

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 371 635**

51 Int. Cl.:  
**A61K 31/417** (2006.01)  
**A61K 31/436** (2006.01)  
**A61K 39/395** (2006.01)  
**A61P 37/06** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03783737 .4**  
96 Fecha de presentación: **21.11.2003**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1562571**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **17.08.2005**

54 Título: **COMBINACIÓN DE UN DERIVADO DE DIAMIDA Y AGENTES INMUNOSUPRESORES PARA INHIBIR EL RECHAZO DE TRANSPLANTES.**

30 Prioridad:  
**21.11.2002 US 428328 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**05.01.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**05.01.2012**

73 Titular/es:  
**GENZYME CORPORATION  
500 KENDALL STREET  
CAMBRIDGE, MA 02142, US**

72 Inventor/es:  
**WILLIAMS, John, M.**

74 Agente: **Lehmann Novo, Isabel**

ES 2 371 635 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**

Combinación de un derivado de diamida y agentes inmunosupresores para inhibir el rechazo de trasplantes

**SOLICITUDES RELACIONADAS**

5 Esta solicitud reivindica el beneficio de la Solicitud Provisional de los Estados Unidos nº 60/428.328, presentada el 21 de noviembre de 2002.

**ANTECEDENTES DE LA INVENCION**

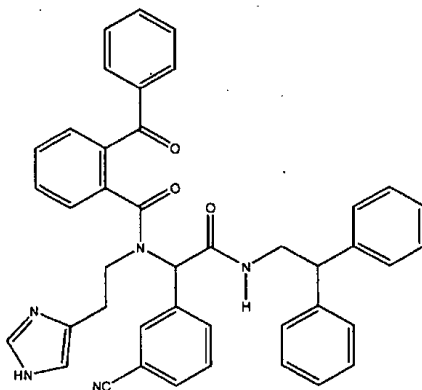
10 La enfermedad autoinmunitaria se produce cuando un sistema inmunitario del sujeto ataca a sus propios tejidos, dando a menudo como resultado una morbilidad grave o muerte. Los ejemplos de tales enfermedades incluyen diabetes dependiente de insulina de tipo 1, esclerosis múltiple, artritis reumatoide y enfermedad inflamatoria del intestino.

15 El sistema inmunitario también puede provocar enfermedad como consecuencia de su reacción a un órgano, tejido o célula transplantada, en la que el órgano, tejido o célula se reconoce como extraño. Típicamente, el órgano o tejido transplantado es reconocido como extraño por el hospedante y es infiltrado por las células inmunitarias del hospedante, las cuales llevan a cabo entonces su función efectora y destruyen el trasplante. Los tratamientos típicos para ayudar a suprimir la respuesta inmunitaria que es provocada por el trasplante extraño incluyen fármacos inmunosupresores tales como corticosteroides, ciclosporina A, rapamicina y FK506, o terapias con anticuerpos tales como anticuerpos anti-células T. Estas terapias no son específicas, y se deben administrar típicamente durante la vida del paciente. Adicionalmente, estas terapias tienen efectos secundarios indeseables, tales como tensión arterial elevada, insuficiencia renal, resistencia reducida a infección, y fiebre. También, los costes de estos tratamientos durante toda la vida son bastante caros.

20 En respuesta a los problemas mencionados anteriormente asociados con terapias de inmunosupresión, existe una clara necesidad de terapias más eficaces y menos problemáticas para tratar enfermedades autoinmunitarias y rechazo de órganos o tejidos.

**SUMARIO DE LA INVENCION**

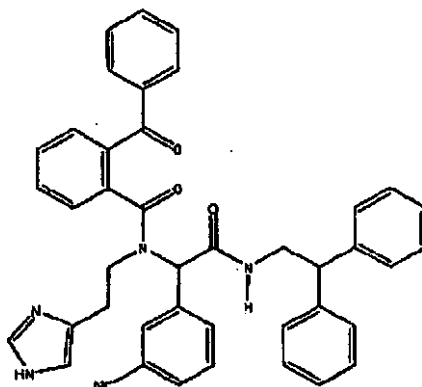
25 Ahora se ha encontrado que el compuesto 1, que se describe más abajo con detalle, y ciertos agentes inmunosupresores (por ejemplo, rapamicina o anticuerpo monoclonal anti-CD40L) actúan sinérgicamente para inhibir el rechazo de trasplantes, e incluso pueden inducir tolerancia inmunitaria específica frente al tejido transplantado. Por ejemplo, la administración de una dosis subterapéutica de rapamicina junto con el Compuesto 1 a ratones con trasplantes de corazón suprimió el rechazo del trasplante durante al menos 100 días (véase el Ejemplo 1). El rechazo no se produjo, incluso después de que se terminó el tratamiento con estos fármacos. Además, se aceptó un segundo trasplante de corazón de la misma raza donante de ratones, mientras que se rechazó un segundo trasplante de corazón de un donante no relacionado (Ejemplo 3). Estos resultados indican que esta terapia de combinación indujo tolerancia inmunitaria específica frente al órgano transplantado, sin provocar supresión inmunitaria no específica. Además, también se encontró que el anticuerpo monoclonal anti-CD40L y el Compuesto 1 actúan sinérgicamente para inhibir el rechazo de trasplante de corazón en ratones. Los ratones tratados con esta combinación no mostraron signo de rechazo después de 100 días (véase el Ejemplo 2). Basándose en estos resultados, se describen aquí usos según las reivindicaciones anejas.



Compuesto 1

40 En una realización, la presente invención se refiere al uso de un compuesto representado por la siguiente fórmula

estructural:

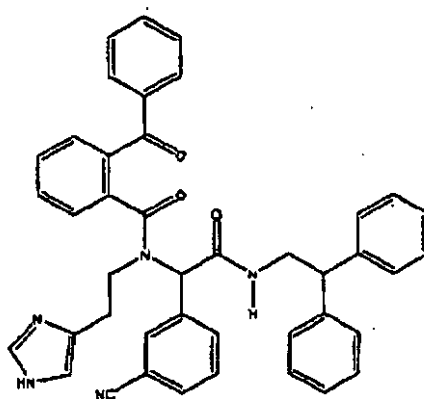


o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo,

- 5 para la fabricación de un medicamento para inhibir el rechazo de un órgano, tejido o célula transplantada, en un mamífero, comprendiendo el medicamento una cantidad efectiva de un agente inmunosupresor y una cantidad efectiva del compuesto de la fórmula anterior, en el que el agente inmunosupresor es un anticuerpo monoclonal anti-CD40L, rapamicina o un anticuerpo anti-linfocito;

y en el que el agente inmunosupresor y el compuesto de la fórmula anterior se pueden formular individualmente o como una mezcla de componentes en una composición farmacéutica adecuada.

