutico según una cualquiera de las reivindicaciones 23 a 27 para combatir una enfermedad o condición asociada con rechazo del trasplante.

30 29. Un sistema terapéutico según la reivindicación 28 donde la enfermedad o condición asociada con el rechazo de trasplantes comprende enfermedad del injerto contra el huésped o enfermedad del huésped contra el injerto.

35 30. Un sistema terapéutico según la reivindicación 28 o 29 donde la prostaglandina o agonista de la misma y/o el inhibidor de la PDE son para administración antes del trasplante.

31. Un sistema terapéutico según una cualquiera de las reivindicaciones 23 a 27 para el tratamiento de una enfermedad autoinmune que no sea la artritis reumatoide.

40 32. Un sistema terapéutico según la reivindicación 31 donde la enfermedad autoinmune, es seleccionada de un mixoedema primario, tirotoxicosis, anemia perniciosa, gastritis autoinmune atrófica, enfermedad de Addison, DMID, el síndrome de Goodpasture, miastenia gravis, oftalmía simpática, MS, anemia hemolítica autoinmune, leucopenia idiopática, la colitis ulcerosa, dermatomiositis, esclerodermia, enfermedad mixta del tejido conectivo, síndrome de intestino irritable, SLE, la enfermedad y la tiroiditis de Hashimoto, la enfermedad de Behcet, la enfermedad celíaca/dermatitis herpetiforme, y enfermedad desmielinizante.

45 33. Un sistema terapéutico según una cualquiera de las reivindicaciones 23 a 27 para el tratamiento de una enfermedad o condición alérgica en el paciente.

50 34. Un sistema terapéutico según la reivindicación 33 donde la enfermedad o condición alérgica es el asma alérgico.

35. Un sistema terapéutico según la reivindicación 34 donde la prostaglandina es un 19-hidroxi PGE, y en donde el 19-hidroxi PGE, y opcionalmente el inhibidor selectivo tipo IV de la PDE, son para administración al árbol bronquial o pulmones del paciente mediante un aerosol.

55 36. Un sistema terapéutico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 23 a 35, en el que la tolerancia al antígeno es para tratar una respuesta inmune anormal o no deseada al antígeno en el paciente.

60 37. Un sistema terapéutico según la reivindicación 36 en el que la respuestas inmune anormal o no deseada implica una deficiencia en la producción de IL-10 y/o un aumento en la producción de IL-12.

