

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 403 558**

51 Int. Cl.:

A61K 31/7076 (2006.01)

A61K 31/7064 (2006.01)

A61P 19/02 (2006.01)

A61P 37/06 (2006.01)

A61P 43/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.08.2005** **E 05775408 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.11.2012** **EP 1799230**

54 Título: **Inhibidores purínicos y pirimidínicos de CDK y su uso para el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias**

30 Prioridad:

27.08.2004 GB 0419175

27.08.2004 GB 0419176

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
20.05.2013

73 Titular/es:

CYCLACEL LIMITED (100.0%)

6-8 UNDERWOOD STREET

LONDON N1 7JQ, GB

72 Inventor/es:

BENIGNI, ARIELA;

ZOJA, CARLA;

REMUZZI, GIUSEPPE y

GIANNELLA-BORRADORI, ATHOS

74 Agente/Representante:

PÉREZ BARQUÍN, Eliana

ES 2 403 558 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

Inhibidores purínicos y pirimidínicos de CDK y su uso para el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias

- 5 La presente invención se refiere a compuestos para uso en un procedimiento de tratamiento de enfermedades asociadas a anticuerpos antinucleares. Más específicamente, pero no exclusivamente, la invención se refiere a compuestos para uso en procedimientos de tratamiento de enfermedades reumáticas autoinmunitarias tales como

lupus sistémico eritematoso (LSE) humano y a composiciones farmacéuticas y combinaciones de los mismos.

10 Antecedentes de la invención

El fin del sistema inmunitario es proteger al cuerpo de sustancias potencialmente dañinas (antígenos) tales como microorganismos, toxinas, células cancerosas y sangre o tejidos extraños de otra persona o especie. Los antígenos se destruyen por la respuesta inmunitaria, que incluye la producción de anticuerpos (moléculas que se unen al

- 15 antígeno y lo hacen más sensible a la destrucción) y linfocitos sensibilizados (leucocitos especializados que reconocen y destruyen antígenos particulares).

Los trastornos del sistema inmunitario aparecen cuando la respuesta inmunitaria es inapropiada, excesiva o ausente. Trastornos autoinmunitarios designa cualquier enfermedad caracterizada por un funcionamiento anormal del sistema inmunitario que cause que el sistema inmunitario produzca anticuerpos contra sus propios tejidos. Esto

- 20 está causado por una reacción de hipersensibilidad en que el sistema inmunitario reacciona ante sustancias que normalmente ignoraría, concretamente, tejidos corporales "propios" normales.

Normalmente, el sistema inmunitario es capaz de diferenciar el tejido "propio" del "no propio". Algunas células del sistema inmunitario (linfocitos) se sensibilizan frente a células de tejido "propias", pero estos linfocitos defectuosos habitualmente se controlan (suprimen) por otros linfocitos. Los trastornos autoinmunitarios aparecen cuando se

- 25 perturba el proceso de control normal, o si el tejido se altera de modo que no se reconozca ya como "propio".

Los trastornos autoinmunitarios dan típicamente como resultado la destrucción de uno o más tipos de tejido corporal, el crecimiento anormal de un órgano o cambios en la función del órgano. El trastorno puede afectar solo a un órgano o

- 30 tejido o puede afectar a múltiples órganos y tejidos. Los órganos y tejidos afectados comúnmente por trastornos autoinmunitarios incluyen componentes sanguíneos tales como eritrocitos, vasos sanguíneos, tejidos conectivos, glándulas endocrinas tales como tiroides o páncreas, órganos tales como riñón o hígado, músculos, articulaciones y piel.

Los ejemplos de trastornos autoinmunitarios o relacionados con autoinmunidad incluyen: tiroiditis de Hashimoto, anemia perniciosa, enfermedad de Addison, diabetes de tipo I, artritis reumatoide, lupus sistémico eritematoso, dermatomiositis, síndrome de Sjogren, lupus eritematoso inducido por fármacos, esclerosis múltiple, miastenia

- 35 grave, síndrome de Reiter y enfermedad de Grave.

Los síntomas de enfermedades autoinmunitarias varían ampliamente dependiendo del tipo de enfermedad. Sin embargo, los trastornos autoinmunitarios están asociados a menudo a síntomas inespecíficos tales como fatiga, mareos, malestar (sensación inespecífica de no sentirse bien), fiebre y elevaciones de temperatura de bajo grado.

- 40

La enfermedad autoinmunitaria específica da como resultado la destrucción de un órgano o tejido, dando como resultado un funcionamiento reducido de un órgano o tejido (por ejemplo, las células de islotes pancreáticos se destruyen en la diabetes) y/o un aumento de tamaño de un órgano o tejido (por ejemplo, agrandamiento de tiroides en enfermedad de Grave). Los síntomas varían dependiendo del trastorno específico y del órgano o tejido afectado.

- 45

La autoinmunidad se controla mediante una supresión equilibrada del sistema inmunitario. El objetivo es reducir la respuesta inmunitaria contra el tejido corporal normal dejando intacta la respuesta inmunitaria contra microorganismos y tejidos anormales. Los tratamientos clínicos para enfermedades autoinmunitarias implican típicamente el uso de corticosteroides e inmunosupresores (incluyendo ciclofosfamida o azatioprina) que reducen la

- 50 respuesta inmunitaria. Sin embargo, muchos de los tratamientos disponibles hasta la fecha están asociados a efectos secundarios adversos graves.

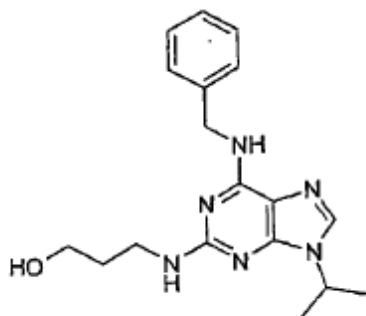
La presente invención busca proporcionar compuestos alternativos para uso en procedimientos terapéuticos para tratar enfermedades autoinmunitarias que idealmente sean capaces de reducir los síntomas y controlar el proceso autoinmunitario manteniendo la capacidad de luchar contra la enfermedad. Más particularmente, la invención se refiere a compuestos para uso en el tratamiento de enfermedades asociadas a anticuerpos antinucleares, especialmente a enfermedades autoinmunitarias tales como lupus sistémico eritematoso humano. La invención

- 55 busca también proporcionar combinaciones y composiciones farmacéuticas adecuadas para tratar dichos trastornos.

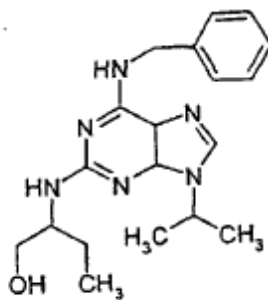
Exposición de la invención

Un primer aspecto de la invención se refiere al uso de un inhibidor purínico de CDK2 y/o CDK7 y/o CDK9

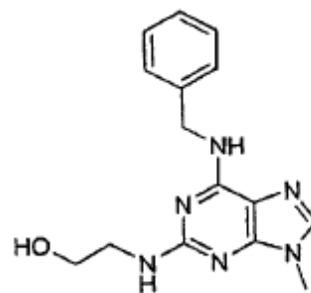
- 65 seleccionado de



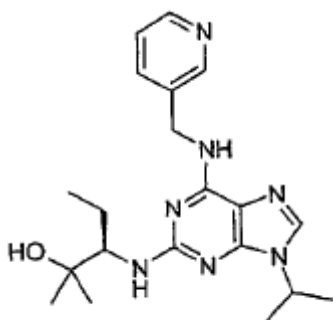
[1]



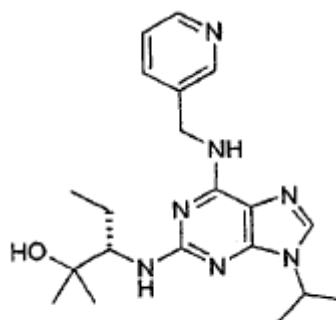
[2]



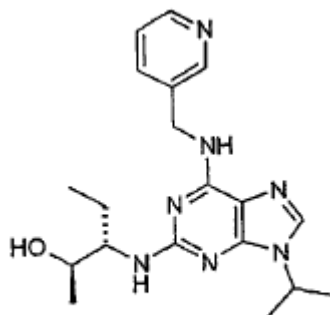
[3]



[5]



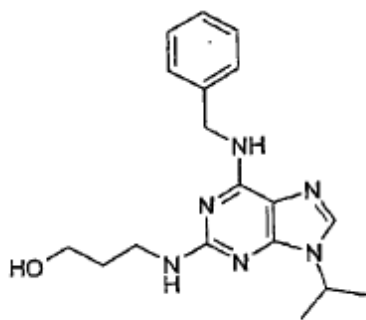
[6]



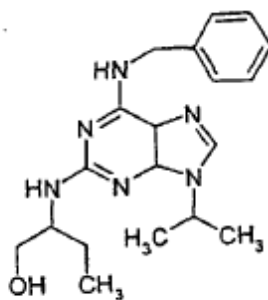
[8]

- 5 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en la preparación de un medicamento para tratar lupus inducido por fármacos o lupus sistémico eritematoso (LSE).

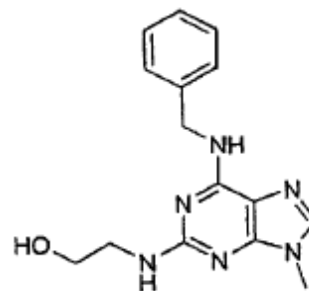
Un segundo aspecto de la invención se refiere a una combinación que comprende un inhibidor purínico de CDK2 y/o CDK7 y/o CDK9 seleccionado de:



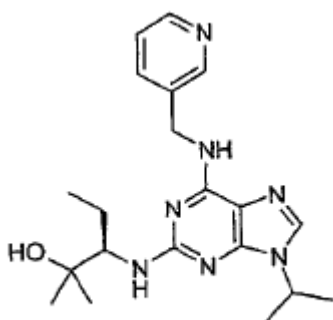
[1]



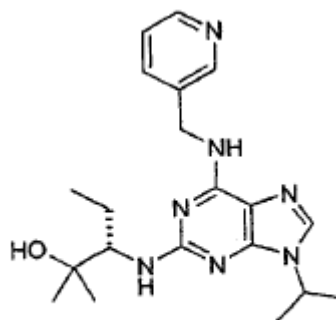
[2]



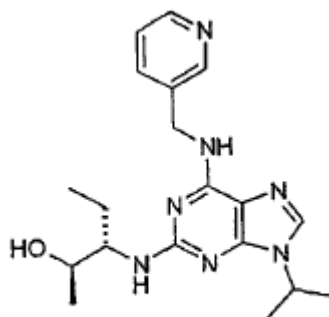
[3]



[5]



[6]

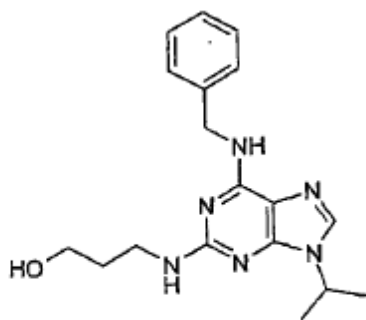


[8]

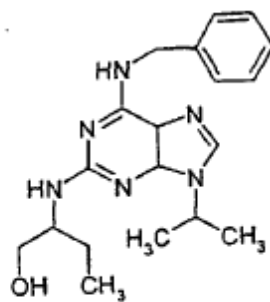
- 5 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y metilprednisolona.

Un tercer aspecto de la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende la combinación anterior y un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

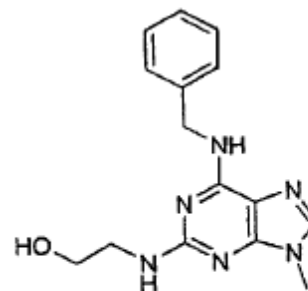
- 10 Un cuarto aspecto de la invención se refiere a un producto farmacéutico que comprende un inhibidor purínico de CDK2 y/o CDK7 y/o CDK9 seleccionado de



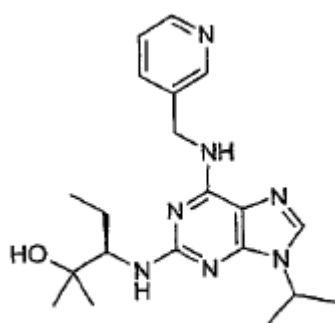
[1]



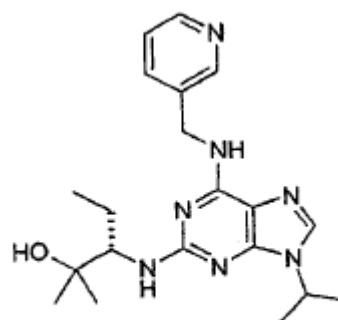
[2]



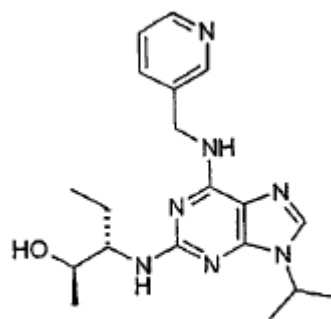
[3]



[5]



[6]

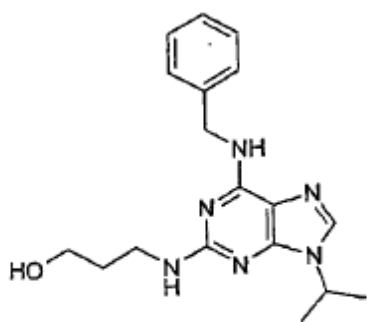


[8]

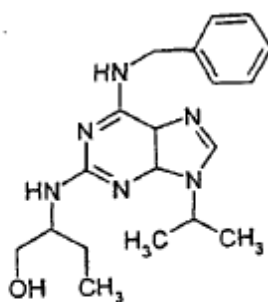
5 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y metilprednisolona como preparación combinada para uso simultáneo, secuencial o separado en terapia.