- 10 En todavía otra realización, la presente invención se refiere a un compuesto representado por la siguiente fórmula estructural:



- 15 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en combinación con un agente inmunosupresor para uso para inhibir el rechazo de un órgano, tejido o célula transplantada, en un mamífero; en el que el agente inmunosupresor es un anticuerpo monoclonal anti-CD40L, rapamicina o un anticuerpo anti-linfocito;

y en el que el agente inmunosupresor y el compuesto de la fórmula anterior se pueden formular individualmente o como una mezcla de componentes en una composición farmacéutica adecuada.

- 20 En otra realización, la presente invención es una composición que comprende un agente inmunosupresor seleccionado de un anticuerpo monoclonal anti-DC40L, rapamicina y un anticuerpo anti-linfocito, y el Compuesto 1. La composición se puede usar en terapia, por ejemplo para inducir tolerancia inmunitaria específica en un sujeto que lo necesite, para inhibir el rechazo de trasplante de órganos, de tejidos o de células, o para tratar enfermedad autoinmunitaria. Típicamente, la composición comprende una cantidad efectiva de ambos agentes. La composición también se puede usar para la fabricación de un medicamento para inducir tolerancia inmunitaria, tratar el rechazo de trasplante de órganos, de tejidos o de células, y/o enfermedad inmunitaria.

- 25 Los fármacos inmunosupresores usados en la terapia de combinación descritos aquí sinergizan, y por lo tanto son muy efectivos suprimiendo el rechazo de trasplante de órganos. En muchos casos, la combinación induce tolerancia inmunitaria específica frente al tejido transplantado. Como consecuencia, el tratamiento se puede terminar

una vez que se ha inducido la tolerancia, eliminando de ese modo la necesidad de permanecer en un régimen de fármacos inmunosupresores durante toda la vida. Además, el cese de la inmunosupresión permite que el sistema inmunitario reaccione con toda la potencia frente a encuentros con nuevos antígenos.

#### BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

5 La Figura 1 es una gráfica que muestra la tasa de supervivencia de ratones a lo largo del tiempo (en días) tras recibir transplante de corazón. Los ratones se dividieron en cuatro grupos transplantados: 1) ratones sin tratamiento; 2) ratones tratados subcutáneamente con 0,3 mg/kg/día de rapamicina durante tres días después del transplante; 3) ratones tratados intraperitonealmente con 75 mg/kg/día de Compuesto 1 durante dos semanas después del transplante; y 4) ratones tratados subcutáneamente con 0,3 mg/kg/día de rapamicina durante tres días e  
10 intraperitonealmente con 75 mg/kg/día del compuesto de Compuesto 1 durante dos semanas después del transplante. La Figura 1 muestra que el Compuesto 1 tiene sinergia con rapamicina, de manera que se evitó el rechazo de aloinjerto cardíaco para todos los receptores durante al menos 100 días en el modelo de transplante de ratón.

15 La Figura 2 es una gráfica que muestra la tasa de supervivencia de ratones a lo largo del tiempo (en días) después de recibir transplante de corazón. Los ratones se dividieron en cuatro grupos transplantados: 1) ratones sin tratamiento; 2) ratones tratados con una única dosis de anticuerpo monoclonal anti-CD154 (250 µg/ratón) inmediatamente después del transplante; 3) ratones tratados con 75 mg/kg/día de Compuesto 1 durante dos semanas después del transplante; y 4) ratones tratados con una única dosis de 250 µg de anticuerpo monoclonal anti-CD154 inmediatamente después del transplante y 75 mg/kg/día de Compuesto 1 durante dos semanas después  
20 del transplante. La Figura 2 muestra que el Compuesto 1 presenta sinergia con el anticuerpo monoclonal anti-CD154, de tal manera que se evitó el rechazo de aloinjerto cardíaco en todos los receptores durante al menos 100 días en el modelo de transplante de ratón.

#### DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La invención descrita es una terapia de combinación de un fármaco inmunosupresor y el compuesto 1.

25 Se ha encontrado que la terapia de combinación suprime de forma sinérgica el rechazo de transplante de tejido e induce típicamente tolerancia inmunitaria al tejido transplantado.

La expresión “agente inmunosupresor” se refiere a un fármaco que es capaz de suprimir una respuesta inmunitaria, y es preferiblemente un fármaco que suprime una respuesta inmunitaria mediada por células T. Los agentes inmunosupresores se han usado habitualmente después de transplante de tejidos para suprimir el rechazo agudo  
30 del tejido transplantado. Los agentes inmunosupresores según la presente invención son anticuerpos anti-linfocito (por ejemplo, antisuero de linfocitos, anticuerpo monoclonal anti-CD3 y anticuerpo monoclonal anti-CD4), rapamicina, y anticuerpos monoclonales anti-CD40L. La rapamicina y el anticuerpo monoclonal anti-CD40L son los más usados habitualmente en la terapia de combinación descrita.

La expresión “inducir tolerancia inmunitaria” significa hacer al sistema inmunitario (preferiblemente las células T del sistema inmunitario) insensibles o menos sensibles a un antígeno particular sin inducir una deficiencia inmunitaria generalizada prolongada. El término “antígeno” significa una sustancia que es capaz de provocar una respuesta inmunitaria. Para enfermedad autoinmunitaria, “inducir tolerancia inmunitaria” significa hacer al sistema inmunitario insensible o menos sensible frente a un autoantígeno o a otro antígeno que el hospedante reconoce como extraño y  
35 frente al cual el hospedante está generando una respuesta autoinmunitaria. La inducción de este tipo de tolerancia se puede usar para tratar enfermedad autoinmunitaria. Para el transplante, “inducir tolerancia inmunitaria” significa hacer al sistema inmunitario insensible o menos sensible frente a los antígenos en el transplante, el órgano, tejido o células transplantadas.