65

Figura 1A

13/3/00 IL-12 P35

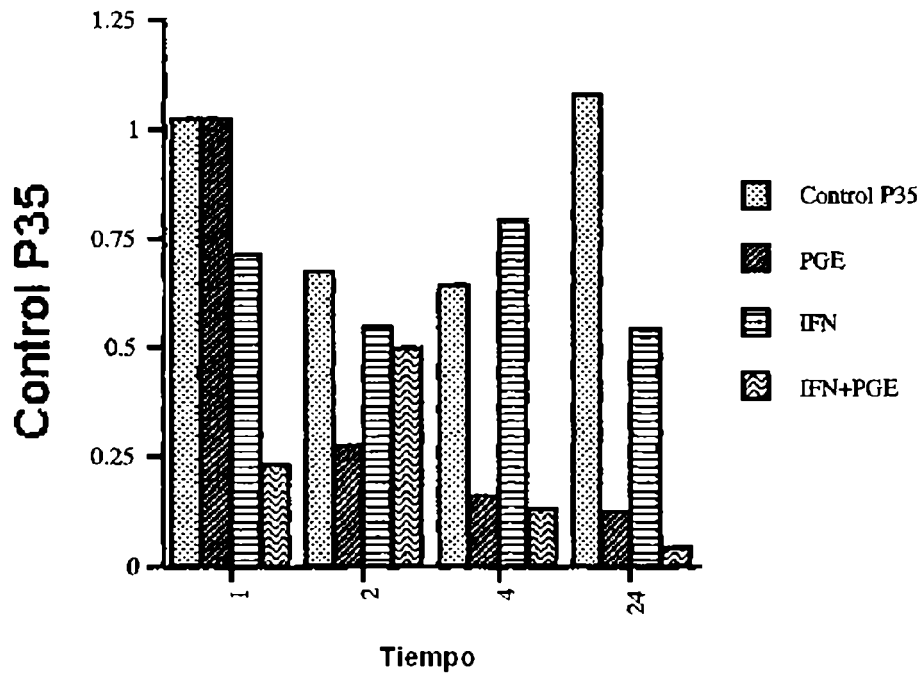


Figura 1B

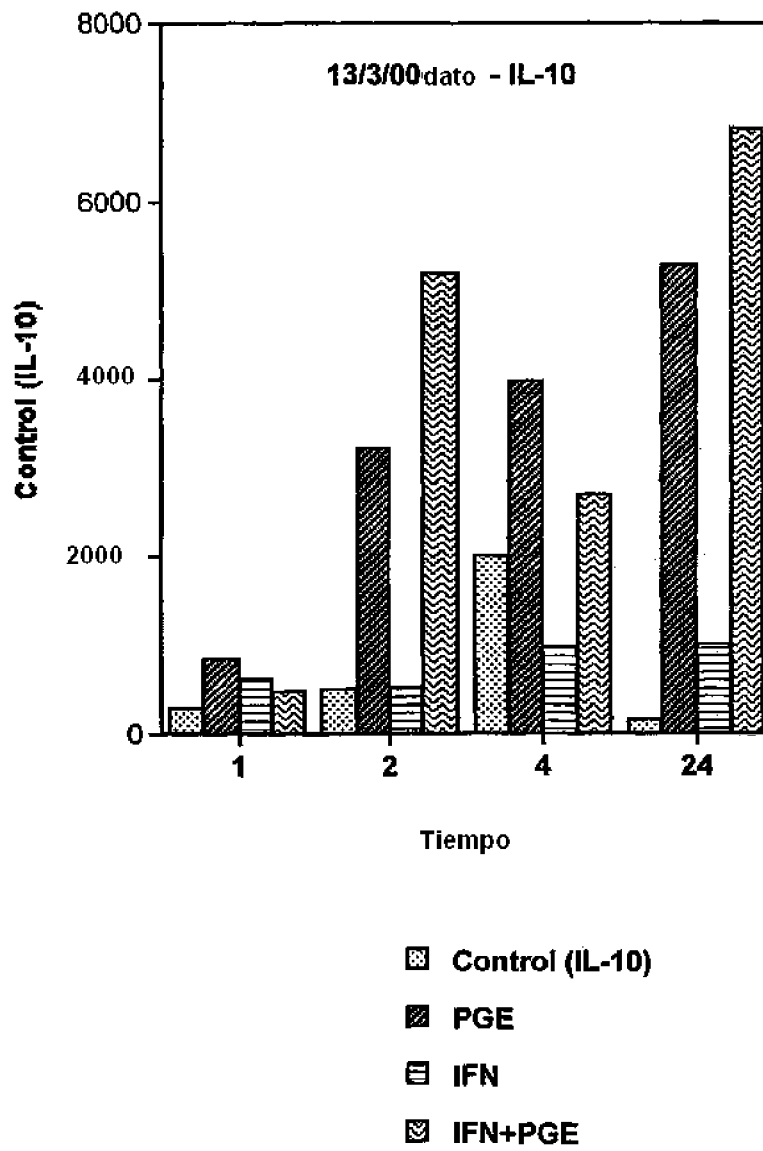


Figura 2A

media \pm esm IL10 mensaje relativo para su control en 20 horas

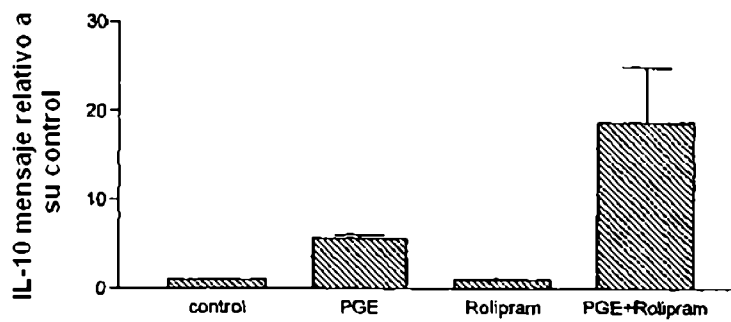