Un quinto aspecto de la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende:

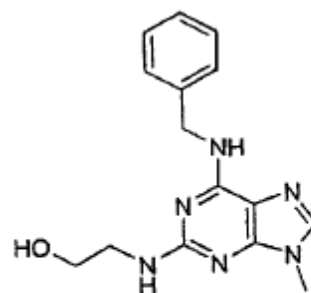
10 (i) un inhibidor purínico de CDK2 y/o CDK7 y/o CDK9 seleccionado de



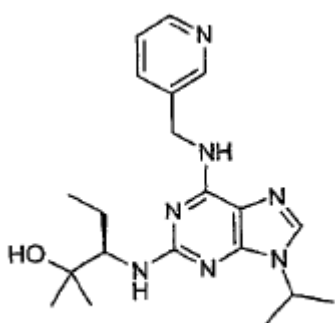
[1]



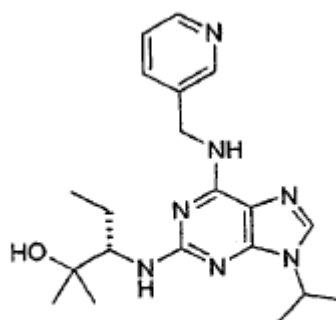
[2]



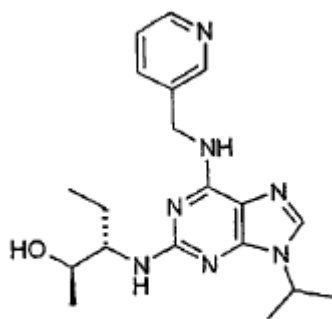
[3]



[5]



[6]



[8]

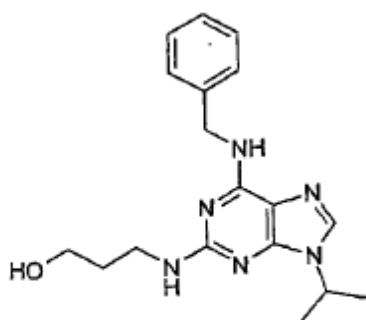
5 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; y

(ii) metilprednisolona;

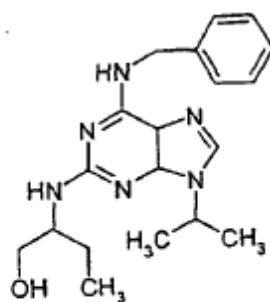
mezclados con un diluyente, excipiente o vehículo farmacéuticamente aceptable.

10

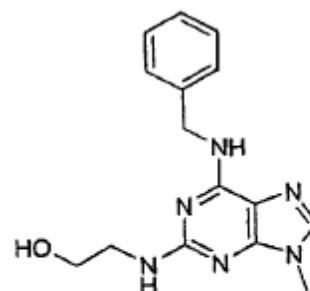
Un sexto aspecto de la invención se refiere al uso de un inhibidor purínico de CDK2 y/o CDK7 y/o CDK9 seleccionado de



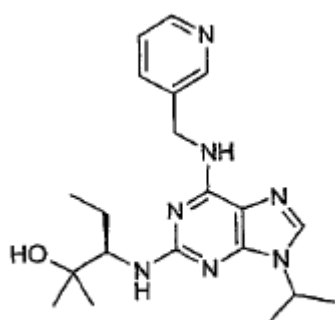
[1]



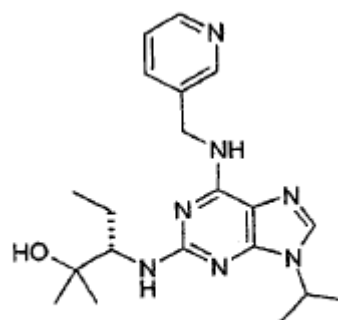
[2]



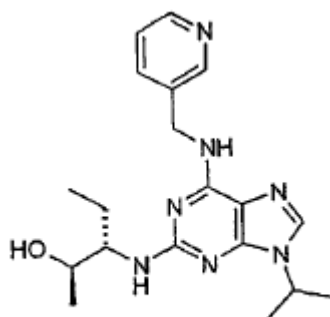
[3]



[5]



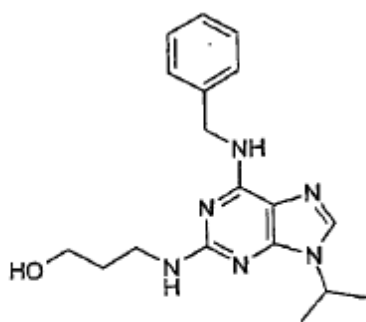
[6]



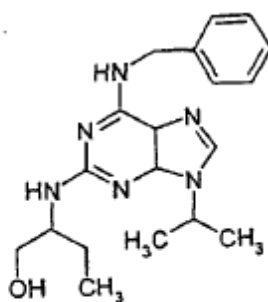
[8]

5 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en la preparación de un medicamento para tratar lupus inducido por fármacos o lupus sistémico eritematoso (LSE), en el que el medicamento es para uso en combinación con metilprednisolona.

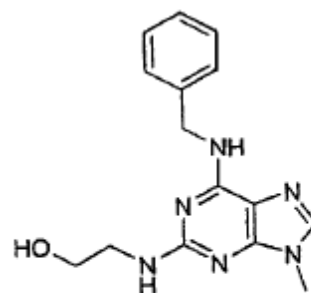
10 Un séptimo aspecto de la invención se refiere al uso de metilprednisolona en la preparación de un medicamento para tratar lupus inducido por fármacos o lupus sistémico eritematoso (LSE), en el que el medicamento es para uso en combinación con un inhibidor purínico de CDK2 y/o CDK7 y/o CDK9 seleccionado de



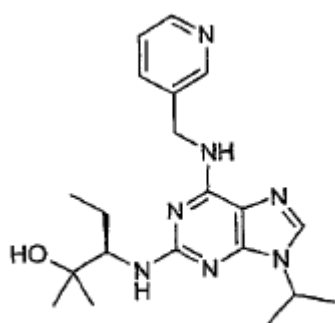
[1]



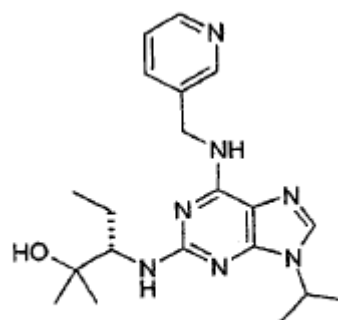
[2]



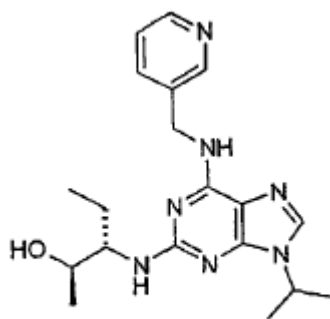
[3]



[5]



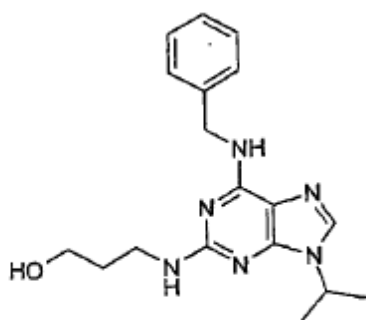
[6]



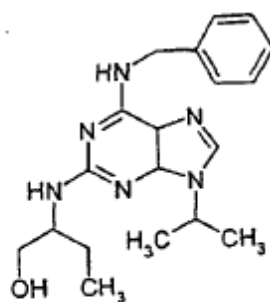
[8]

5 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

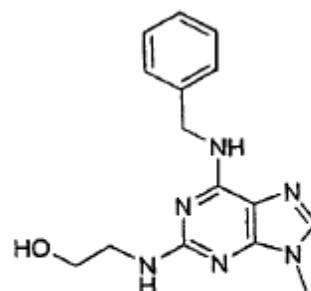
Un octavo aspecto de la invención se refiere al uso de un inhibidor purínico de CDK2 y/o CDK7 y/o CDK9 seleccionado de



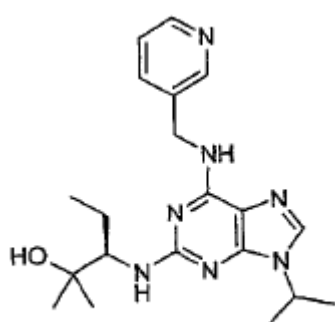
[1]



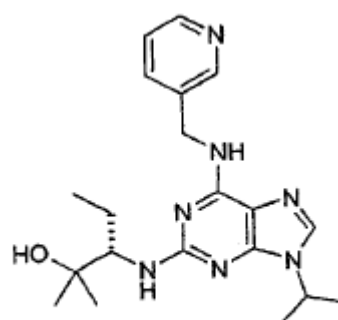
[2]



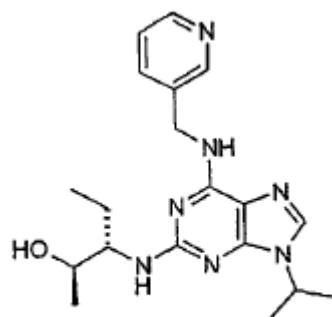
[3]



[5]



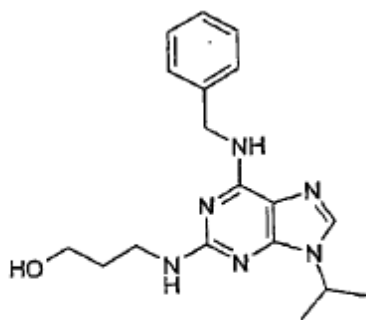
[6]



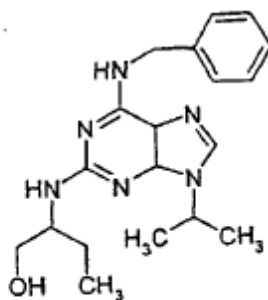
[8]

- 5 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y metilprednisolona, en la preparación de un medicamento para tratar lupus inducido por fármacos o lupus sistémico eritematoso (LSE).

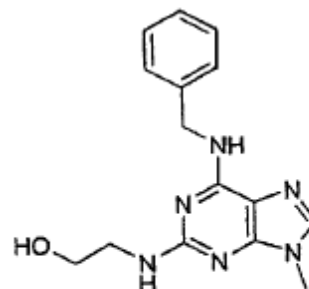
Un noveno aspecto se refiere al uso de un inhibidor purínico de CDK2 y/o CDK7 y/o CDK9 seleccionado de



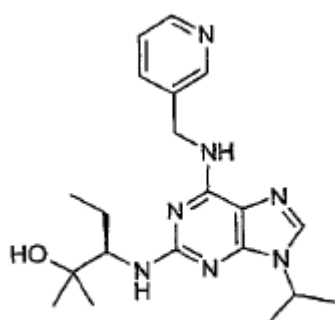
[1]



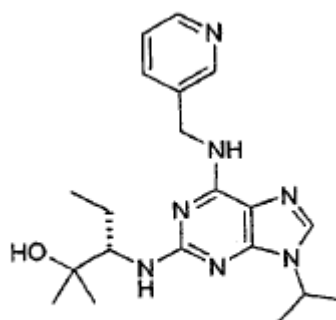
[2]



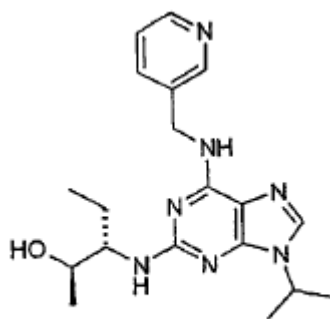
[3]



[5]

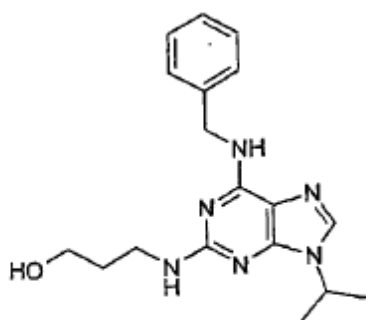


[6]

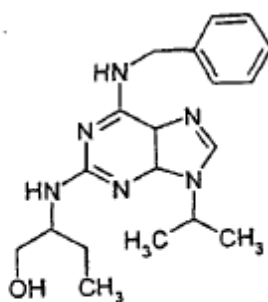


[8]

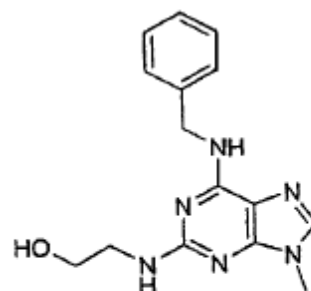
- 5 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en la preparación de un medicamento para el tratamiento de lupus inducido por fármacos o lupus sistémico eritematoso (LSE), en el que dicho tratamiento comprende administrar a un sujeto simultánea, secuencial o separadamente el inhibidor purínico de CDK2 y/o CDK7 y/o CDK9, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y metilprednisolona.
- 10 Un décimo aspecto de la invención se refiere a un inhibidor purínico de CDK2 y/o CDK7 y/o CDK9 seleccionado de



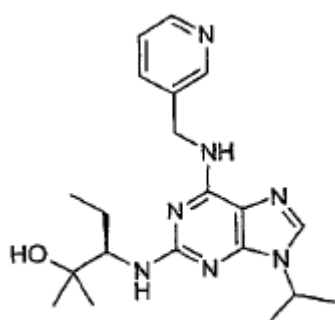
[1]



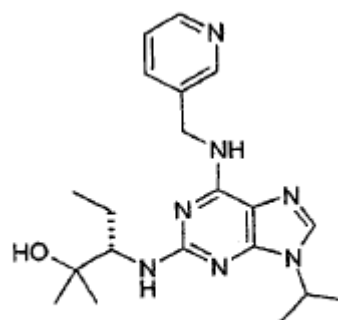
[2]



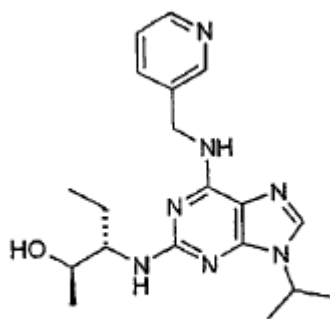
[3]



[5]



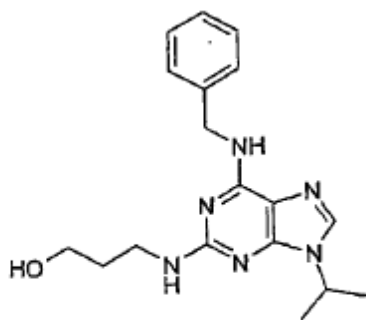
[6]



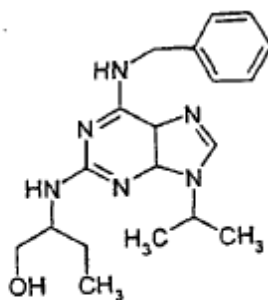
[8]

- 5 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para uso en el tratamiento de lupus inducido por fármacos o lupus sistémico eritematoso.

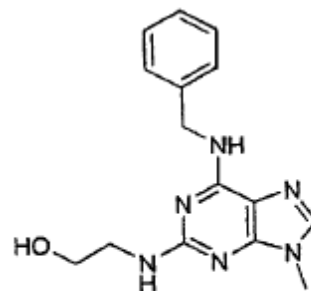
Un undécimo aspecto de la invención se refiere a un inhibidor purínico de CDK2 y/o CDK7 y/o CDK9 seleccionado de



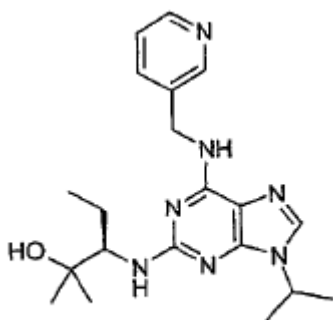
[1]



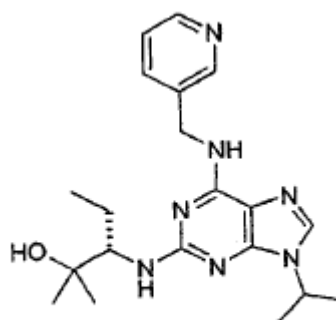
[2]



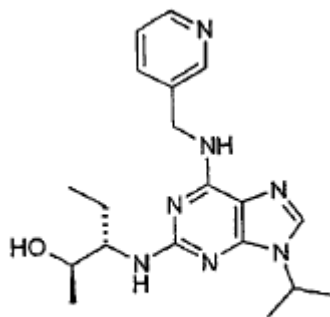
[3]



[5]



[6]



[8]

- 5 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y metilprednisolona, para uso en el tratamiento de lupus inducido por fármacos o lupus sistémico eritematoso.