Las composiciones descritas también se pueden usar para inducir tolerancia frente a otros tipos de agentes que provocan una respuesta inmunitaria indeseada. Por ejemplo, la seguridad y eficacia de una amplia variedad de  
45 agentes terapéuticos potenciales se pueden ver comprometidas por respuestas inmunitarias indeseadas al agente que se administra. La inducción de tolerancia a estos agentes por las composiciones descritas evitará el aclaramiento y la destrucción de estos agentes por el sistema inmunitario, y les permitirá llevar a cabo su función terapéutica. Los ejemplos de tales agentes incluyen proteínas terapéuticas (por ejemplo, anticuerpos, enzimas y similares), fragmentos proteicos y sueros que se obtienen de una especie diferente del hospedante o que  
50 comprenden de otro modo antígenos que son reconocidos como extraños por el sistema inmunitario del hospedante. Otros ejemplos incluyen ciertos agentes usados en terapia génica, por ejemplo vectores víricos. “Inducir tolerancia inmunitaria” a estos antígenos significa hacer al sistema inmunitario insensible o menos sensible al antígeno sin inducir una deficiencia inmunitaria general prolongada.

Otros tipos de antígenos que provocan respuestas inmunitarias indeseadas incluyen ciertos alérgenos o venenos,  
55 particularmente cuando la respuesta inmunitaria provocada por estos antígenos está mediada por las células T. Las composiciones descritas se pueden usar ventajosamente para inducir tolerancia frente a antígenos de estos tipos.

“Inducir tolerancia inmunitaria” a venenos y alérgenos significa hacer al sistema inmunitario insensible o menos sensible al antígeno sin inducir una deficiencia inmunitaria general prolongada.

Como se describe anteriormente, las combinaciones descritas se pueden usar ventajosamente para tratar un mamífero con un trasplante de órgano, de tejido o de célula. El tipo más común de trasplante es un aloinjerto, que es un injerto entre miembros de la misma especie. Las células, tejidos u órganos (o sus partes) que se transplantan típicamente entre miembros de la misma especie incluyen, pero no se limitan a, corazón, pulmón, riñón, hígado, páncreas, islotes pancreáticos, tejido cerebral, córnea, estómago, hueso, médula ósea, músculo, intestino, vejiga, piel y células madre. Opcionalmente, el tejido u órgano transplantado está genéticamente modificado, por ejemplo cuando el tejido u órgano transplantado se hace crecer a partir de una célula madre u otro tipo de célula o células precursoras. El tejido u órgano genéticamente modificado se puede hacer crecer fuera del cuerpo y se puede transplantar directamente en el hospedante. Como alternativa, las células precursoras o el órgano o tejido inmaduro se transplanta en el hospedante para crecer y madurar.

El órgano, tejido o célula o células transplantados también puede ser un xenoinjerto, es decir, el donante es un miembro de una especie diferente de la del receptor. Los xenoinjertos se usan ventajosamente con tejido u órgano genéticamente modificado, el cual, en lugar de ser transplantado directamente en el receptor que necesita el tejido u órgano, se puede transplantar en un hospedante sustituto, tal como un mamífero no humano, hasta que se identifique un receptor humano adecuado que necesite el tejido u órgano genéticamente modificado. Como alternativa, el tejido u órgano se puede transplantar en el sustituto para permitir que el tejido u órgano genéticamente modificado madure. El uso de hospedantes sustitutos puede ser preferido en casos en los que se necesita el desarrollo adicional del tejido u órgano antes del trasplante en un receptor humano. En otra alternativa, un xenoinjerto se usa cuando no está disponible ningún donante de aloinjerto adecuado. Cuando se transplanta en una especie diferente, es deseable seleccionar un hospedante de manera que el tamaño de los órganos en el hospedante y el donante sea similar. Además, el hospedante se selecciona para minimizar la transmisión de enfermedades comunicables.

Las enfermedades autoinmunitarias que se pueden tratar o prevenir mediante las presentes composiciones incluyen, pero no se limitan a, diabetes dependiente de insulina de tipo 1, enfermedad inflamatoria del intestino, esclerosis múltiple, artritis reumatoide, dermatitis, fiebre reumática, enfermedad de Graves, síndrome de Reynaud, hepatitis activa crónica, gastritis atrófica, enfermedad de Addison, síndrome disneico del adulto, meningitis, síndrome de Sjogren, síndrome de Reiter, vasculitis por sarcoidosis, anemia perniciosa, tiroiditis de Hashimoto, celiacía, espondilitis anquilosante, dermatomiositis, pénfigo, penfigoide, vasculitis necrotizante, miastenia grave, lupus eritematoso, deficiencia de adhesión leucocitaria, encefalitis uveítica, polimiositis, granulomatosis, glomerulonefritis, esclerosis sistémica progresiva, artritis psoriásica, púrpura trombocitopénica trombótica, cirrosis binaria primaria, anemia hemolítica autoinmunitaria, complicaciones autoinmunitarias de SIDA, abortos espontáneos habituales, trastornos inflamatorios del sistema nervioso central, enfermedades mediadas por el complejo de antígeno-anticuerpo, esclerosis lateral amiotrófica, tiroidosis, esclerodermia, lupus, y aterosclerosis. Es de esperar que la terapia de combinación descrita sea particularmente beneficiosa cuando se usa para tratar diabetes dependiente de insulina de tipo 1, enfermedad inflamatoria del intestino, esclerosis múltiple o artritis reumatoide.

Un “mamífero que necesita tratamiento para inducir tolerancia inmunitaria” es un mamífero con un trasplante de tejido, un mamífero con una de las enfermedades autoinmunitarias mencionadas anteriormente, o un mamífero con una respuesta inmunitaria indeseada.