Figura 2B

IL-10 mensaje en presencia de LPS

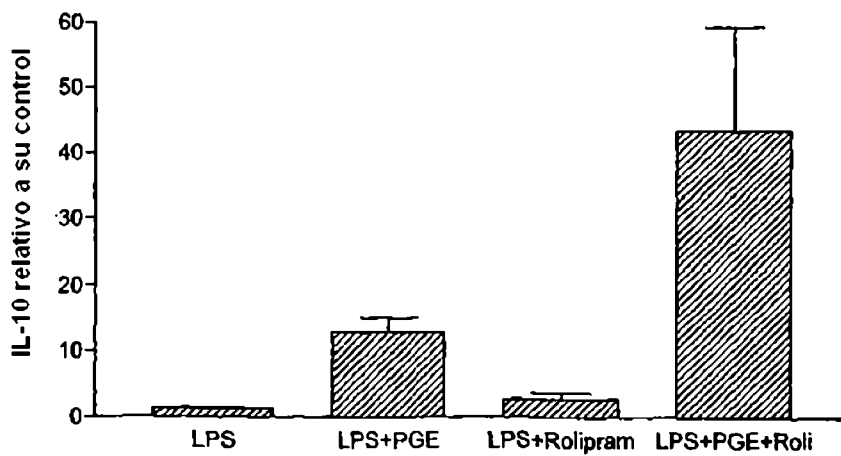


Figura 2C

IL-10 liberada en presencia de LPS

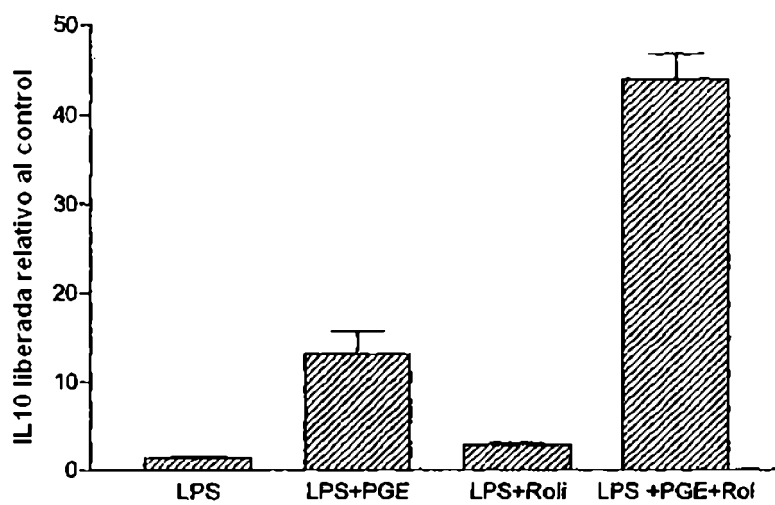
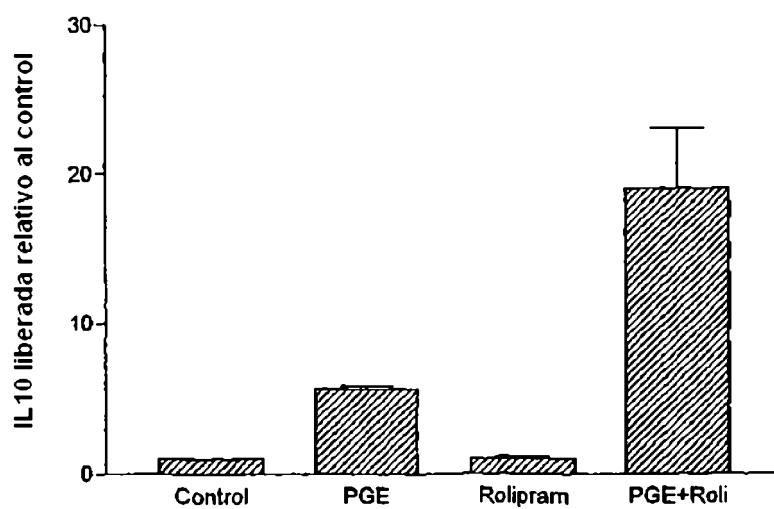