Por facilidad de referencia, se examinan ahora estos y otros aspectos de la presente invención en los títulos de sección apropiados. Sin embargo, las enseñanzas en cada sección no están necesariamente limitadas a cada

10

Descripción detallada

INHIBIDORES DE CDK2 Y/O CDK7 Y/O CDK9

15

La presente invención se refiere al uso de uno o más inhibidores purínicos de CDK2 y/o CDK7 y/o CDK9 seleccionados de los expuestos anteriormente. Para evitar dudas, el inhibidor puede ser un inhibidor de cualquiera de CDK2, CDK7 o CDK9 o cualquier combinación de los mismos.

20

En una realización preferida, el inhibidor es un inhibidor de CDK2.

En otra realización preferida, el inhibidor es un inhibidor de CDK7.

En otra realización preferida, el inhibidor es un inhibidor de CDK9.

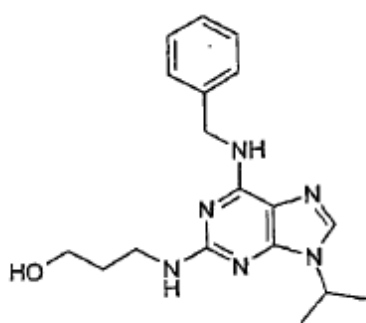
En otra realización preferida, el inhibidor es un inhibidor de CDK7 y CDK9.

- 5 Los procedimientos para ensayar la actividad de CDK serán familiares para el experto en la materia. Se esbozan detalles adicionales en la sección de ejemplos adjunta.

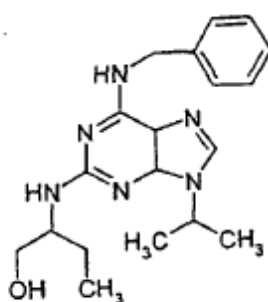
Preferiblemente, el inhibidor exhibe un valor de CI_{50} para uno o más de CDK2, CDK7 o CDK9 de menos de 1 mM, más preferiblemente de menos de 100 μ M, más preferiblemente aún de menos de 50 μ M, más preferiblemente de menos de 25 μ M, más preferiblemente de menos de 10 μ M, incluso más preferiblemente de menos de 1 mM o μ 0,5 o 0,1 μ M.

Se dan a conocer inhibidores purínicos de CDK2 y/o CDK7 y/o CDK9 en los documentos EP 0874847B (CNRS), WO 03/002565 (Cyclacel Limited), WO 04/016613 (Cyclacel Limited) y WO 04/016612 (Cyclacel Limited).

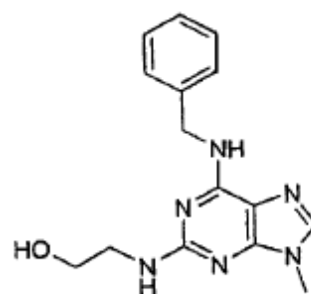
15 En el contexto de la presente invención, se selecciona el inhibidor de CDK2 y/o CDK7 y/o CDK9 de los siguientes:



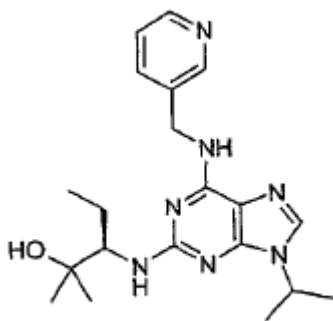
[1]



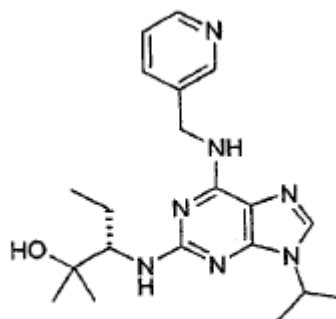
[2]



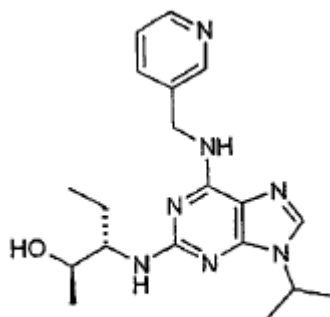
[3]



[5]



[6]



[8]

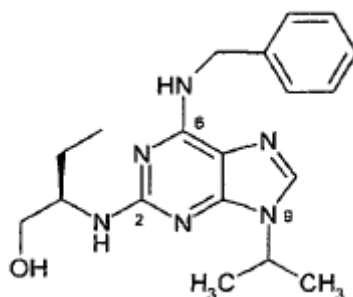
20 y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.

Hasta la fecha, no ha habido sugerencias de que los inhibidores de CDK2 y/o CDK7 y/o CDK9 fueran eficaces para reducir el nivel de anticuerpos antinucleares. Ni ha habido ninguna enseñanza ni sugerencia en la materia de que dichos inhibidores pudieran usarse en terapia de combinación con metilprednisolona en el tratamiento de trastornos autoinmunitarios.

En una realización incluso más preferida de la invención, el inhibidor de CDK2 y/o CDK7 y/o CDK9 es roscovitina.

La roscovitina o 2-[(1-etil-2-hidroxietil)amino]-6-bencilamino-9-isopropilpurina se describe también como 2-(1-D,L-hidroximetilpropilamino)-6-bencilamino-9-isopropilpurina. Como se usa en la presente memoria, el término "roscovitina" engloba los enantiómeros R y S resueltos, mezclas de los mismos y el racemato de los mismos.

Como se usa en la presente memoria, el término "CYC202" designa el enantiómero R de roscovitina, a saber 2-(1-R-hidroximetilpropilamino)-6-bencilamino-9-isopropilpurina, cuya estructura se muestra a continuación.



La actividad *in vitro* de la roscovitina es como sigue:

Cinasa	CI ₅₀ (μM)
Cdk1/ciclina B	2,7
Cdk2/ciclina A	0,7
Cdk2/ciclina E	0,1
Cdk7/ciclina H	0,5
Cdk9/ciclina T1	0,8
Cdk4/ciclina D1	14,2
ERK-2	1,2
PKA	>50
PKC	>50

Aunque el uso de roscovitina en el tratamiento de trastornos autoinmunitarios está documentando en la materia, hasta la fecha no ha habido sugerencias de que sería eficaz para reducir el nivel de anticuerpos antinucleares. Ni ha habido ninguna enseñanza o sugerencia en la materia de que la roscovitina pudiera usarse en terapia de combinación con metilprednisolona en el tratamiento de trastornos autoinmunitarios.

Para todas las realizaciones de la invención, la roscovitina está preferiblemente en forma del enantiómero R, a saber 2-(1-R-hidroximetilpropilamino)-6-bencilamino-9-isopropilpurina, designada de aquí en adelante como "CYC202".

ACTIVIDAD TERAPÉUTICA

Como se menciona anteriormente, la presente invención se refiere al uso de los inhibidores de CDK2 y/o CDK7 y/o CDK9 anteriormente descritos, o a sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, en la preparación de un medicamento para tratar lupus inducido por fármacos o LSE. Preferiblemente, se administra el inhibidor de CDK2 y/o CDK7 y/o CDK9, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en una cantidad suficiente para regular negativamente los niveles de anticuerpos antinucleares.

Los anticuerpos antinucleares (ANA) son anticuerpos no habituales, detectables en la sangre, que tienen la capacidad de unirse a ciertas estructuras en el núcleo de las células. Los ANA se encuentran en pacientes cuyo sistema inmunitario puede estar predispuesto a causar inflamación contra sus propios tejidos corporales. Los anticuerpos que se dirigen contra los tejidos propios se designan como autoanticuerpos. La propensión del sistema inmunitario de actuar contra su propio cuerpo se designa como autoinmunidad.

La presencia de anticuerpos antinucleares es un sello de enfermedades autoinmunitarias. Los anticuerpos antinucleares son un grupo diverso de anticuerpos, dirigidos a menudo a complejos celulares grandes que contienen componentes proteicos y de ácidos nucleicos. Los anticuerpos antinucleares de aparición más frecuente reaccionan

con componentes de complejos de ADN-proteína o ARN-proteína [Van Venrooij W.J. *et al.*; Von Mullen C. A. *et al.*]. Los estudios han indicado que la producción de estos autoanticuerpos, que son generalmente anticuerpos de IgG de alta afinidad de título alto, es dependiente de linfocitos T y está activada por el autoantígeno del hospedador [Reichlin M. *et al.*].

Para que una enfermedad se defina como autoinmunitaria, debe mostrarse que el daño de tejido está causado por una respuesta inmunitaria adaptativa ante antígenos propios. Las enfermedades autoinmunitarias pueden mediarse por autoanticuerpos y/o por linfocitos T autorreactivos, y el daño de tejido puede ser el resultado del ataque directo a las células que portan el antígeno, de la formación de complejo inmunitario o de la inflamación local. Los linfocitos T pueden estar implicados directamente en la inflamación o destrucción celular, y son también necesarios para mantener las respuestas de autoanticuerpo. De forma similar, los linfocitos B pueden ser células presentadoras de antígeno importantes para mantener las respuestas de linfocitos T específicas de autoantígeno.

Los linfocitos T CD4 activan selectivamente aquellos linfocitos B que se unen a epítomos que están ligados físicamente con el péptido reconocido por el linfocito T. Por tanto, se requieren tanto linfocitos B autorreactivos como linfocitos T autorreactivos para una enfermedad que implique autoinmunidad.

La producción de anticuerpo antinuclear puede estudiarse solo *in vivo* puesto que la producción de estos anticuerpos requiere un sistema inmunitario disfuncional que comprenda tanto linfocitos B como T, y la incapacidad de seleccionar y destruir células inmunitarias que se autorreconozcan.

Los ensayos *in vitro* de la función de linfocitos T son herramientas de cribado apropiadas para identificar compuestos que puedan tener la capacidad de modular la respuesta inmunitaria en la situación compleja de enfermedad autoinmunitaria. Es uno de dichos ensayos el ensayo de proliferación de linfocitos T, cuyos detalles adicionales se exponen en los ejemplos adjuntos. En enfermedades autoinmunitarias que impliquen la producción de anticuerpo antinuclear, se requiere una función de linfocitos T normales para estimular la producción de autoanticuerpos por linfocitos B. Por consiguiente, los compuestos que afectan a la función de linfocitos T (es una medida de la función de linfocitos T la capacidad de proliferar en respuesta a un estímulo inmunitario) deberían prevenir también la formación de autoanticuerpos al controlar la capacidad de los linfocitos T de comunicarse con los linfocitos B y al prevenir además que los linfocitos T migraran al sitio de daño autoinmunitario.

Como se usa en la presente memoria, el término “anticuerpos antinucleares” incluye tanto anticuerpos anti-ADN y anticuerpos anti-ARN como anticuerpos dirigidos contra componentes proteicos nucleares.

Las enfermedades asociadas a anticuerpos antinucleares incluyen enfermedades reumáticas autoinmunitarias y autoinmunidad específica de órgano.

Preferiblemente, la enfermedad reumática autoinmunitaria se selecciona de lupus inducido por fármacos o lupus sistémico eritematoso (LSE).

Más preferiblemente, la enfermedad reumática autoinmunitaria es lupus sistémico eritematoso (LSE).

LUPUS SISTÉMICO ERITEMATOSO

En una realización preferida, la invención se refiere al tratamiento de lupus sistémico eritematoso (también conocido como lupus eritematoso diseminado, LSE, lupus o lupus eritematoso), que es un trastorno autoinmunitario inflamatorio crónico que puede afectar a muchos sistemas orgánicos incluyendo piel, articulaciones y órganos internos. Aunque las personas con la enfermedad pueden tener muchos síntomas diferentes, algunos de los más comunes incluyen fatiga extrema, articulaciones doloridas o hinchadas (artritis), fiebre idiopática, exantemas cutáneos y problemas renales. Actualmente, no hay cura para el LSE.

La enfermedad afecta a nueve veces más mujeres que hombres y parece más común en personas de descendencia africana. Puede aparecer a cualquier edad, pero aparece más a menudo en personas entre 10 y 50 años de edad. El LSE puede estar causado también por ciertos fármacos. Cuando ocurre esto, es conocido como lupus eritematoso inducido por fármacos y es habitualmente reversible cuando se detiene la medicación.

El curso de la enfermedad puede variar desde una dolencia episódica leve hasta una enfermedad grave mortal. Los síntomas pueden variar también ampliamente en un individuo particular con el tiempo y se caracterizan por periodos de remisión y exacerbación. Algunos de los síntomas más comunes de lupus incluyen articulaciones doloridas o hinchadas (artritis), fiebre idiopática y fatiga extrema. Otros síntomas de lupus incluyen dolor de pecho, pérdida de cabello, anemia (una reducción de los eritrocitos), úlceras bucales y dedos de manos o pies pálidos o morados por frío o estrés. Algunas personas experimentan también dolores de cabeza, mareos, depresión, confusión o convulsiones. Pueden seguir apareciendo nuevos síntomas años después del diagnóstico inicial, y pueden aparecer síntomas diferentes en momentos diferentes. En su inicio, solo puede estar implicado un sistema orgánico. Los órganos adicionales pueden resultar implicados después.

El lupus se caracteriza por periodos de dolencia, denominados exacerbaciones, y periodos de bienestar, o remisión. Típicamente, una vez se ha diagnosticado LSE, el doctor desarrollará un plan de tratamiento basado en la edad, sexo, salud, síntomas y estilo de vida del paciente. Al desarrollar el plan de tratamiento, el doctor tiene varios objetivos: evitar exacerbaciones, tratarlas cuando aparezcan y minimizar el daño orgánico y las complicaciones.

Hasta la fecha, están disponibles una serie de diferentes tratamientos para pacientes de LSE. Para personas con dolor de articulaciones o de pecho o fiebre, se usan a menudo fármacos que reducen la inflamación, denominados fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE). Los efectos secundarios comunes de dichos AINE pueden incluir malestar digestivo, pirosis, diarrea y retención de fluidos. Algunos pacientes desarrollan también complicaciones hepáticas, renales o incluso neurológicas.

Los antimaláricos son otro tipo de fármaco usado comúnmente para tratar lupus. Aunque se usan generalmente para tratar fatiga, dolor de articulaciones, exantemas cutáneos e inflamación de los pulmones, los estudios clínicos han encontrado que el tratamiento continuo con antimaláricos puede prevenir la recurrencia de las exacerbaciones. Los efectos secundarios de los antimaláricos pueden incluir malestar digestivo, y de forma extremadamente rara, daño en la retina del ojo.