Una “cantidad efectiva” de un agente inmunosupresor y un compuesto 1 es una cantidad que logra un grado de inmunosupresión suficiente para retrasar, inhibir, suprimir o moderar el rechazo del trasplante de tejido, y/o retrasar, inhibir, suprimir o moderar uno o más síntomas de una enfermedad autoinmunitaria descrita aquí, y/o retrasar, inhibir, suprimir o moderar una respuesta inmunitaria indeseada a un antígeno extraño tal como una proteína terapéutica, vector vírico, alérgeno, veneno, y similar. Preferiblemente, los dos agentes se usan en dosis adecuadas para inducir tolerancia al antígeno que es la diana de una respuesta inmunitaria indeseada, o, como alternativa, en dosis a las que se produce la sinergia de las actividades inmunosupresoras de los dos agentes. Debido a que muchos agentes inmunosupresores descritos aquí y el compuesto 1 actúan sinérgicamente, en los métodos descritos se pueden usar dosis subterapéuticas, es decir, dosis que son menores que las cantidades que serían efectivas cuando el agente se usa solo. Las dosis subterapéuticas adecuadas de uno o ambos agentes de la terapia de combinación descrita son aquellas que son suficientes, cuando los dos agentes se usan en combinación, para retrasar, inhibir, suprimir o moderar una respuesta inmunitaria indeseada a un antígeno, como se describe anteriormente. El experto será capaz de determinar tales dosis usando experimentación normal, tal como usando modelos de animales. Por lo tanto, una ventaja de la terapia combinada descrita es que el sujeto que está siendo tratado puede en algunos casos ahorrarse los efectos secundarios de mayores niveles de inmunosupresión que resultan de, por ejemplo, corticosteroides e inhibidores de calcineurina.

Las dosis adecuadas del compuesto 1 son típicamente aquellas que se describen en la Solicitud de Patente U.S. Serie nº 09/852.965 y el documento WO 01/87849 de Sneddon *et al.*, “Moduladores de la Señalización de TNF- $\alpha$ ”. Por supuesto, la dosis a usar depende de diversos factores, tales como el mamífero a tratar (ser humano u otro

mamífero, peso, sexo, edad, salud general), la gravedad de los síntomas, el trastorno a tratar, los trastornos concomitantes posibles si los hay, la naturaleza del tratamiento concomitante con otros fármacos, si los hay, o la frecuencia de tratamiento.

5 Típicamente, la terapia de combinación según la invención comprende la administración de una a ocho dosis individuales por día de alrededor de 0.01 mg/kg/día a alrededor de 100 mg/kg/día del agente inmunosupresor, y de  
 10 alrededor de 0,01 mg/kg/día a alrededor de 100 mg/kg/día de compuesto 1. Más habitualmente, se administra alrededor de 0,1 mg/kg/día a alrededor de 10 mg/kg/día del agente inmunosupresor, y de alrededor de 0,1 mg/kg/día a alrededor de 10 mg/kg/día del compuesto 1, y, preferiblemente, alrededor de 0,1 mg/kg/día a alrededor de 10 mg/kg/día del agente inmunosupresor y de alrededor de 0,1 mg/kg/día a alrededor de 1 mg/kg/día del compuesto 1.  
 15 Los agentes inmunosupresores y el compuesto 1 se pueden administrar individualmente, o como una mezcla de componentes en una composición farmacéutica formulada adecuadamente.

El agente inmunosupresor y el compuesto 1 se pueden administrar antes de la exposición al antígeno que provoca la respuesta inmunitaria, mientras el sujeto está siendo expuesto al antígeno, tras la exposición al antígeno, o cualquier combinación de los mismos.

15 La preparación de combinación según la invención también puede incluir paquetes o composiciones de combinación en los que los constituyentes se colocan lado a lado y por lo tanto se pueden administrar simultánea, separada o secuencialmente al mismo ser humano o a otro cuerpo mamífero.

20 Un “mamífero” es preferiblemente un ser humano, pero también puede ser un animal que necesite tratamiento veterinario, por ejemplo animales de compañía (por ejemplo perros, gatos, conejos y similares), animales de granja (por ejemplo vacas, ovejas, cerdos, caballos, y similares) y animales de laboratorio (por ejemplo ratas, ratones, cobayas, y similares).

25 También se pueden usar en las terapias de combinación descritas sales farmacéuticamente aceptables del compuesto 1. La expresión “sales farmacéuticamente aceptables” se refiere a sales preparadas a partir de ácidos no tóxicos farmacéuticamente aceptables. Las sales farmacéuticamente aceptables del compuesto 1 se pueden preparar convenientemente a partir de ácidos no tóxicos farmacéuticamente aceptables, incluyendo ácidos inorgánicos y orgánicos. Tales ácidos incluyen, por ejemplo, bromhídrico, clorhídrico, acético, benzoico, succínico, nítrico, sulfúrico, bencenosulfúrico, canfosulfónico, etanosulfónico, cítrico, fumárico, fosfórico, p-toluenosulfónico, tartárico, láctico, pamoico, metanosulfónico, maleico, málico, mandélico, glucónico, glutámico, isetiónico, mícico, pantoténico, y similar.

30 Las composiciones farmacéuticas para uso según la presente invención se pueden formular así de una manera convencional usando uno o más vehículos fisiológicamente aceptables que comprenden excipientes y auxiliares que facilitan el procesamiento de los compuestos activos en preparaciones que se pueden usar farmacéuticamente. La formulación apropiada depende de la vía de administración escogida. Las técnicas para la formulación y administración de los componentes de la actual solicitud se pueden encontrar en Remington: The Science and  
 35 Practice of Pharmacy. 19ª edición, March Publishing Co., Easton PA. (1995).

Las vías de administración adecuadas pueden incluir, por ejemplo, la administración oral, mediante colirios, rectal, transmucosal, tópica, o intestinal; el suministro parenteral, incluyendo inyecciones intramusculares, subcutáneas, intramedulares, así como inyecciones intratecales, intravenosas intraventriculares directas, intraperitoneales, intranasales, o intraoculares.

40 Para inyección, los agentes de la invención se pueden formular en disoluciones acuosas, preferiblemente en tampones fisiológicamente compatibles, tales como disolución de Hank, disolución de Ringer, o tampón salino fisiológico. Para la administración transmucosal, en la formulación se usan agentes penetrantes apropiados a la barrera a permear. Tales agentes penetrantes son generalmente conocidos en la técnica.