Figura 2D

IL-10 liberada sin LPS



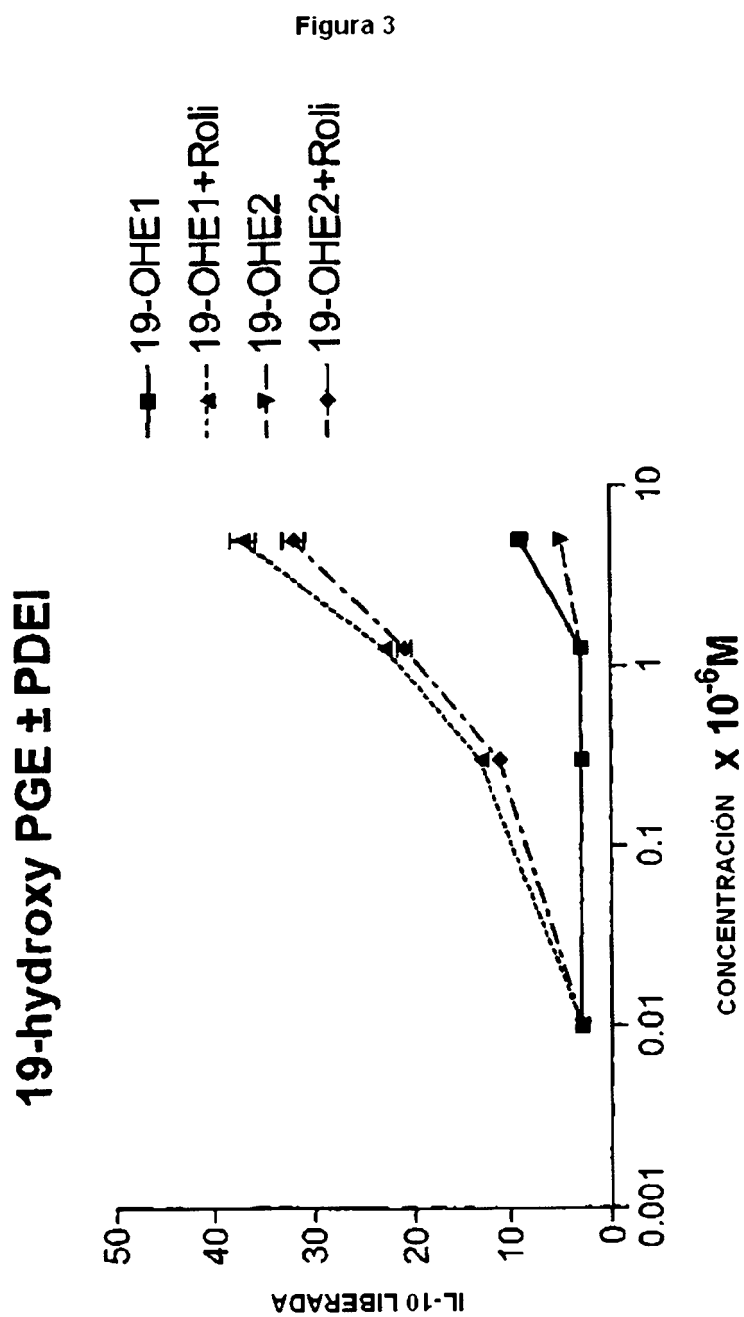


Figura 4

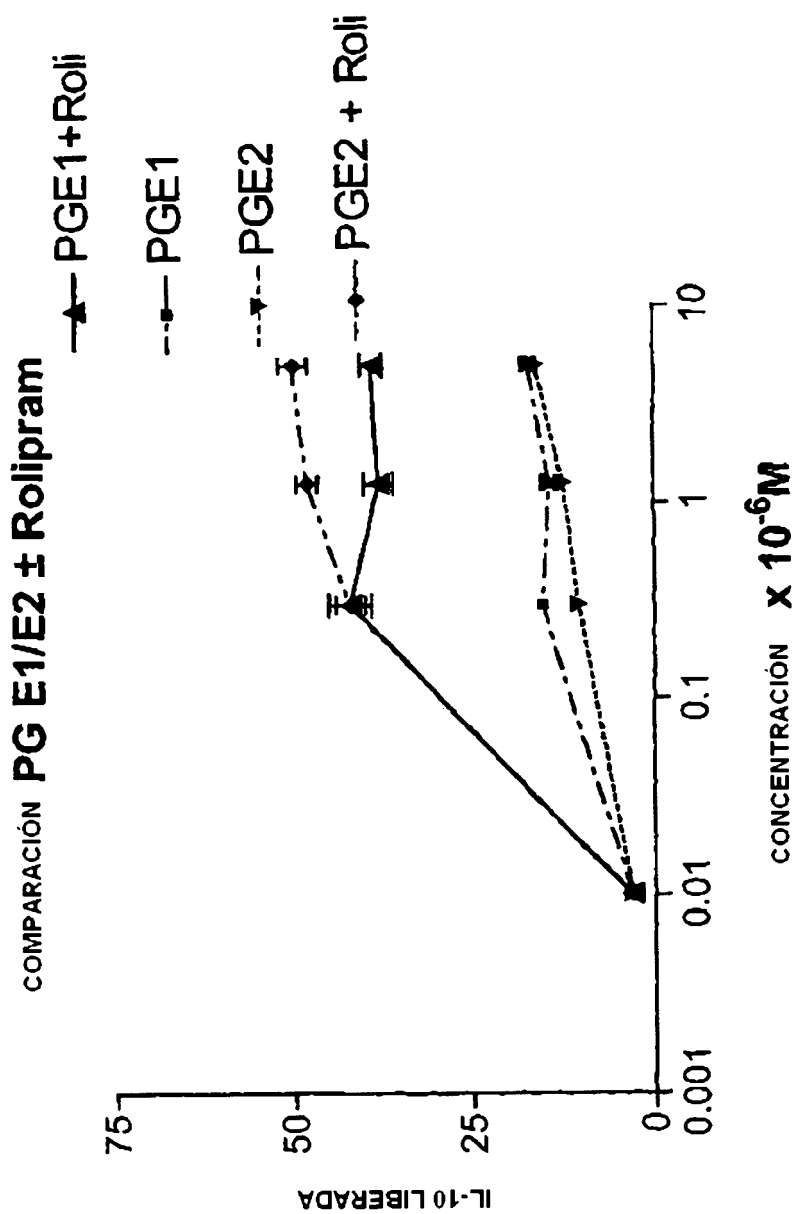


Figura 5