El pilar del tratamiento de lupus implica el uso de hormonas corticosteroideas. Los corticosteroides funcionan suprimiendo rápidamente la inflamación y pueden administrarse oralmente, en cremas aplicadas a la piel o mediante inyección. Los efectos secundarios a corto plazo de los corticosteroides incluyen hinchazón, aumento de apetito y ganancia de peso. Estos efectos secundarios generalmente cesan cuando se deja el fármaco. Sin embargo, a menudo puede ser peligroso dejar de tomar corticosteroides repentinamente, así que existe la necesidad de deshabituarse al paciente durante un periodo prolongado de tiempo. Los efectos a largo plazo de los corticosteroides pueden incluir estrías en la piel, huesos debilitados o dañados (osteoporosis y osteonecrosis), presión sanguínea alta, daño en las arterias, azúcar sanguíneo alto (diabetes), infecciones y cataratas. Típicamente, cuanto más dosis y más tiempo se tome, mayor riesgo y gravedad de los efectos secundarios.

Para pacientes cuyos riñones o sistema nervioso central esté afectado por lupus, pueden usarse inmunosupresores. Los inmunosupresores contienen el sistema inmunitario superactivo bloqueando la producción de células inmunitarias. Los efectos secundarios pueden incluir náuseas, vómitos, pérdida de cabello, problemas de vejiga, fertilidad reducida y riesgo aumentado de cáncer e infección. El riesgo de efectos secundarios aumenta con la duración del tratamiento. Como con otros tratamientos de lupus, existe el riesgo de recaída después de dejar los inmunosupresores.

La presente invención proporciona tratamientos terapéuticos alternativos para LSE y lupus inducido por fármacos. En particular, la invención se dirige a proporcionar tratamientos alternativos a inmunosupresores y corticosteroides, que al menos en la fase aguda de la enfermedad tengan excelentes efectos terapéuticos pero carezcan de los efectos secundarios a largo plazo principales.

ESTUDIOS *IN VIVO*

Se emprendieron estudios para investigar la eficacia de CYC202 y combinaciones de CYC202/metilprednisolona en ratones.

Los ratones híbridos NZB/W F1 desarrollan espontáneamente una enfermedad autoinmunitaria grave similar al lupus sistémico eritematoso humano. La enfermedad se manifiesta por la formación de anticuerpos antinucleares tempranos, el desarrollo de una glomerulonefritis compleja inmunitaria con proteinuria y progresión hasta insuficiencia renal con el tiempo, que causa también la mortalidad prematura de estos ratones. Es una enfermedad de disfunción de linfocitos T y B, con formación de autoanticuerpos contra antígenos nucleares y endógenos, entre los que nucleosomas y ADN complejo con histonas parecen ser los más destacados.

Los nucleosomas se generan *in vivo* mediante apoptosis, un proceso que parece alterado en lupus. En condiciones de retirada insuficiente de células apoptóticas, los nucleosomas actúan como autoantígenos activando la respuesta inmunitaria dependiente de linfocitos T, cuyos componentes críticos son anticuerpos específicos de nucleosoma y complejos de nucleosoma/IgG. Estos se unen a constituyentes intrínsecos de la membrana basal glomerular y promueven la inflamación. Las citocinas y quimioattractores generados en gran cantidad por las células renales residentes e infiltradas amplifican y perpetúan la lesión mediada por complejo inmunitario.

Histológicamente, los cambios glomerulares en los ratones NZB/W incluyen hiperplasia endocapilar asociada a proliferación extracapilar local; se detectan depósitos de tipo inmunitario en el mesangio y en la cara subendotelial de la membrana basal glomerular (MBG). El daño tubular, inflamación intersticial y fibrosis son graves.

Hay evidencias crecientes que muestran que proteínas reguladoras positivas (ciclinas y cinasas dependientes de ciclinas) y negativas (inhibidores de cinasa dependiente de ciclina) del ciclo celular tienen un papel crítico en la regulación de las respuestas celulares a formas inmunitarias y no inmunitarias de lesión, incluyendo proliferación celular y apoptosis. La proliferación de células glomerulares intrínsecas tales como células mesangiales es una

respuesta característica ante formas de lesión glomerular mediada inmunitariamente tales como nefropatía por IgA, lupus y glomerulonefritis membranoproliferativa. La expresión de proteínas positivas de ciclo celular (ciclinas D, E, A), así como los niveles y actividad de proteína CDK2, aumentan en glomerulonefritis mesangioproliferativa experimental (nefritis por Thy) caracterizada por la proliferación de células mesangiales. En este modelo, inhibir CDK2 reducía la proliferación de células mesangiales y la acumulación de proteína de matriz y mejoraba la función renal.

Los estudios *in vivo* por la solicitante han mostrado que los ratones NZB/W F1 tratados con CYC202 a dosis de 200 y 100 mg/kg, empezando a los 2 meses de edad, sobrevivían significativamente más ($P < 0,05$) que los ratones tratados con vehículo. Al final del estudio (mes 8), aunque solo 4 de los 13 ratones NZB/W (31%) que se habían tratado con vehículo seguían vivos, 10 de 13 (77%) y 10 de 14 (71%) ratones tratados con CYC202 200 y 100 mg/kg sobrevivieron, respectivamente. En el grupo de ratones suministrados con CYC202 (100 mg/kg) de 5 meses de edad (tratamiento terapéutico), el porcentaje de supervivencia no era diferente del registrado en ratones tratados con vehículo.

En una realización preferida de la invención, la cantidad de inhibidor de CDK2 y/o CDK7 y/o CDK9 es suficiente para retardar el inicio de la proteinuria y el deterioro de la función renal.

Se evaluó el porcentaje acumulado de ratones con proteinuria grave (>4 mg/día) en diferentes etapas de la enfermedad en todos los grupos experimentales. En el grupo de vehículo, el porcentaje de ratones con proteinuria aumentaba progresivamente con el tiempo. Al final del estudio, el porcentaje de ratones proteinúricos era de 85%. El CYC202 suministrado como terapia preventiva desde los 2 meses de edad retardaba significativamente el inicio de la proteinuria en comparación con vehículo de manera dependiente de la dosis (% de ratones proteinúricos, mes 8: 200 mg/kg, 23%, $P < 0,01$ frente a vehículo; 100 mg/kg, 43%, $P < 0,05$ frente a vehículo). Cuando se administró CYC202 a ratones con lupus de 5 meses de edad, se observó la tendencia a un porcentaje reducido de ratones proteinúricos con respecto al vehículo, que sin embargo no alcanzó significación estadística.

Se midió la función renal, valorada por el nitrógeno ureico en sangre (NUS) sérico, a los 5 y 8 meses. A los 5 meses, los niveles de NUS sérico estaban dentro del intervalo normal (< 29 mg/dl) en todos los grupos experimentales. En el grupo de vehículo, la función renal se deterioró con el tiempo y a los 8 meses el 50% de los animales supervivientes tenían niveles de NUS ≥ 30 mg/dl. El CYC202 suministrado como terapia preventiva desde los 2 meses de edad daba como resultado una mejor función renal de los ratones con lupus, mientras que no era eficaz cuando se administraba a la edad posterior de 5 meses.

En una realización preferida de la invención, la cantidad de inhibidor de CDK2 y/o CDK7 y/o CDK9 es suficiente para regular negativamente los niveles de anticuerpos antinucleares, específicamente anti-ADN.

Los niveles de anticuerpo anti-ADN elevados son característicos de los ratones NZB/W F1. Los ratones suministrados con vehículo exhibían niveles crecientes de anticuerpos anti-ADN con el tiempo. A los 5 u 8 meses de edad, los ratones tratados desde los 2 meses con CYC202 a ambas dosis mostraban niveles de anticuerpo anti-ADN significativamente menores que el vehículo. En el grupo de ratones que recibían CYC202 desde los 5 meses, la concentración de anticuerpo anti-ADN era numéricamente, si bien no significativamente, menor que con vehículo a los 8 meses.

En una realización preferida, el inhibidor de CDK2 y/o CDK7 y/o CDK9 está en una cantidad suficiente para reducir los cambios glomerulares y tubointersticiales.

Al final del estudio, los ratones NZB/W suministrados con vehículo revelaron cambios glomerulares con hiperplasia intracapilar asociada a proliferación extracapilar focal. Se detectaron depósitos inmunitarios en el mesangio y en la cara subendotelial de la membrana basal glomerular. Se observaron también daño tubular e inflamación intersticial. El tratamiento desde los 2 meses de edad con CYC202 limitaba notablemente la hiperplasia glomerular, los depósitos inmunitarios y el daño tubulointersticial. Estos efectos eran más pronunciados cuando se suministraba CYC202 a la dosis de 200 mg/kg. Solo se observó un efecto leve sobre la morfología renal en ratones administrados con CYC202 desde los 5 meses de edad.

En una realización preferida, la cantidad de inhibidor de CDK2 y/o CDK7 y/o CDK9 es suficiente para inhibir la proliferación de linfocitos T inducida por PMA y ConA.

En una realización preferida de la invención, el inhibidor de CDK2 y/o CDK7 y/o CDK9 está en una cantidad suficiente para regular negativamente la expresión de Mcl-1.

En una realización preferida, la cantidad de inhibidor de CDK2 y/o CDK7 y/o CDK9 es una cantidad suficiente para reducir la acumulación intersticial de células mononucleares.

Se analizaron en los riñones los monocitos/macrófagos positivos de F4/80 mediante técnicas inmunohistoquímicas. Estaba presente una marcada acumulación de células positivas de F4/80 en el intersticio renal de ratones NZB/W

administrados con vehículo. El tratamiento preventivo desde los 2 meses de edad con CYC202 200 mg/kg reducía notablemente el número de monocitos/macrófagos positivos de F4/80 con respecto al vehículo. El CYC202 a la dosis de 100 mg/kg limitaba, si bien no en un grado estadísticamente significativo, la acumulación intersticial de células mononucleares. Se observó una reducción numérica de las células positivas de F4/80 en el estudio terapéutico (tratamiento desde los 5 meses de edad).

A modo de resumen, los resultados del presente estudio indican claramente que CYC202 (200 y 100 mg/kg), suministrado como terapia preventiva desde los 2 meses de edad, retardaba la manifestación renal de lupus en ratones NZB/W y prolongaba notablemente la vida en comparación con animales suministrados con vehículo. Específicamente, el CYC202 retardaba el inicio de la proteinuria y el deterioro de la función renal y limitaba los cambios glomerulares y tubulointersticiales, incluyendo acumulación intersticial de células mononucleares, hiper celularidad glomerular y depósitos inmunitarios. Los efectos son más pronunciados a la dosis de 200 mg/kg. Era un notable hallazgo del presente estudio la reducción de los niveles de anticuerpos anti-ADN por CYC202, que podría atribuirse posiblemente a los efectos de CYC202 sobre los linfocitos T, que a su vez pueden afectar a linfocitos B. Mediante experimentos *in vitro*, se ha observado la inhibición dependiente de la concentración de la proliferación de linfocitos T inducida por PMA y ConA, así como en reacción de linfocitos mixtos, después de tratamiento con CYC202. Además, hay evidencias de que, en LSE, los linfocitos T auxiliares autoinmunitarios activados específicos de histonas o nucleosomas pueden proporcionar ayuda a los linfocitos B para diferenciarse en células plasmáticas productoras de anti-ADN (para revisión, véase Rekvig, *Arthritis & Rheumatism* 48: 300-312, 2003).

El CYC202 es también conocido por tener efecto sobre la transcripción, incluyendo la regulación negativa de la proteína antiapoptótica mcl-1, y es por tanto capaz de alterar el equilibrio de señales de supervivencia en las células. Los linfocitos T anérgicos pueden ser especialmente sensibles a este mecanismo de acción.

La administración de CYC202 (100 mg/kg) iniciada a los 5 meses de edad daba como resultado una reducción leve del porcentaje de ratones proteinúricos y de daño renal con respecto a los ratones con vehículo. La supervivencia no mejoraba. El modesto efecto era probablemente debido a la baja dosis.

COMBINACIONES

En una realización particularmente preferida, el medicamento es para uso en terapia de combinación con metilprednisolona.

Como se usa en la presente memoria, el término "terapia de combinación" designa una terapia en que se administran metilprednisolona y el inhibidor de CDK2 y/o CDK7 y/o CDK9, si no simultáneamente, entonces secuencialmente en un marco temporal en que ambos están disponibles para actuar terapéuticamente en el mismo marco temporal.

Otro aspecto de la invención se refiere a una combinación que comprende un inhibidor de CDK2 y/o CDK7 y/o CDK9 como se describe anteriormente, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y metilprednisolona.

Preferiblemente, la combinación tiene efecto sinérgico, concretamente la combinación es sinérgica.

La metilprednisolona es un corticosteroide sintético (hecho por el hombre). El nombre químico es 11,17,21-trihidroxi-6-metil-(6a,11b)-pregna-1,4-dieno-3,20-diona. Los corticosteroides son productos químicos de origen natural producidos por las glándulas suprarrenales localizadas adyacentes a los riñones. Los corticosteroides bloquean la inflamación y se usan en una amplia variedad de enfermedades inflamatorias. Existen numerosas preparaciones de corticosteroides incluyendo comprimidos orales, cápsulas, líquidos, cremas y geles tópicos, inhaladores, gotas oculares y soluciones inyectables e intravenosas. La metilprednisolona se prescribe típicamente como un comprimido oral o líquido.

La metilprednisolona se usa para conseguir una rápida supresión de la inflamación. Los ejemplos de afecciones inflamatorias para las que se usa metilprednisolona incluyen artritis reumatoide, lupus sistémico eritematoso, artritis gotosa aguda, artritis psoriásica, colitis ulcerosa y enfermedad de Crohn. Las afecciones alérgicas graves que no responden al tratamiento convencional pueden responder también a metilprednisolona. Los ejemplos incluyen asma bronquial, rinitis alérgica, dermatitis inducida por fármacos y dermatitis de contacto y atópica. Las afecciones cutáneas crónicas tratadas con metilprednisolona incluyen dermatitis herpetiforme, pénfigo, psoriasis grave y dermatitis seborreica grave. Se tratan también con metilprednisolona afecciones alérgicas e inflamatorias crónicas de úvea, iris, conjuntiva y nervio óptico de los ojos.

Otro aspecto se refiere a una composición farmacéutica que comprende una combinación según la invención y un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

Otro aspecto de la invención se refiere a un producto farmacéutico que comprende un inhibidor de CDK2 y/o CDK7 y/o CDK9 como se describe anteriormente, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y metilprednisolona como preparación combinada para uso simultáneo, secuencial o separado en terapia.

El inhibidor de CDK2 y/o CDK7 y/o CDK9 y metilprednisolona pueden administrarse simultáneamente, en combinación, secuencial o separadamente (como parte de un régimen de dosificación).

Como se usa en la presente memoria “simultáneamente” se usa para indicar que los dos agentes se administran a la vez, mientras que el término “en combinación” se usa para indicar que se administran, si no simultáneamente, entonces “secuencialmente” en un marco temporal en que ambos están disponibles para actuar terapéuticamente en el mismo marco temporal. Por tanto, la administración “secuencialmente” puede permitir administrar un agente a los 5 minutos, 10 minutos o una serie de horas después del otro, a condición de que la semivida en circulación del primer agente administrado sea tal que están ambos presentes a la vez en cantidades terapéuticamente eficaces. El retardo de tiempo entre la administración de los componentes variará dependiendo de la naturaleza exacta de los componentes, la interacción entre ellos y sus semividas respectivas.