45 Para la administración oral, los compuestos se pueden formular fácilmente combinando los compuestos activos con vehículos farmacéuticamente aceptables bien conocidos en la técnica. Tales vehículos permiten formular los compuestos de la invención como comprimidos, píldoras, grageas, cápsulas, líquidos, geles, jarabes, lechadas, suspensiones, y similares, para ingestión oral por un paciente a tratar. Las preparaciones farmacéuticas para uso oral se pueden obtener combinando el compuesto activo con un excipiente sólido, opcionalmente moliendo una mezcla resultante, y procesando la mezcla de gránulos, después de añadir auxiliares adecuados, si se desea, para  
 50 obtener comprimidos o núcleos de grageas. Los excipientes adecuados incluyen cargas tales como azúcares (por ejemplo lactosa, sacarosa, manitol, o sorbitol), preparaciones de celulosa tales como, por ejemplo, almidón de maíz, almidón de trigo, almidón de arroz, almidón de patata, gelatina, goma de tragacanto, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, carboximetilcelulosa sódica, y/o polivinilpirrolidona (PVP). Si se desea, se pueden añadir agentes disgregantes, tales como la polivinilpirrolidona reticulada, agar, o ácido algínico o una sal del mismo, tal  
 55 como alginato sódico.

Los núcleos de grageas se proporcionan con revestimientos adecuados. Para este fin, se pueden usar disoluciones

de azúcar concentradas, que pueden contener opcionalmente goma arábiga, talco, polivinilpirrolidona, gel de carbopol, polietilenglicol, y/o dióxido de titanio, disoluciones de lacas, y disolventes orgánicos adecuados o mezclas de disolventes. A los comprimidos o a los revestimientos de las grageas se pueden añadir colorantes o pigmentos para la identificación o para caracterizar combinaciones diferentes de dosis de compuestos activos.

- 5 Las preparaciones farmacéuticas que se pueden usar oralmente incluyen cápsulas de ajuste a presión hechas de gelatina, así como cápsulas blandas, cerradas herméticamente, hechas de gelatina y un plastificante, tal como glicerol o sorbitol. Las cápsulas de ajuste a presión pueden contener los ingredientes activos en mezcla con una carga, tal como lactosa, aglutinantes tales como almidones, y/o lubricantes tales como talco o estearato de magnesio, y, opcionalmente, estabilizantes. En las cápsulas blandas, los compuestos activos se pueden disolver o suspender en líquidos adecuados, tales como aceites grasos, parafina líquida, o polietilenglicoles líquidos. Además, se pueden añadir estabilizantes. Todas las formulaciones para la administración oral deberían estar en dosis adecuadas para tal administración.

Para la administración bucal, las composiciones pueden tomar la forma de comprimidos o pastillas para chupar, formulados de manera convencional.

- 15 Para la administración por inhalación, los compuestos para uso según la presente invención se suministran convenientemente en forma de un inhalador de polvo seco, o una presentación de pulverización en aerosol a partir de paquetes a presión o un nebulizador, con el uso de un propelente adecuado, por ejemplo diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano, dióxido de carbono u otro gas adecuado. En el caso de aerosol a presión, la unidad de dosificación se puede determinar proporcionando una válvula para suministrar una cantidad medida. Se pueden formular cápsulas y cartuchos de gelatina para uso en un inhalador o insuflador, que contienen una mezcla en polvo del compuesto y una base en polvo adecuada tal como lactosa o almidón.

- 20 Los compuestos se pueden formular para la administración parenteral mediante inyección, incluyendo inyección de bolo o infusión continua. Las formulaciones para inyección se pueden presentar en forma de dosis unitaria, tal como en ampollas, o en recipientes de múltiples dosis, con un conservante añadido. Las composiciones pueden tomar formas tales como suspensiones, disoluciones o emulsiones en vehículos oleosos o acuosos, y pueden contener agentes formuladores tales como agentes de suspensión, estabilizantes y/o dispersantes.

- 25 Las formulaciones farmacéuticas para administración parenteral incluyen disoluciones acuosas de los compuestos activos en forma soluble en agua. Adicionalmente, las suspensiones de los compuestos activos se pueden preparar como suspensiones para inyección oleosas apropiadas. Los disolventes o vehículos lipófilos adecuados incluyen aceites grasos tales como aceite de sésamo, o ésteres de ácidos grasos sintéticos, tales como oleato de etilo o triglicéridos, o liposomas. Las suspensiones para inyección acuosas pueden contener sustancias que incrementan la viscosidad de la suspensión, tales como carboximetilcelulosa sódica, sorbitol, o dextrano. Opcionalmente, la suspensión también puede contener estabilizantes adecuados o agentes que incrementan la solubilidad de los compuestos para permitir la preparación de disoluciones muy concentradas.

- 30 Como alternativa, el ingrediente activo puede estar en forma de polvo para constitución con un vehículo adecuado, tal como agua estéril libre de pirógenos, antes del uso.

Los compuestos también se pueden formular en composiciones rectales tales como supositorios o enemas de retención, por ejemplo que contienen bases para supositorios convencionales tales como manteca de cacao u otros glicéridos.

- 40 Además de las formulaciones descritas previamente, los compuestos también se pueden formular como una preparación de depósito. Las formulaciones adecuadas de este tipo incluyen formulaciones de hidrogeles poliméricos biocompatibles y biodegradables, usando formulaciones de polisacáridos reticulados o insolubles en agua. También se incluyen formulaciones de polióxido de etileno polimerizables. Las formulaciones de este tipo se describen en las patentes U.S. n<sup>os</sup> 5.410.016, 4.713.448, 4.636.524, 6.083.524, 5.785.993, 4.937.270 y 5.017.229.

- 45 Tales formulaciones de actuación prolongada se pueden administrar mediante implantación, por ejemplo subcutánea o intramuscularmente, o mediante inyección intramuscular. Preferiblemente, se implantan en el microentorno del órgano o tejido transplantado. De este modo, por ejemplo, los compuestos se pueden formular con materiales poliméricos o hidrófobos adecuados, por ejemplo como una emulsión en un aceite aceptable, o resinas de intercambio iónico, o como derivados apenas solubles, por ejemplo como una sal apenas soluble.

- 50 Las composiciones farmacéuticas también pueden incluir vehículos o excipientes adecuados en fase sólida o gel. Los ejemplos de tales vehículos o excipientes incluyen carbonato de calcio, fosfato de calcio, diversos azúcares, almidones, derivados de celulosa, gelatina, y polímeros tales como polietilenglicoles.

- 55 Las composiciones farmacéuticas adecuadas para uso en la presente invención incluyen composiciones en las que los ingredientes activos están contenidos en una cantidad efectiva para lograr el fin pretendido. Más específicamente, una cantidad efectiva, como se define previamente, representa una cantidad adecuada para inducir

tolerancia o suprimir una respuesta inmunitaria, y las cantidades efectivas se describen anteriormente.

La síntesis del compuesto 1 se puede lograr usando metodologías descritas en el documento WO 01/87849 y en la Solicitud de Patente U.S. Serie nº 09/852.965.

La invención se ilustra mediante los siguientes ejemplos, que no pretenden ser limitantes en modo alguno.

## 5 EJEMPLOS

Ejemplo 1. Supresión sinérgica del rechazo de trasplante usando una terapia de combinación de compuesto 1 y rapamicina en un modelo de ratón

Se ensayó la capacidad de una terapia de combinación de rapamicina y Compuesto 1 para inhibir el rechazo de trasplante en un modelo de ratón. Específicamente, se transplantó el corazón de ratones C57/BL6 en ratones receptores Balb/c (desemparejamiento de MHC total) usando el protocolo estándar descrito en Hancock, W.W., *et al.* y Yuan *et al.*, Transplantation 73:1736, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 13967 (1996).

Después de la cirugía, los ratones se dividieron en los siguientes grupos de tratamiento:

el Grupo I es un grupo de control que no se trató.

El Grupo II se trató con Compuesto 1 a una dosis de 75 mg/kg/día, subcutáneamente, durante catorce días después de la cirugía.

El Grupo III se trató con rapamicina a una dosis de 0,3 mg/kg/día, intraperitonealmente, durante tres días tras la cirugía.

El Grupo IV se trató con Compuesto 1 a una dosis de 75 mg/kg/día, intraperitonealmente, durante catorce días tras la cirugía, y con rapamicina a una dosis de 0,3 mg/kg/día, intraperitonealmente, durante tres días después de la cirugía. Es de señalar que esta dosis de rapamicina es alrededor de diez veces menor que la que se usa típicamente para suprimir el rechazo de trasplante.

Los resultados se muestran en la Figura 1. Como se puede observar, los ratones del control que no recibieron tratamiento experimentaron de forma reproducible rechazo de sus corazones transplantados después de sólo diez días. Los ratones que recibieron rapamicina sola o el Compuesto 1 solo mostraron un retraso modesto (dos a tres semanas) pero estadísticamente significativo ( $p < 0,001$ ) en el comienzo del rechazo. Sin embargo, los ratones que recibieron la terapia de combinación del Compuesto 1 y rapamicina tuvieron una supervivencia del injerto de 100% durante alrededor de 100 días, indicando que los dos fármacos actuaron sinérgicamente ( $p < 0,001$ ). De hecho, los animales tratados de esta manera nunca mostraron signos de rechazo agudo, y se sacrificaron a los 120 días después de la cirugía, de manera que el corazón transplantado se pudo analizar histológicamente.

Ejemplo 2. Supresión sinérgica de rechazo de trasplante usando una terapia de combinación de Compuesto 1 y anti-CD40L en un modelo de ratón

La capacidad de una terapia de combinación de anti-CD40L y Compuesto 1 para inhibir el rechazo de trasplante en un modelo de ratón se ensayó según el protocolo del Ejemplo 1 usando una única dosis de 250  $\mu$ g de anti-CD40L administrado intraperitonealmente en lugar de rapamicina. Los resultados se muestran en la Figura 2. Como se puede observar, los ratones que recibieron la terapia de combinación tuvieron una supervivencia del injerto de 100% durante alrededor de 100 días, indicando que los dos fármacos actuaron sinérgicamente ( $p < 0,001$ ). Nuevamente, los animales tratados de esta manera nunca mostraron signos de rechazo agudo, y se sacrificaron a los 120 días después de la cirugía, de manera que el corazón transplantado se pudo analizar histológicamente.

Ejemplo 3. Inducción de tolerancia inmunitaria específica usando una terapia de combinación del Compuesto 1 y rapamicina en un modelo de ratón

Se ensayó la capacidad de una terapia de combinación de rapamicina y el Compuesto 1 para inducir tolerancia inmunitaria específica en un modelo de ratón. Específicamente, se transplantó el corazón de ratones C57/BL6 en ratones receptores Balb/c (desemparejamiento de MHC total) usando el protocolo estándar descrito en Hancock, W.W., *et al.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 13967 (1996) y Yuan *et al.*, Transplantation 73:1736. Después de la cirugía, los ratones se trataron con el Compuesto 1 a una dosis de 75 mg/kg/día, intraperitonealmente, durante catorce días, y con rapamicina a una dosis de 0,3 mg/kg/día, intraperitonealmente, durante tres días. Después del tratamiento, los ratones se dividieron en dos grupos de 2 ratones cada uno. El primer grupo recibió un segundo corazón transplantado procedente de la misma raza donante de ratones; los ratones del segundo grupo recibieron un segundo trasplante de corazón procedente de un donante ajeno sin relación alguna. Los corazones de los ratones en el primer grupo no fueron rechazados, mientras que todos los ratones en el segundo grupo rechazaron los nuevos corazones. Esto indica que la terapia de combinación ciega el sistema inmunitario al aloantígeno inmediatamente de manera cercana durante un período prolongado, pero no da como resultado la ablación



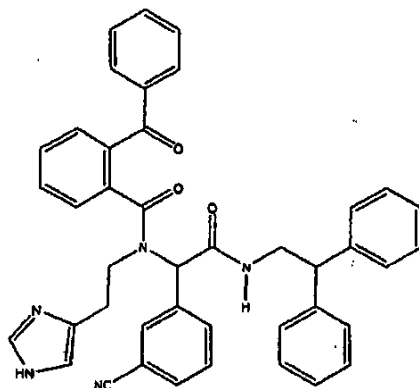
inmunitaria no específica.