En contraposición con “en combinación” o “secuencialmente”, “separadamente” se usa en la presente memoria para indicar que el lapso entre la administración de un agente y el otro es significativo, concretamente, el primer agente administrado puede no estar ya presente en la corriente sanguínea en una cantidad terapéuticamente eficaz cuando se administra el segundo agente.

Todavía otro aspecto de la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende:

(i) un inhibidor de CDK2 y/o CDK7 y/o CDK9 como se describe anteriormente, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; y

(ii) metilprednisolona;

mezclados con un diluyente, excipiente o vehículo farmacéuticamente aceptable.

Un aspecto adicional se refiere a una combinación según la invención en la preparación de un medicamento para tratar una enfermedad asociada a anticuerpos antinucleares.

Un aspecto adicional de la invención se refiere al uso de un inhibidor de CDK2 y/o CDK7 y/o CDK9 como se describe anteriormente, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en la preparación de un medicamento para tratar lupus inducido por fármacos o LSE, en el que el medicamento es para uso en combinación con metilprednisolona.

Todavía otro aspecto de la invención se refiere al uso de metilprednisolona en la preparación de un medicamento para tratar lupus inducido por fármacos o LSE, en el que el medicamento es para uso en combinación con un inhibidor de CDK2 y/o CDK7 y/o CDK9 como se describe anteriormente, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo

Un aspecto adicional de la invención se refiere al uso de un inhibidor de CDK2 y/o CDK7 y/o CDK9 como se describe anteriormente, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y metilprednisolona, en la preparación de un medicamento para tratar lupus inducido por fármacos o LSE.

Otro aspecto de la invención se refiere al uso de un inhibidor de CDK2 y/o CDK7 y/o CDK9 como se describe anteriormente, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en la preparación de un medicamento para el tratamiento de lupus inducido por fármacos o LSE, en el que dicho tratamiento comprende administrar a un sujeto simultánea, secuencial o separadamente el inhibidor de CDK2 y/o CDK7 y/o CDK9, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y metilprednisolona.

Para todas las realizaciones anteriores, preferiblemente el inhibidor de CDK2 y/o CDK7 y/o CDK9 y metilprednisolona se administran simultánea o secuencialmente.

En una realización preferida, el inhibidor de CDK2 y/o CDK7 y/o CDK9 y metilprednisolona se administran simultáneamente.

En una realización particularmente preferida, el inhibidor de CDK2 y/o CDK7 y/o CDK9 se administra al sujeto antes de, secuencial o separadamente a administrar metilprednisolona a dicho sujeto.

En una realización preferida alternativa, se administra metilprednisolona al sujeto antes de, secuencial o separadamente a administrar el inhibidor de CDK2 y/o CDK7 y/o CDK9 a dicho sujeto.

En una realización particularmente preferida, se administran secuencialmente el inhibidor de CDK2 y/o CDK7 y/o CDK9 y metilprednisolona.

En una realización preferida de la invención, se administran cada uno del inhibidor de CDK2 y/o CDK7 y/o CDK9 y metilprednisolona en una cantidad terapéuticamente eficaz con respecto a los componentes individuales.

En otra realización preferida de la invención, se administran cada uno del inhibidor de CDK2 y/o CDK7 y/o CDK9 y metilprednisolona en una cantidad subterapéutica con respecto a los componentes individuales.

El inhibidor de CDK2, CDK7 o CDK9 es como se describe anteriormente para el primer aspecto de la invención.

COMPOSICIONES FARMACÉUTICAS

Como se menciona anteriormente, diversos aspectos de la invención se refieren a composiciones farmacéuticas.

Aunque los compuestos de la presente invención (incluyendo sus sales y ésteres farmacéuticamente aceptables y solvatos farmacéuticamente aceptables) puedan administrarse solos, se administrarán generalmente en mezcla con un vehículo, excipiente o diluyente farmacéutico, particularmente para terapia humana. Las composiciones farmacéuticas pueden ser para uso humano o animal y medicina veterinaria.

Pueden encontrarse ejemplos de dichos excipientes adecuados para las diversas formas diferentes de composiciones farmacéuticas descritas en la presente memoria en "Handbook of Pharmaceutical Excipients", 2ª edición, (1994), editado por A Wade and PJ Weller.

Los vehículos o diluyentes aceptables para uso terapéutico son bien conocidos en la farmacia, y se describen, por ejemplo, en "Remington's Pharmaceutical Sciences", Mack Publishing Co. (A. R. Gennaro edit. 1985).

Los ejemplos de vehículos adecuados incluyen lactosa, almidón, glucosa, metilcelulosa, estearato de magnesio, manitol, sorbitol y similares. Los ejemplos de diluyentes adecuados incluyen etanol, glicerol y agua.

La elección del vehículo, excipiente o diluyente farmacéutico puede realizarse con respecto a la vía pretendida de administración y la práctica farmacéutica estándar. Las composiciones farmacéuticas pueden comprender como vehículo, excipiente o diluyente, o además, cualquier aglutinante, lubricante, agente de suspensión, agente de recubrimiento o agente solubilizante adecuado.

Los ejemplos de aglutinantes adecuados incluyen almidón, gelatina, azúcares naturales tales como glucosa, lactosa anhidra, lactosa fluida, β -lactosa, edulcorantes de maíz, gomas naturales y sintéticas tales como goma arábica, tragacanto o alginato de sodio, carboximetilcelulosa y polietilenglicol.

Los ejemplos de lubricantes adecuados incluyen oleato de sodio, estearato de sodio, estearato de magnesio, benzoato de sodio, acetato de sodio, cloruro de sodio y similares.

Pueden proporcionarse conservantes, estabilizadores, tintes e incluso agentes aromatizantes a la composición farmacéutica. Los ejemplos de conservantes incluyen benzoato de sodio, ácido sórbico y ésteres de ácido p-hidroxibenzoico. Pueden usarse también antioxidantes y agentes de suspensión.

SALES/ÉSTERES

Los compuestos usados en la invención pueden estar presentes como sales o ésteres, en particular sales o ésteres farmacéuticamente aceptables.

Las sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos de la invención incluyen sales de adición de ácido o base adecuadas. Puede encontrarse una revisión de las sales farmacéuticas adecuadas en Berge *et al.*, *J. Pharm. Sci.*, 66, 1-19 (1977). Las sales se forman, por ejemplo, con ácidos orgánicos fuertes tales como ácidos minerales, por ejemplo, ácido sulfúrico, ácido fosfórico o ácidos halohídricos; con ácidos carboxílicos orgánicos fuertes tales como ácidos alcanocarboxílicos de 1 a 4 átomos de carbono que están no sustituidos o sustituidos (por ejemplo con halógeno), tales como ácido acético; con ácidos dicarboxílicos saturados o insaturados, por ejemplo, ácidos oxálico, malónico, succínico, maleico, fumárico, ftálico o tetráftálico; con ácidos hidroxicarboxílicos, por ejemplo, ácidos ascórbico, glicólico, láctico, málico, tartárico o cítrico; con aminoácidos, por ejemplo ácido aspártico o glutámico; con ácido benzoico; o con ácidos sulfónicos orgánicos tales como ácidos alquil- o aril C₁-C₄-sulfónicos que están no sustituidos o sustituidos (por ejemplo con un halógeno) tales como ácido metano- o p-toluenosulfónico.

Los ésteres se forman usando ácidos orgánicos o alcoholes/hidróxidos, dependiendo del grupo funcional que se esté esterificando. Los ácidos orgánicos incluyen ácidos carboxílicos tales como ácidos alcanocarboxílicos de 1 a 12 átomos de carbono que están no sustituidos o sustituidos (por ejemplo con halógeno), tales como ácido acético; ácidos dicarboxílicos saturados o insaturados, por ejemplo, ácidos ascórbico, glicólico, láctico, málico, tartárico o cítrico; aminoácidos, por ejemplo, ácido aspártico o glutámico; ácido benzoico o ácidos sulfónicos orgánicos tales como ácidos alquil- o aril C₁-C₄-sulfónicos que están no sustituidos o sustituidos (por ejemplo con un halógeno) tales como ácido metano- o p-toluenosulfónico. Los hidróxidos adecuados incluyen hidróxidos orgánicos tales como hidróxido de sodio, hidróxido de potasio, hidróxido de calcio e hidróxido de aluminio. Los alcoholes incluyen alcanolcoholes de 1-12 átomos de carbono que pueden estar no sustituidos o sustituidos, por ejemplo con un halógeno.

ENANTIÓMEROS/TAUTÓMEROS

En todos los aspectos de la presente invención anteriormente examinados, la invención incluye el uso, cuando sea apropiado, de todos los enantiómeros y tautómeros de los compuestos implicados. El especialista en la materia reconocerá los compuestos que posean propiedades ópticas (uno o más átomos de carbono quirales) o características tautoméricas. Los correspondientes enantiómeros y/o tautómeros pueden aislarse/prepararse mediante procedimientos conocidos en la materia.

ESTEREOISÓMEROS E ISÓMEROS GEOMÉTRICOS

Los compuestos usados en la invención pueden existir como estereoisómeros y/o isómeros geométricos, por ejemplo, pueden poseer uno o más centros asimétricos y/o geométricos y pueden existir así en dos o más formas estereoisoméricas y/o geométricas. La presente invención contempla el uso de todos los estereoisómeros e isómeros geométricos individuales de esos agentes y las mezclas de los mismos. Los términos usados en las reivindicaciones engloban estas formas, a condición de que dichas formas retengan la actividad funcional apropiada (aunque no necesariamente en el mismo grado).

La presente invención incluye también el uso de todas las variaciones isotópicas adecuadas del agente o sal farmacéuticamente aceptable del mismo. Una variación isotópica de un agente de la presente invención o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo se define como aquella en que al menos un átomo se reemplaza por un átomo que tiene el mismo número atómico pero una masa atómica diferente que la masa atómica encontrada habitualmente en la naturaleza. Los ejemplos de isótopos que pueden incorporarse al agente y las sales farmacéuticamente aceptables del mismo incluyen isótopos de hidrógeno, carbono, nitrógeno, oxígeno, fósforo, azufre, flúor y cloro, tales como ^2H , ^3H , ^{13}C , ^{14}C , ^{15}N , ^{17}O , ^{18}O , ^{31}P , ^{32}P , ^{35}S , ^{18}F y ^{36}Cl , respectivamente. Ciertas variaciones isotópicas del agente y las sales farmacéuticamente aceptables del mismo, por ejemplo aquellas en que se incorpora un isótopo radiactivo tal como ^3H o ^{14}C , son útiles en estudios de distribución en tejido de fármaco y/o sustrato. Los isótopos de tritio, concretamente ^3H , y de carbono-14, concretamente ^{14}C , son particularmente preferidos por su facilidad de preparación y detectabilidad. Adicionalmente, la sustitución con isótopos tales como deuterio, concretamente ^2H , puede proporcionar ciertas ventajas terapéuticas resultantes de una mayor estabilidad metabólica, por ejemplo, una semivida *in vivo* aumentada o requisitos de dosificación reducidos, y por tanto pueden preferirse en algunas circunstancias. Las variaciones isotópicas del agente de la presente invención y las sales farmacéuticamente aceptables del mismo de esta invención pueden prepararse generalmente mediante procedimientos convencionales usando variaciones isotópicas apropiadas de los reactivos adecuados.

SOLVATOS

La presente invención incluye también el uso de formas de solvato de los compuestos de la presente invención. Los términos usados en las reivindicaciones engloban estas formas.

POLIMORFOS

La invención se refiere además al uso de compuestos de la presente invención en sus diversas formas cristalinas, formas polimórficas y formas anhidras/hidratadas. Está bien establecido en la industria farmacéutica que los compuestos químicos pueden aislarse en cualquiera de dichas formas variando ligeramente el procedimiento de purificación y/o aislamiento de los disolventes usados en la preparación sintética de dichos compuestos.

PROFÁRMACOS

La invención incluye adicionalmente el uso de los compuestos de la presente invención en forma de profármaco. Dichos profármacos son generalmente compuestos en los que se han modificado uno o más grupos apropiados de tal modo que la modificación pueda invertirse tras la administración a un sujeto humano o mamífero. Dicha inversión se efectúa habitualmente mediante una enzima naturalmente presente en dicho sujeto, aunque es posible administrar un segundo agente junto con dicho profármaco para efectuar la inversión *in vivo*. Los ejemplos de dichas modificaciones incluyen ésteres (por ejemplo, cualquiera de los descritos anteriormente) en los que la inversión puede llevarse a cabo con una esterasa, etc. Serán bien conocidos por los expertos en la materia otros de dichos sistemas.

ADMINISTRACIÓN

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden adaptarse para las vías de administración oral, rectal, vaginal, parenteral, intramuscular, intraperitoneal, intraarterial, intratecal, intrabronquial, subcutánea, intradérmica, intravenosa, nasal, bucal o sublingual.

Para administración oral, se hace uso particular de comprimidos por compresión, píldoras, comprimidos, cápsulas de gel, gotas y cápsulas. Preferiblemente, estas composiciones contienen de 1 mg a 5000 mg y más preferiblemente de 10 mg a 3000 mg de ingrediente activo por dosis.

Otras formas de administración comprenden soluciones o emulsiones que pueden inyectarse por vía intravenosa, intraarterial, intratecal, subcutánea, intradérmica, intraperitoneal o intramuscular, y que se preparan a partir de soluciones estériles o esterilizables. Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden estar también en forma de supositorios, pesarios, suspensiones, emulsiones, lociones, pomadas, cremas, geles, pulverizadores, soluciones o polvos para espolvorear.

Como medio alternativo de administración transdérmica es mediante el uso de un parche dérmico. Por ejemplo, el ingrediente activo puede incorporarse a una crema consistente en una emulsión acuosa de polietilenglicoles o parafina líquida. El ingrediente activo puede incorporarse también, a una concentración de entre 1 y 10% en peso, a una pomada consistente en una base de cera blanca o parafina blanda blanca junto con aquellos estabilizadores y conservantes que puedan requerirse.

Las formas inyectables pueden contener entre 10-3000 mg, preferiblemente entre 10-1000 mg de ingrediente activo por dosis.

Las composiciones pueden formularse en forma de dosificación unitaria, concretamente en forma de porciones discretas que contienen una dosis unitaria o un múltiplo o subunidad de una dosis unitaria.

DOSIFICACIÓN

Un experto en la materia puede determinar fácilmente la dosis apropiada de una de las presentes composiciones a administrar a un sujeto sin experimentación indebida. Típicamente, un médico determinará la dosificación real que será más adecuada para un paciente individual, y dependerá de una variedad de factores incluyendo la actividad del compuesto específico empleado, la estabilidad metabólica y periodo de acción de ese compuesto, la edad, peso corporal, salud general, sexo, dieta, modo y momento de administración, tasa de excreción, combinación de fármacos, gravedad de la afección particular y terapia individual experimentada. Las dosificaciones dadas a conocer en la presente memoria son ejemplares del caso medio. Puede haber casos individuales, por supuesto, en que se requieran intervalos de dosificación mayores o menores, y estos están dentro del alcance de esta invención.

Dependiendo de la necesidad, el agente puede administrarse a una dosis de 0,01 a 30 mg/kg de peso corporal, tal como de 0,1 a 10 mg/kg, más preferiblemente de 0,1 a 1 mg/kg de peso corporal.

En una realización ejemplar, se administrarán una o más dosis de 10 a 3500 mg/día al paciente.

La presente invención se ilustra adicionalmente a modo de ejemplo y con referencia a las siguientes figuras, en las que:

La figura 1 muestra el porcentaje de supervivencia frente a la duración del tratamiento (meses) para ratones NZB/W F1 tratados con CYC202 a dosificaciones de 100 y 200 mg/kg desde los 2 meses o los 5 meses.

La figura 2 muestra el porcentaje de ratones proteinúricos frente a la duración del tratamiento (meses) para ratones NZB/W F1 tratados con CYC202 a dosificaciones de 100 mg/kg o 200 mg/kg.

La figura 3 muestra anticuerpos anti-ADN séricos (U/ml) para ratones NZB/W F1 tratados con CYC202 a 100 mg/kg o 200 mg/kg (frente a vehículo de control).

La figura 4 muestra la incorporación de BrdU (arriba) y la viabilidad (abajo) de PBMC no estimuladas y estimuladas y células de control no tratadas o tratadas con vehículo DMSO.

La figura 5 muestra a diferencia en la incorporación de BrdU entre células PBMC estimuladas con PHA o PMA/I durante 48 horas cuando se tratan con DMSO (arriba a la izquierda) o los compuestos a concentraciones $4 \times \text{Cl}_{50}$, $3 \times \text{Cl}_{50}$, $2 \times \text{Cl}_{50}$ y Cl_{50} , 2 horas antes de la estimulación (-2h), en el momento de la estimulación (0 h) y 2 horas después de la estimulación (+2h).

La figura 6 muestra la diferencia en viabilidad entre células PBMC estimuladas con PHA o PMA/I durante 48 horas cuando se tratan con DMSO (arriba a la izquierda) o con compuestos a concentraciones $4 \times \text{Cl}_{50}$, $3 \times \text{Cl}_{50}$, $2 \times \text{Cl}_{50}$ y Cl_{50} , 2 horas antes de la estimulación (-2h), en el momento de la estimulación (0h) y 2 horas después de la estimulación (+2h).

La figura 7 muestra que la titulación de concanavalina A muestra una estimulación máxima a $10 \mu\text{g/ml}$ (arriba a la izquierda) y una viabilidad reducida a concentraciones mayores (arriba a la derecha). El aumento en la incorporación de BrdU es comparable a la estimulación con PHA y PMA/I (abajo a la izquierda).

La figura 8 muestra la incorporación de BrdU (arriba) y la viabilidad (abajo) en PBMC estimuladas con PHA y ConA y células no estimuladas a las 48 y 72 horas de tratamiento con DMSO y no tratadas.

La figura 9 muestra la incorporación de BrdU a PMBC estimulados con PHA (izquierda) y ConA (derecha) tratados con compuestos a 4 x Cl_{50} , 3 x Cl_{50} , 2 x Cl_{50} , Cl_{50} , 0,5 x Cl_{50} y 0,25 x Cl_{50} y control de DMSO, durante 48 y 72 horas.

- 5 La figura 10 muestra la viabilidad de PBMC estimuladas con PHA (izquierda) y ConA (derecha) tratadas con compuestos a 4 x Cl_{50} , 3 x Cl_{50} , 2 x Cl_{50} , Cl_{50} , 0,5 x Cl_{50} y 0,25 x Cl_{50} y control de DMSO, durante 48 y 72 horas.

Ejemplos

10 Inhibidores de CDK2 y/o CDK7 y/o CDK9

Se prepararon diversos compuestos inhibidores de acuerdo con los procedimientos descritos en los documentos EP 0874847 B (CNRS) y WO 03/002565, WO 04/016613, WO 04/016612, WO01/72745, WO 02/079193, WO 03/029248, WO04/043953 (todos a nombre de Cyclacel Limited).

15 Ensayos de cinasa

- Se investigó la actividad cinasa midiendo la incorporación de fosfato radiactivo desde ATP a sustratos polipeptídicos apropiados. Se produjeron u obtuvieron comercialmente las proteína cinasas y complejos de cinasa recombinantes. Se efectuaron los ensayos usando placas de 96 pocillos y tampones de ensayo apropiados (típicamente β -glicerofosfato 25 mM, MOPS 20 mM, EGTA 5 mM, DTT 1 mM, Na_3VO_3 1 mM, pH 7,4) en los que se añadieron 2-4 μ g de enzima activa con los sustratos apropiados. Se iniciaron las reacciones mediante la adición de una mezcla de Mg/ATP ($MgCl_2$ 15 mM + ATP 100 μ M con 30-50 kBq por pocillo de [γ - ^{32}P]-ATP) y se incubaron las mezclas como se requiere a 30°C. Se detuvieron las reacciones en hielo, seguido de filtración a través de placas filtrantes p81 o placas filtrantes GF/C (Whatman Polyfiltronics, Kent, RU). Después de lavar 3 veces con ácido ortofosfórico ac. 75 mM, se secaron las placas, se añadió agente de centelleo y se midió la radiactividad incorporada en un contador de centelleo (TopCount, Packard Instruments, Pangbourne, Berks, RU). Los compuestos para el ensayo de cinasa estaban constituidos por soluciones madre 10 mM en DMSO y se diluyeron a 10% de DMSO en tampón de ensayo. Se analizaron los datos usando software de ajuste de curvas (GraphPad Prism versión 3.00 para Windows, GraphPad Software, San Diego California, EE.UU.) para determinar los valores de Cl_{50} (concentración del compuesto de ensayo que inhibe la actividad cinasa un 50%).

Ensayo de CDK 7 y 9

- 35 Se incubaron el sustrato peptídico CTD (biotinil-Ahx-(Tyr-Ser-Pro-Thr-Ser-Pro-Ser) $_4$ -NH $_2$; 1-2 mg/ml) y CDK7/ciclina H, CDK9/ciclina T1 o CDK9/ciclina K (0,5-2 mg) humanos recombinantes durante 45 minutos a 30°C en presencia de cantidades variables de compuesto de ensayo en MOPS 20 mM, pH 7,2, β -glicerofosfato 25 mM, EGTA 5 mM, DTT 1 mM, vanadiato de sodio 1 mM, $MgCl_2$ 15 mM y ATP 100 μ M (que contiene cantidades traza de ^{32}P - γ ATP) en un volumen total de 25 μ l en una placa de microtitulación de 96 pocillos. Se detuvo la reacción disponiendo la placa en hielo durante 2 min. Se añadió avidina (50 μ g) a cada pocillo y se incubó la placa a temp. amb. durante 30 min. Se transfirieron las muestras a una placa filtrante P81 de 96 pocillos y se lavaron (4 x 200 μ l) por pocillo con ácido fosfórico 75 mM. Se añadió líquido de centelleo Microscint 40 (50 μ l) a cada pocillo y se midió la cantidad de incorporación de ^{32}P para cada muestra usando un contador de centelleo de microplaca Packard Topcount.

45 CYC202

Se emprendieron estudios para evaluar si la administración del inhibidor de CDK2 CYC202 era eficaz para retardar el desarrollo de enfermedad renal de ratones NZB/WF1 con tendencia al lupus.

- 50 Se usaron ratones NZBxNZW F1 hembra (Harlan Italy s.r.l., Milán, Italia) de 2 meses de edad al inicio del experimento. Se realizaron el cuidado y tratamiento de los animales de acuerdo con directrices institucionales que cumplen las leyes y políticas nacionales (Decreto Legislativo n.116, Gazzetta Ufficiale suppl 40, 18 febbraio 1992, Circolare n.8, Gazzetta Ufficiale 14 luglio 1994) e internacionales (EEC Council Directive 86/609, OJL358-1, December 1987; Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, U.S. National Research Council, 1996). Se albergaron los animales en una sala a temperatura constante con un ciclo de 12 horas de oscuridad/12 horas de luz y se alimentaron con una dieta estándar.

Ejemplo 1

- 60 Se asignaron aleatoriamente ratones NZBxNZW F1 a los siguientes grupos:

Grupo 1 (n = 18): ratones a los que se suministró diariamente por sonda nasogástrica el vehículo (HCl 50 mM);

Grupo 2 (n = 17): ratones a los que se suministró diariamente por sonda nasogástrica CYC202 (200 mg/kg);

65

Grupo 3 (n = 19): ratones a los que se suministró diariamente por sonda nasogástrica CYC202 (100 mg/kg); los tratamientos empezaron a los 2 meses de edad (estudio preventivo) y duraron hasta los 8 meses; se sacrificaron 4-5 animales de cada grupo a los 5 meses para evaluación del NUS sérico y los niveles de anticuerpos anti-ADN en circulación.

Se suministró diariamente por sonda nasogástrica a un grupo adicional, el grupo 4 (n=14 ratones) CYC202 (100 mg/kg) desde los 5 meses de edad, un momento en que la deposición de complejo inmunitario está teniendo lugar activamente, hasta los 8 meses (estudio terapéutico). Se usaron 5 ratones CD-1 normales (Charles River Italia, Calco, Italia) como control.

Se evaluaron los siguientes parámetros:

Excreción de proteína urinaria: determinada cada mes hasta los 5 meses de edad y entonces cada dos semanas

En el sacrificio:

anticuerpos anti-ADN en suero;

NUS sérico;

transaminasas séricas (AST, ALT);

histología renal;

acumulación de monocitos/macrófagos en el intersticio renal.

Ejemplo 2

Se asignaron aleatoriamente ratones con lupus a los siguientes grupos:

Grupo 1 (n = 10): ratones a los que se suministró diariamente por sonda nasogástrica el vehículo (HCl 50 mM);

Grupo 2 (n = 15): ratones a los que se suministró diariamente por sonda nasogástrica CYC202 a una dosis de 200 mg/kg;

Grupo 3 (n = 12): ratones a los que se suministró diariamente por inyección intraperitoneal metilprednisolona (MPS, Urbason, Hoechst s.p.a, Milán, Italia) a una dosis de 1,5 mg/kg;

Grupo 4 (n = 16): ratones a los que se suministró diariamente CYC202 (200 mg/kg) en combinación con MPS (1,5 mg/kg).

Los tratamientos empezaron a los 5 meses de edad, un momento en que la deposición de complejo inmunitario está teniendo lugar activamente, y duraron hasta los 12 meses, cuando murió el último animal receptor de vehículo. Se usaron 5 ratones CD-1 normales (Charles River Italia, Calco, Italia) como control.

Se evaluaron los siguientes parámetros:

supervivencia;

excreción de proteína urinaria: determinada cada mes hasta los 5 meses de edad y entonces cada dos semanas;

NUS sérico: medido el mes 5 (antes del tratamiento) y cada mes hasta el final del estudio;

histología renal: evaluada en biopsias de ratones que estaban enfermos terminales y de ratones que sobrevivieron hasta los 12 meses;

acumulación de monocitos/macrófagos positivos de F4/80 en el intersticio renal (evaluada en las mismas biopsias que anteriormente).

Ejemplos 1 y 2: Materiales y procedimientos

Proteinuria y función renal

Se determinó la concentración de proteína urinaria mediante el ensayo de unión de tinte azul G de Coomassie con seroalbúmina bovina como patrón. Se valoró la función renal como NUS en sangre heparinizada mediante el ensayo

Reflotron (Roche Diagnostics Corporation, Indianápolis, EE.UU.). Los niveles de NUS que superaban los 30 mg/dl se consideraron anormales (intervalo normal en este laboratorio para ratones: 14-29 mg/dl).

Anticuerpos anti-ADN

Se evaluaron los niveles de autoanticuerpos anti-ADNbc en el suero mediante un inmunoensayo enzimático (Diastat anti-ds DNA kit, Bouty Laboratory, Milán, Italia) como se describe anteriormente (Kidney Int., 53: 726-734, 1998).

Transaminasas séricas

Se midieron los niveles de AST y ALT usando un autoanalizador (CX5, Beckman Instruments Inc., Fullerton, CA).

Morfología renal

Microscopia óptica: Se fijaron fragmentos de corteza renal en Dubosq-Brazil, se deshidrataron con alcohol y se embebieron en parafina. Se tiñeron secciones (3 μ m) con hematoxilina y eosina, tinción tricrómica de Masson y reactivo de ácido periódico-Schiff (tinción de PAS). Se evaluó la hiper celularidad intracapilar glomerular de modo semicuantitativo mediante un sistema de puntuación de 0 a 3+ (0 = sin hiper celularidad; 1+ = leve; 2+ = moderada; 3+ = grave). Se dio una sola puntuación para otros cambios basándose en los porcentajes de glomérulos totales implicados en una lesión. Se graduó la proliferación extracapilar de 0 a 3+ (0 = sin hiper celularidad; 1+ = menos de un 25% de los glomérulos implicados; 2+ = de 25% a 50% de los glomérulos implicados; 3+ = más de un 50% de los glomérulos implicados). Se graduaron los depósitos glomerulares de 0 a 3+ (0 = sin depósitos; 1+ = menos de un 25% de glomérulos implicados; 2+ = de 25% a 50% de glomérulos implicados; 3+ = más de un 50% de glomérulos implicados). Se graduaron los cambios tubulares (atrofia, cilindros y dilatación) e intersticiales (fibrosis e inflamación) de 0 a 3+ (0 = sin cambios; 1+ = cambios que afectan a menos de un 25% de la muestra; 2+ = cambios que afectan a 25 a 50% de la muestra; 3+ = cambios que afectan a más de un 50% de la muestra). Se examinaron al menos 100 glomérulos por cada biopsia. Se examinaron al menos 10 campos por muestra a pocos aumentos (10x) para la puntuación histológica del intersticio. Todas las biopsias renales se analizaron por el mismo patólogo, con anonimato simple.

Análisis inmunohistoquímicos

Se usó anticuerpo monoclonal de rata contra un antígeno citoplasmático presente en monocitos y macrófagos de ratón (F4/80, 4 μ g/ml, Caltag Laboratories, Burlingame, CA) para la detección de células infiltrantes por la técnica de inmunoperoxidasa. Se incubaron las secciones durante 30 minutos con 0,3% de H₂O₂ en metanol para inactivar la peroxidasa endógena. Se permeabilizó entonces el tejido con 0,1% de Triton X-100 en PBS 0,01 mol/l, pH 7,2 durante 30 minutos y se incubó entonces con suero de cabra normal (Vector Laboratories) durante 30 minutos. Se incubó el anticuerpo primario durante una noche a 4°C, seguido del anticuerpo secundario (IgG de cabra anti-rata biotinilado, Vector Laboratories) y solución de complejo de avidina-biotina/peroxidasa (ABC) y finalmente revelado con DAB. Se contratiñeron las secciones con hematoxilina de Harris. Se obtuvieron los controles negativos omitiendo el anticuerpo primario. Se contaron las células marcadas con F40/80 en al menos 10 campos microscópicos de alta potencia seleccionados aleatoriamente (x400) por cada animal.