Ejemplo 4. Efecto de una terapia de combinación del Compuesto **1** y ciclosporina A en un modelo de ratón

5 La capacidad de una terapia de combinación de ciclosporina y Compuesto **1** para inhibir el rechazo de trasplante en un modelo de ratón se ensayó según el protocolo del Ejemplo 1 usando 10 mg/kg/día de ciclosporina A administrada intraperitonealmente en lugar de rapamicina. Se observó que la combinación de Compuesto **1** y ciclosporina A no pareció ser sinérgica o aditiva con respecto a la prolongación de la supervivencia del aloinjerto.

## REIVINDICACIONES

1. Uso de un compuesto representado por la siguiente fórmula estructural:



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo,

5 para la fabricación de un medicamento para inhibir el rechazo de un órgano, tejido o célula transplantada, en un mamífero, comprendiendo el medicamento una cantidad efectiva de un agente inmunosupresor y una cantidad efectiva del compuesto de la fórmula anterior, en el que el agente inmunosupresor es un anticuerpo monoclonal anti-CD40L, rapamicina o un anticuerpo anti-linfocito;

10 y en el que el agente inmunosupresor y el compuesto de la fórmula anterior se pueden formular individualmente o como una mezcla de componentes en una composición farmacéutica adecuada.

2. El uso de la reivindicación 1, en el que el órgano, tejido o célula transplantada es un corazón, riñón, pulmón, hígado, páncreas, piel o médula ósea transplantada.

3. El uso de la reivindicación 1, en el que el mamífero es el receptor de una célula o células madre transplantadas.

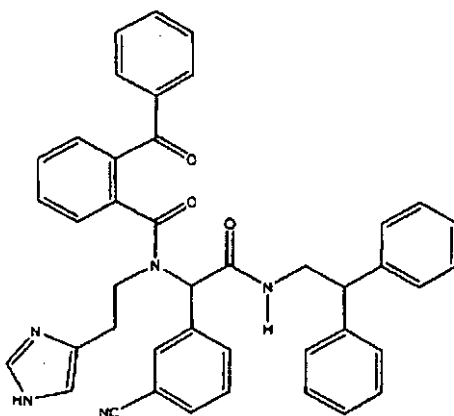
15 4. El uso de la reivindicación 1, en el que el órgano, tejido o célula transplantada es xenogénico o está genéticamente modificado.

5. El uso de la reivindicación 1, en el que el agente inmunosupresor es un anticuerpo anti-linfocito.

6. El uso de la reivindicación 1, en el que el agente inmunosupresor es un anticuerpo monoclonal anti-CD40L.

7. El uso de la reivindicación 1, en el que el agente inmunosupresor es rapamicina.

20 8. Una composición que comprende un agente inmunosupresor y un compuesto representado mediante la siguiente fórmula estructural:



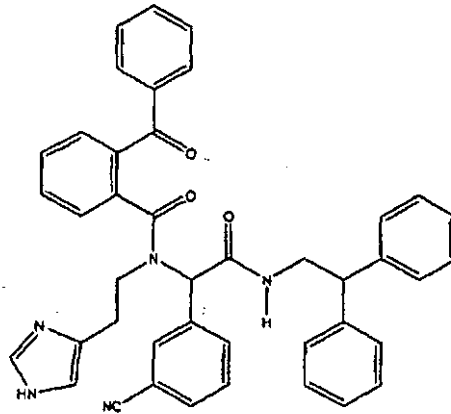
o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en la que el agente inmunosupresor es un anticuerpo monoclonal anti-CD40L, rapamicina o un anticuerpo anti-linfocito.

9. La composición de la reivindicación 8, en el que el agente inmunosupresor es un anticuerpo anti-linfocito.

10. La composición de la reivindicación 8, en el que el agente inmunosupresor es un anticuerpo monoclonal anti-CD40L.

11. La composición de la reivindicación 8, en el que el agente inmunosupresor es rapamicina.

5 12. Un compuesto representado mediante la siguiente fórmula estructural:



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en combinación con un agente inmunosupresor para uso para inhibir el rechazo de un órgano, tejido o célula transplantada, en un mamífero; en el que el agente inmunosupresor es un anticuerpo monoclonal anti-CD40L, rapamicina o un anticuerpo anti-linfocito;

10 y en el que el agente inmunosupresor y el compuesto de la fórmula anterior se pueden formular individualmente o como una mezcla de componentes en una composición farmacéutica adecuada.

13. El compuesto en combinación con el agente inmunosupresor de la reivindicación 12 para uso según la reivindicación 12, en el que el agente inmunosupresor es un anticuerpo anti-linfocito.

15 14. El compuesto en combinación con el agente inmunosupresor de la reivindicación 12 para uso según la reivindicación 12, en el que el agente inmunosupresor es un anticuerpo monoclonal anti-CD40L.

15. El compuesto en combinación con el agente inmunosupresor de la reivindicación 12 para uso según la reivindicación 12, en el que el agente inmunosupresor es rapamicina.

El Compuesto 1 proporciona acción sinérgica con rapamicina: evita totalmente el rechazo de aloinjerto de corazón de ratón

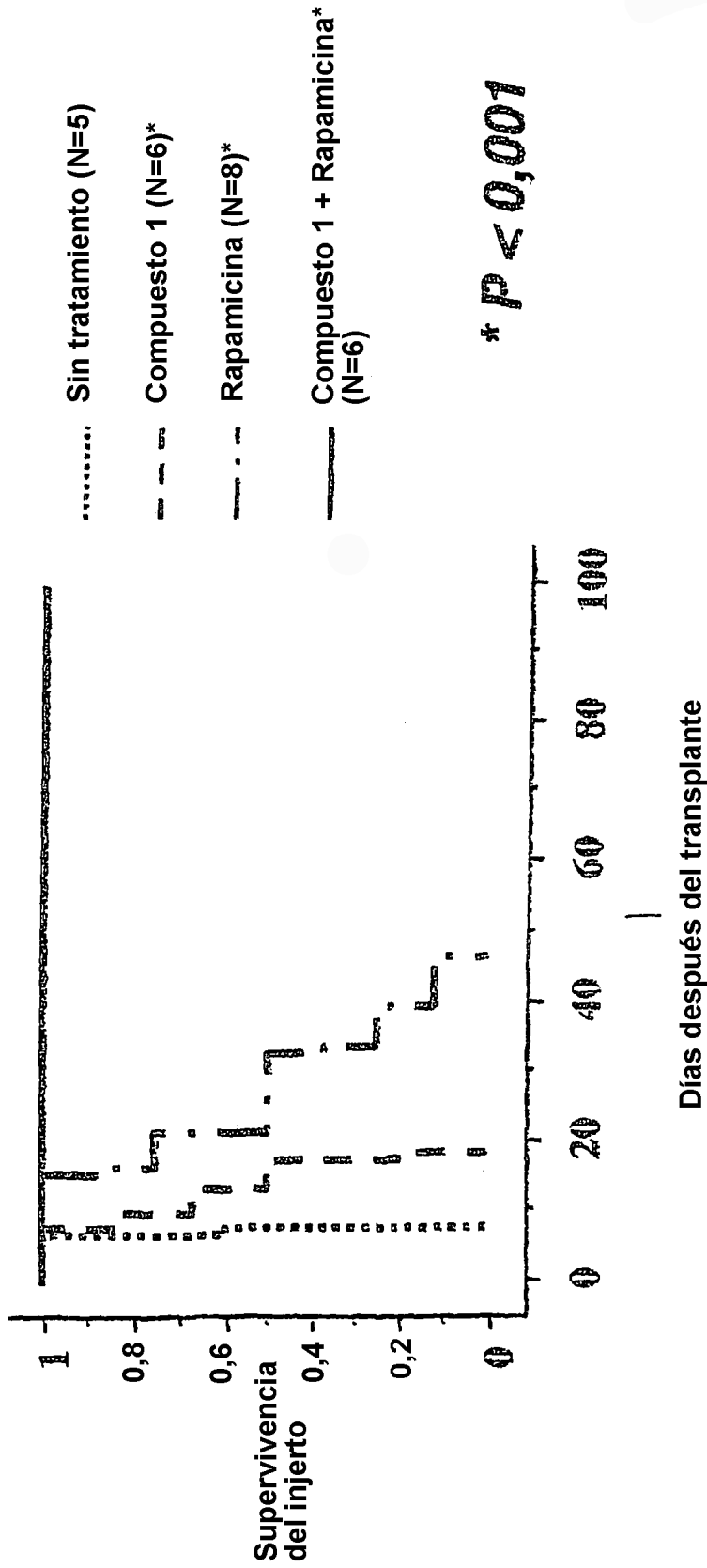
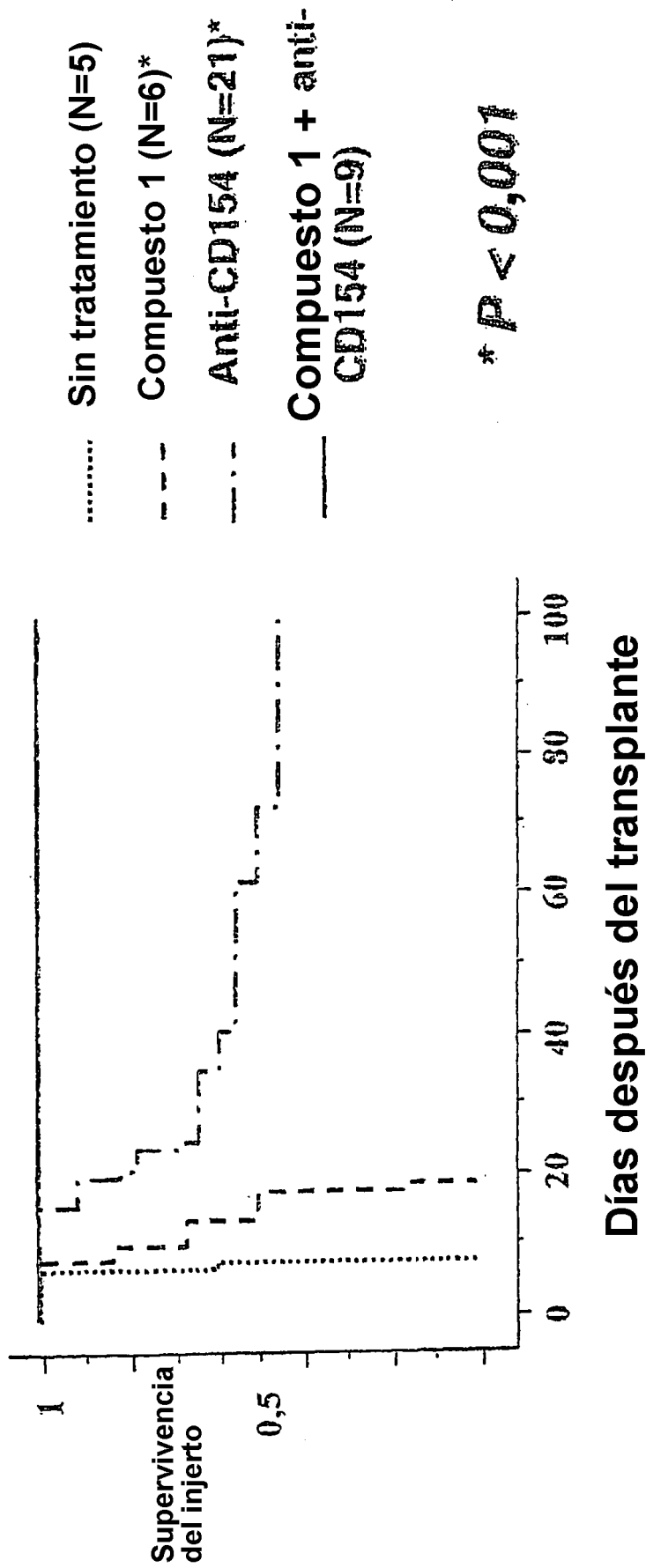


Figura 1

El Compuesto 1 proporciona acción sinérgica con el bloqueo de CD154 para evitar el rechazo de aloinjerto cardíaco en modelo de aloinjerto cardíaco completamente desemparejado



**Figura 2**