Análisis estadístico

Los datos se expresan como media \pm desviación estándar (DE). Se analizaron las curvas de supervivencia mediante la prueba del orden logarítmico. Se analizaron los datos de proteinuria mediante la prueba exacta de Fisher. Todos los demás parámetros se analizaron mediante la prueba de Kruskal-Wallis. Se definió la significación estadística como $P < 0,05$.

Ejemplo 1: Resultados

Peso corporal, ingesta de alimento y agua

Como se muestra en la tabla 1, los ratones con lupus ganaron peso durante el estudio. No se observó una diferencia del peso corporal entre los grupos experimentales. La ingesta de alimento (tabla 2) y agua (tabla 3) evaluada cada dos semanas de los meses 2 a 5 era comparable entre los ratones tratados con vehículo y CYC202.

Supervivencia de ratones con lupus

Los ratones NZB/W F1 tratados con CYC202 a las dosis de 200 y 100 mg/kg, empezando a los 2 meses de edad, sobrevivieron significativamente más ($P < 0,05$) que los ratones con vehículo (véanse la tabla 4 y la figura 1). Realmente, al final del estudio (mes 8) solo 4 de los 13 ratones NZB/W (31%) que se habían tratado con vehículo seguían vivos; 10 de 13 ratones (77%) y 10 de 14 ratones (71%) tratados con CYC202 200 y 100 mg/kg, respectivamente, sobrevivieron. En el grupo de ratones suministrados con CYC202 (100 mg/kg) desde los 5 meses de edad (tratamiento terapéutico), el porcentaje de supervivencia no era diferente del registrado en ratones con vehículo.

Proteinuria y función renal

Se evaluó el porcentaje acumulado de ratones con proteinuria grave (>4 mg/día) en diferentes etapas de la enfermedad en todos los grupos experimentales. Como se muestra en la tabla 5, en el grupo de vehículo el porcentaje de ratones con proteinuria aumentaba progresivamente con el tiempo (figura 2). Al final del estudio, el porcentaje de ratones proteinúricos era de 85%. El CYC202 suministrado como terapia preventiva retardaba significativamente el inicio de la proteinuria en comparación con el vehículo de manera dependiente de la dosis (% de ratones proteinúricos, mes 8: 200 mg/kg, 23%, $P < 0,01$ frente a vehículo; 100 mg/kg, 43%, $P < 0,05$ frente a vehículo). Cuando se administraba CYC202 a ratones con lupus desde los 5 meses de edad, se observó una tendencia hacia un porcentaje reducido de ratones proteinúricos con respecto al vehículo, que sin embargo no alcanzó significación estadística.

Se midió la función renal, valorada por NUS sérico, a los 5 y 8 meses. A los 5 meses, los niveles de NUS sérico estaban dentro del intervalo normal (< 29 mg/dl) en todos los grupos experimentales. En el grupo de vehículo, la función renal se deterioró con el tiempo y a los 8 meses el 50% de los animales supervivientes tenían niveles de NUS ≥ 30 mg/dl (tabla 6). El CYC202 suministrado como terapia preventiva daba como resultado una mejor función renal de ratones con lupus, mientras que no era eficaz cuando se administraba tarde.

Anticuerpos anti-ADN

Los niveles elevados de anticuerpo anti-ADN son característicos de ratones NZB/W F1. Como se muestra en la tabla 7, los ratones suministrados con vehículo exhibían niveles crecientes de anticuerpos anti-ADN con el tiempo. A los 5 u 8 meses de edad, los ratones tratados desde los 2 meses con CYC202 a ambas dosis mostraron niveles de anticuerpo anti-ADN significativamente menores que con vehículo. En el grupo de ratones receptores de CYC202 desde los 5 meses, la concentración de anticuerpo anti-ADN era numéricamente, si bien no significativamente, menor que con vehículo a los 8 meses (figura 3).

Niveles de transaminasas séricas

Se midieron los niveles de ALT y AST séricas en ratones NZB/W F1 suministrados con CYC202 200 mg/kg desde los 2 meses o con CYC202 100 mg/kg desde los 5 meses. Los niveles de transaminasas séricas no se modificaron mediante los tratamientos y los valores eran similares a los de los ratones de control (tabla 8).

Morfología renal

Como se muestra en la tabla 9, al final del estudio los ratones NZB/W suministrados con vehículo revelaron cambios glomerulares con hiperplasia intracapilar asociada a una proliferación extracapilar focal. Se detectaron depósitos de tipo inmunitario en el mesangio y en la cara subendotelial de la membrana basal glomerular. Se observaron también daño tubular e inflamación intersticial. El tratamiento desde los 2 meses con CYC202 limitaba notablemente la hiperplasia glomerular, los depósitos inmunitarios y el daño tubulointersticial. Estos efectos eran más pronunciados cuando se suministraba CYC202 a la dosis de 200 mg/kg. Se observó solo un efecto leve sobre la morfología renal en ratones administrados con CYC202 desde los 5 meses.

Acumulación intersticial de monocitos/macrófagos

Se analizaron en los riñones monocitos/macrófagos positivos de F4/80 mediante técnicas inmunohistoquímicas. Estaba presente una acumulación marcada de células positivas de F4/80 en el intersticio renal de los ratones NZB/W suministrados con vehículo (tabla 10). El tratamiento preventivo con CYC202 200 mg/kg reducía notablemente el número de monocitos/macrófagos positivos de F4/80 con respecto al vehículo. El CYC202 a la dosis de 100 mg/kg limitaba, sin bien no en un grado estadísticamente significativo, la acumulación intersticial de células mononucleares. Se observó una reducción numérica de las células positivas de F4/80 en el estudio terapéutico.

Los resultados del presente proyecto indican claramente que CYC202 (200 y 100 mg/kg), suministrado como terapia preventiva desde los 2 meses de edad, retardaba la manifestación renal de lupus en ratones NZB/W y prolongaba notablemente la vida en comparación con animales suministrados con vehículo. Específicamente, el CYC202 retardaba el inicio de la proteinuria y el deterioro de la función renal y limitaba los cambios glomerulares y tubulointersticiales incluyendo la acumulación intersticial de células mononucleares, siendo los efectos más pronunciados a la dosis de 200 mg/kg. Era un notable hallazgo del presente estudio la reducción de los niveles de anticuerpos anti-ADN por CYC202, lo que podría atribuirse a los efectos de CYC202 sobre los linfocitos T, que a su vez pueden afectar a linfocitos B. Mediante experimentos *in vitro*, se ha observado una inhibición dependiente de la concentración de la proliferación de linfocitos T inducida por PMA y ConA, así como en reacción de linfocitos mixtos. Por otro lado, hay evidencias de que en LSE los linfocitos T autoinmunitarios activados específicos de histonas o nucleosomas pueden proporcionar ayuda a los linfocitos B para diferenciarse en células plasmáticas productoras de anti-ADN (para revisión, véase Rekvig, *Arthritis & Rheumatism* 48: 300-312, 2003).

La administración de CYC202 (100 mg/kg) iniciada a los 5 meses de edad daba como resultado una leve reducción del porcentaje de ratones proteinúricos y del daño renal con respecto de los ratones con vehículo. La supervivencia no mejoraba.

Ejemplo 2: Resultados

Peso corporal

Los ratones NZB/W F1 ganaron peso durante el estudio. No se observó diferencia en el peso corporal entre los grupos experimentales.

Supervivencia

Los ratones NZB/W F1 tratados con la combinación de CYC202 y metilprednisolona (MPS), a partir de los 5 meses de edad, sobrevivían significativamente más ($P<0,0001$) que los ratones con vehículo (tabla 11). Notablemente, a los 12 meses cuando todos los ratones suministrados con vehículo habían muerto, 10 de los 16 animales (62%) tratados con la terapia combinada seguían vivos. Las curvas de supervivencia de ratones receptores de las terapias individuales no eran diferentes de la del grupo de vehículo.

Proteinuria

La tabla 12 muestra el porcentaje acumulativo de ratones con proteinuria >4 mg/día evaluada en diferentes etapas de la enfermedad. La asociación de CYC202 y MPS retardaba significativamente el inicio de la proteinuria en comparación con vehículo. En el intervalo de 7 a 10 meses, la proporción de ratones proteinúricos en el grupo de terapia combinada era significativamente menor que el en grupo de vehículo (6,2 a 43,8% frente a 40 a 90%). CYC202 o MPS administrados como terapias únicas afectaban solo parcialmente al inicio de la proteinuria en comparación con vehículo, observándose una reducción significativa del porcentaje de ratones proteinúricos a los 7,5 meses para el grupo de CYC202.

Función renal

Se midió la función renal, valorada por el NUS sérico, mensualmente desde el mes 5 (antes del tratamiento) al mes 12. La tabla 13 muestra el porcentaje acumulado de ratones con niveles de NUS ≥ 30 mg/dl. A los 5 meses, los niveles de NUS sérico estaban dentro de intervalo normal (concretamente, de 14 a 29 mg/dl) en todos los grupos experimentales. En el grupo de vehículo, la función renal se deterioraba con el tiempo. Por tanto, a los 8 y 12 meses el 80 y 100% de los animales, respectivamente, tenía niveles de NUS ≥ 30 mg/dl. En contraposición, solo un 27 y 53% de los ratones de la terapia combinada tenía función renal deteriorada en estos puntos temporales. CYC202 o MPS suministrados solos exhibían un efecto nefroprotector menor que cuando se usaban en combinación.

Morfología renal

Se efectuó el análisis morfológico en especímenes renales tomados de ratones terminalmente enfermos en diferentes momentos o de ratones sacrificados a los 12 meses. Los datos se reseñan en la tabla 14. Los ratones NZB/W suministrados con vehículo revelaron cambios glomerulares con hiper celularidad intracapilar asociada a una proliferación extracapilar focal. Se detectaron depósitos de tipo inmunitario en el mesangio y en la cara subendotelial de la membrana basal glomerular. Se observaron también daño tubular e inflamación intersticial. El tratamiento con CYC202 más MPS limitaba notablemente la hiper celularidad glomerular, los depósitos inmunitarios y el daño tubulointersticial. Se observó un efecto leve sobre la morfología renal en ratones administrados con CYC202 o MPS solos.

Acumulación intersticial de monocitos/macrófagos

Se analizaron en los riñones los monocitos/macrófagos positivos de F4/80 mediante técnicas inmunohistoquímicas. Estaba presente una marcada acumulación de células positivas de F4/80 en el intersticio renal de ratones NZB/W suministrados con vehículo (tabla 15). La administración combinada de CYC202 y MPS daba como resultado un 65% de reducción del número de monocitos/macrófagos con respecto al vehículo ($P<0,01$). El CYC202 suministrado solo reducía los infiltrados intersticiales un 33%. En el grupo de ratones tratados con MPS solo, la acumulación intersticial de células mononucleares era similar a la encontrada en el grupo de vehículo.

A modo de resumen, los resultados mostraban que CYC202 combinado con metilprednisolona a dosis baja prolongaba significativamente la vida de ratones con lupus. Notablemente, el tratamiento se iniciaba en una fase de enfermedad establecida, concretamente a los 5 meses de edad, cuando la deposición de complejo inmunitario está teniendo lugar activamente. La terapia combinada retardaba el inicio de la proteinuria, limitaba el deterioro de la función renal y el desarrollo de hiper celularidad glomerular, depósitos inmunitarios y cambios tubulointersticiales. Se expuso también un efecto antiinflamatorio, como se indicaba por una acumulación reducida de células

mononucleares en el intersticio renal. La administración de CYC202 o metilprednisolona como terapias únicas daba como resultado un efecto nefroprotector leve.

En conclusión, los resultados del efecto terapéutico de CYC202 y MPS en dosis baja combinados mejorando la manifestación renal del lupus y prolongando la supervivencia en ratones con lupus con la enfermedad establecida podrían representar la base de un nuevo tratamiento para la nefritis por lupus.

Ejemplos 3 y 4: Materiales y procedimientos

Se ensayaron inhibidores de CDK 2, 7 y 9 seleccionados (inhibidores transcripcionales), los compuestos [1]-[12], en un ensayo de proliferación de linfocitos T, elegido como ensayo vicario del efecto de los anticuerpos antinucleares.

Como se menciona anteriormente, la producción de anticuerpos antinucleares puede estudiarse solo *in vivo* puesto que la producción de estos anticuerpos requiere un sistema inmunitario disfuncional que comprende tanto linfocitos B como T, y la incapacidad de seleccionar y destruir células inmunitarias que se autorreconozcan. Sin embargo, los ensayos *in vitro* de la función de linfocitos T (por ejemplo, un ensayo de proliferación del linfocitos T) son herramientas de cribado apropiadas para identificar compuestos que puedan tener la capacidad de modular la respuesta inmunitaria en la situación compleja de enfermedad autoinmunitaria. Por tanto, un ensayo de proliferación de linfocitos T puede proporcionar una medida del efecto de un compuesto sobre anticuerpos antinucleares.

Preparación de células mononucleares de sangre periférica

Se realizaron dos ensayos separados, los ejemplos 3 y 4. Se obtuvo sangre leucocítica de 3 o 4 donantes sanos (ejemplos 3 y 4, respectivamente) de los Scottish National Blood Transfusion Services y se separó mediante centrifugación en tubos de preparación celular BD Vacutainer™ CPT (4 ml de capacidad de extracción, con citrato de sodio, REF362781) a 300 g durante 30 minutos a temperatura ambiente (TA). Se recuperó la capa de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) pipeteando y agrupando en tubos de centrifuga de 50 ml, se lavó entonces dos veces en 3 volúmenes de solución salina tamponada de Hank (sin CaCl_2 ni MgCl_2 , nº Gibco 14175-053) mediante centrifugación a 300 g durante 15 minutos (a TA). Se resuspendieron las PBMC en medio de cultivo RPMI 1640 suplementado con 10% de suero fetal bovino y se determinó el número de células viables mediante exclusión con azul de tripano.

Estimulación celular y tratamiento

Se sembraron PBMC en placas de 96 pocillos a 1×10^5 células/pocillo en 50 μl por pocillo de medio de cultivo. Se sembraron como control de ensayo células de leucemia CCRF-CEM y de mieloma múltiple LP-1 a 4000 y 5000 células/pocillo en 100 μl /pocillo de medio de cultivo de tejido RPMI 1640/10% de suero fetal bovino (FCS), respectivamente, y crecieron sin estimulación ni tratamiento con compuesto durante el experimento. Todos los estimulantes y compuestos se completaron a 4 x concentración final con medio de cultivo de tejido y se añadieron entonces 25 μl de cada fármaco y estimulante a los pocillos, para un volumen final de 100 μl /pocillo. Para los controles no estimulados, se añadieron 25 μl de medio de cultivo de tejido a los pocillos en lugar de estimulante y para las células no tratadas se añadieron 25 μl /pocillo de medio de cultivo de tejido que contenía un volumen igual de DMSO (al 0,1% final). Se trataron tres pocillos adyacentes para cada condición de estimulación/tratamiento y se calculó el valor medio para análisis.

Para el ejemplo 3, se dejaron asentar las células durante 2 horas antes de estimular con PHA (fitohemaglutinina PHA-P, Sigma L9132) 50 $\mu\text{g/ml}$ o PMA/I (13-acetato-12-miristato de forbol/ionomicina, Sigma P8139/I0634) 50/250 ng/ml. Además, se estimularon las PBMC con ConA (concanavalina A, Sigma C5275) a concentraciones en el intervalo de 0,5 $\mu\text{g/ml}$ a 100 $\mu\text{g/ml}$ para identificar su efecto estimulante y concentración óptima. Para el ejemplo 4, se estimularon las PBMC inmediatamente después de la siembra con ConA 50 $\mu\text{g/ml}$ como anteriormente o 10 $\mu\text{g/ml}$.

Para el ejemplo 3, se trataron PBMC estimuladas y no estimuladas con los compuestos [1]-[10] a concentraciones de Cl_{50} , $2 \times \text{Cl}_{50}$, $3 \times \text{Cl}_{50}$ y $4 \times \text{Cl}_{50}$. Se añadieron los compuestos 2 horas antes de la estimulación (momento de siembra), en el momento de estimulación y 2 horas después de la estimulación y se incubaron entonces las células a 37°C, 5% de CO_2 durante 50, 48 y 46 horas con compuesto, respectivamente, o hasta 48 horas después de la estimulación. Para el ejemplo 4, se trataron las PBMC estimuladas con los compuestos anteriores, más los compuestos [11] y [12], con todos los compuestos ensayados a $0,5 \times \text{Cl}_{50}$ y $0,25 \times \text{Cl}_{50}$ además de las concentraciones anteriores. Se añadieron los compuestos inmediatamente después de la estimulación y se incubaron las células durante 48 y 72 horas. Las Cl_{50} se basaron en las Cl_{50} promedio de 72 horas de ensayos de citotoxicidad en paneles de células tumorales propias del laboratorio (tabla 16), excepto para los compuestos [1] y [3], para los que las Cl_{50} se basaron en las Cl_{50} publicadas anteriormente usadas en el laboratorio, ya que no estaban disponibles datos propios del laboratorio de Cl_{50} .

ELISA de BrdU y ensayo de azul de Alamar

Se determinó la actividad de proliferación de PBMC después de la estimulación y tratamiento con compuesto midiendo la incorporación de BrdU, usando el kit de proliferación ELISA (colorimétrico) BrdU (Roche nº 1.647.229). Este kit es un procedimiento de reemplazo no radiactivo para la incorporación de ³H-timidina. Se marcaron las células con BrdU durante 2 horas antes de recolectar. Se centrifugaron entonces las placas durante 10 minutos a 300 g (TA), se retiró el sobrenadante de los pocillos mediante pipeteado y se secaron las células durante 1 hora a 60°C. Se añadió solución FixDenat a las placas (100 µl/pocillo), se incubó durante 30 minutos, se sacudió entonces para retirarla y se añadió solución anti-BrdU-POD a las placas (100 µl/pocillo) y se incubó durante 90 minutos. Después de 3 lavados con solución de lavado (200 µl/pocillo), se incubaron las placas con solución de sustrato (100 µl/pocillo) durante 30 minutos, se añadió entonces H₂SO₄ 1 M (25 µl/pocillo) y se leyó la densidad óptica a 450 nm en un lector de placas Ascent Fluoroskan.

Se valoró la viabilidad de las PBMC usando reactivo azul de Alamar (Biosource nº DAL1100). Se completó azul de Alamar al 20% reciente con medio de cultivo y se añadieron 100 µl a cada pocillo para una concentración final de 10%. Se incubaron las placas con azul Alamar a 37°C, 5% de CO₂, durante 3 horas antes del momento de recogida (48 o 72 horas) y se leyó entonces la fluorescencia usando una longitud de onda de excitación de 535 nm y una longitud de onda de emisión de 595 nm en un lector de placas Tecan Ultra.

Ejemplo 3: Resultados

La estimulación con PHA aumentaba la incorporación de BrdU aproximadamente 7 veces en comparación con las células no estimuladas. El tratamiento con vehículo DMSO no afectaba a la incorporación de BrdU ni a la viabilidad de las células estimuladas con PHA o no estimuladas (figura 4). Como se muestra en la figura 5, el tratamiento de las células estimuladas con PHA con todos los compuestos ensayados reducía la incorporación de BrdU en muchos casos por debajo del nivel observado en células no estimuladas. La reducción de la incorporación de BrdU es evidente a concentraciones tan bajas como CI₅₀ y, con las excepciones de los compuestos [9] y [10], la cantidad de incorporación de BrdU aún restante no se correlaciona con la concentración de compuesto, sugiriendo conjuntamente que los compuestos han alcanzado su efecto inhibitor de la proliferación máximo a CI₅₀. Para los compuestos [9] y [10], el efecto es claramente dependiente de la concentración, con 3-4 veces más incorporación de BrdU a CI₅₀, cayendo a niveles no estimulados a concentraciones mayores.

Para la mayoría de compuestos, el momento de tratamiento con compuesto respecto al momento de estimulación no tenía un gran efecto sobre el nivel de incorporación de BrdU, lo más probablemente debido a que la estimulación todavía no había tenido efecto en esas primeras 4 horas después de la siembra de PBMC. Las excepciones a esto son los compuestos [2], [3] y [4] en que, sorprendentemente, hay menos reducción de la incorporación de BrdU con el pretratamiento con compuesto (-2h) que cuando se inició el tratamiento con compuesto al mismo tiempo o después que la estimulación (figura 5).

De forma similar el tratamiento con PHA, la estimulación con PMA/I da como resultado un aumento de aproximadamente 7 veces en la incorporación de BrdU frente a las células no estimuladas en ausencia del compuesto (figura 5). El tratamiento con todos los compuestos distintos de los compuestos [4], [9] y [10] reducía la incorporación de BrdU aún más que en las células estimuladas con PHA y generalmente hasta niveles menores que los observados en células no estimuladas, a todas las concentraciones. Las PBMC estimuladas con PMA/I y tratadas con DMSO solo mostraron muy baja viabilidad en el ensayo de azul de Alamar, mientras que la incorporación de BrdU aumentaba (figura 4), como se menciona anteriormente. De forma similar, la incorporación de BrdU aún restante después del tratamiento de células estimuladas con PMA/I con los compuestos [4], [9] y [10] es mayor que en células estimuladas con PHA, a pesar de los valores negativos de azul de Alamar.

La titulación de la concanavalina A muestra que la ConA estimula las PBMC de manera dependiente de la concentración, alcanzando un efecto máximo a 10 µg/ml. La incorporación de BrdU se reduce entonces a los niveles no estimulados (mayores concentraciones) consistentes con la valoración de viabilidad y observaciones microscópicas que indican que las PBMC no son viables con las concentraciones de ConA mayores ensayadas. Cuando se compara con PHA y PMA/I, la estimulación con ConA 10 µg/ml aumenta la incorporación de BrdU a un nivel comparable, o a aproximadamente 6 veces por encima de las PBMC no estimuladas, sin reducir la viabilidad (figura 7).

Ejemplo 4: Resultados

El ejemplo 3 concluía que todos los compuestos ensayados afectan a la actividad de proliferación de las células PBMC estimuladas a concentraciones tan bajas como CI₅₀. Se llevó a cabo un experimento posterior (ejemplo 4) para estudiar la dependencia de la concentración de este efecto a concentraciones de fármaco menores de CI₅₀. Se repitieron los tratamientos como anteriormente, con la adición de tratamientos a concentraciones menores de 0,5 y 0,25 x CI₅₀ y control de DMSO, para todos los compuestos ensayados anteriormente más los compuestos [11] y [12]. Puesto que el momento de tratamiento con compuesto respecto a la estimulación no parecía ser crucial para la

inhibición de la actividad de proliferación, se estimularon y trataron con compuesto las PBMC al mismo tiempo, inmediatamente después de la siembra. Se estimularon las células con PHA como anteriormente o con ConA 10 µg/ml.

- 5 La estimulación con PHA aumentó la incorporación de BrdU de células tratadas con DMSO en más de 20 veces y la estimulación con ConA más de 10 veces, en comparación con las células no estimuladas, a las 48 horas, con aumento adicional a las 72 horas, y el vehículo DMSO no tenía efecto sobre la incorporación de BrdU ni la viabilidad (figura 8). Como se muestra en la figura 9, todos los compuestos reducían la incorporación de BrdU de manera dependiente de la concentración, alcanzando la mayoría el efecto máximo a concentraciones de CI_{50} o $2 \times CI_{50}$, cuando se estimulaban con PHA. Esto confirma la observación anterior de que la dependencia de la concentración no se detectaba a concentraciones mayores de CI_{50} , puesto que el efecto máximo ya se había alcanzado. Globalmente, se observó el mismo efecto para las PBMC estimuladas con ConA, aunque se alcanzó el efecto máximo a concentraciones ligeramente menores. Esto puede ser el resultado del hecho de que las señales de BrdU caigan a niveles de fondo al efecto máximo y, como las señales son generalmente solo la mitad de elevadas para células estimuladas con ConA que para células estimuladas con PHA, la sensibilidad del ensayo puede ser ligeramente menor para el primero.

- 20 Como anteriormente, los compuestos [4], [9] y [10] se comportan de forma ligeramente diferente del resto de los compuestos. Consistentemente con el experimento anterior, se observó claramente la dependencia de la concentración para los compuestos [9] y [10] a concentraciones mayores de CI_{50} , que se extendió entonces a las concentraciones menores. A $4 \times CI_{50}$, la incorporación de BrdU seguía reduciéndose y las señales se aproximaban a los niveles de fondo para células estimuladas con ConA, pero eran ligeramente mayores en células estimuladas con PHA. Sin desear ligarse a teoría alguna, esto sugiere que la actividad de proliferación se inhibirá completamente como con los demás compuestos, pero que son necesarias mayores concentraciones para conseguir esto.

- 25 Para las células tratadas con compuesto [4], las señales de BrdU no se reducen a niveles de fondo con ninguna estimulación, incluso a $4 \times CI_{50}$. Además, se observó poca correlación entre la incorporación de BrdU y la concentración de compuesto a las concentraciones mayores, consistentemente con los resultados anteriores. Sin desear ligarse a teoría alguna, esto sugiere que el efecto del compuesto [4] sobre la actividad de proliferación se maximiza a aproximadamente $2 \times CI_{50}$ como para la mayoría de los demás compuestos, pero que el grado de inhibición conseguido es menor.

- 30 La valoración de viabilidad por el ensayo de azul de Alamar mostró que la viabilidad de las PBMC se reduce ligeramente con la estimulación, pero es generalmente comparable entre PBMC tratadas con compuesto, tratadas con DMSO y no tratadas. Además, no está asociada una reducción de las cuentas de azul de Alamar con concentraciones de compuesto crecientes, confirmando que la incorporación de BrdU decreciente no está causada por efectos de citotoxicidad de los compuestos y es puramente representativa de la inhibición de la actividad de proliferación.

- 40 A modo de resumen, los experimentos han mostrado que el tratamiento con cualquiera de una serie de inhibidores transcripcionales altera el efecto de la estimulación con PHA o ConA sobre linfocitos T, dando como resultado una inhibición completa de la actividad de proliferación de manera dependiente de la concentración. Globalmente, se observa la misma tendencia para células estimuladas con PHA y ConA, aunque la inhibición completa de la proliferación parece alcanzarse a concentraciones menores de fármaco en células estimuladas con ConA que en células estimuladas con PHA. Esto puede ser un artefacto por la menor estimulación total conseguida con ConA que con PHA. La mayoría de compuestos sigue el mismo patrón en que se observa primero algo de inhibición de la actividad de proliferación a concentraciones tan bajas como de $0,25 \times CI_{50}$ o $0,5 \times CI_{50}$, alcanzando entonces la inhibición completa aproximadamente a $2 \times CI_{50}$, con algunas diferencias en cuanto a la rapidez de caída de la actividad de proliferación al aumentar las concentraciones de compuesto. Es un ejemplo notable el compuesto [7], que alcanza la inhibición completa a concentraciones tan bajas como de $0,25 \times CI_{50}$. Sin embargo, la comparación entre concentraciones específicas de diferentes compuestos debe enfocarse con precaución puesto que los valores de CI_{50} están basados en medias de diferentes paneles celulares.

- 55 Se observan excepciones al patrón descrito para los compuestos [9] y [10], que se requieren a concentraciones mayores que los demás compuestos para tener el mismo efecto, y para el compuesto [4], que sigue la misma dependencia de la concentración que los demás pero no consigue una inhibición completa de la actividad de proliferación a las concentraciones mayores.

- 60 Los experimentos han mostrado que la viabilidad de las PBMC se reduce ligeramente con la estimulación, pero ninguna reducción adicional está asociada al tratamiento con compuesto. De forma más importante, la viabilidad es claramente independiente de la concentración de compuesto y la reducción medida de la incorporación de BrdU representa por lo tanto una inhibición verdadera de la actividad de proliferación y no la citotoxicidad de los compuestos.

- 65 Resultarán evidentes para los expertos en la materia diversas modificaciones y variaciones de la invención sin apartarse del alcance y espíritu de la invención. Aunque la invención se ha descrito con relación a realizaciones

preferidas específicas, debe entenderse que la invención como se reivindica no debe limitarse indebidamente a dichas realizaciones específicas. Es más, se pretende que estén cubiertas por la presente invención diversas modificaciones de los modos descritos para llevar a cabo la invención que sean obvios para los expertos en la materia de los campos relevantes.

Referencias

Balomenos D. *et al.* "The cell cycle inhibitor p21 controls T-cell proliferation and sex-linked lupus development". Nat. Med., 6: 171-176, 2000.

Coma D *et al.* "Mycophenolate mofetil limits renal damage and prolongs life in murine lupus disease". Kidney Int., 51: 1583-1589, 1997.

Foster MH. *et al.* "Relevance of systemic lupus erythematosus nephritis animal models to human disease". Semin. Nephrol., 19: 12-24, 1999.

Gelfand MC *et al.* "Therapeutic studies in NZB/W mice. I. Synergy of azathioprine, cyclophosphamide and metilprednisolona in combination". Arthritis Rheum., 15: 239-246, 1972.

Kewalramani R. *et al.* "Immunopathogenesis of lupus and lupus nephritis: recent insights". Curr. Opin. Nephrol. Hypertens., 11: 273-277, 2002.

Von Mullen C. A. *et al.* "Autoantibodies in the Diagnosis of Systemic Rheumatic Diseases". Semin. Arthritis Rheum. 1995; 24: 323-58.

Peutz-Kootstra C.J. *et al.* "Lupus nephritis: lessons from experimental animal models". J. Lab. Clin. Med., 137: 244-259, 2001.

Rekvig OP *et al.* "Anti-double-stranded DNA antibodies, nucleosomes, and systemic lupus erythematosus". Arthritis & Rheumatism 48: 300-312, 2003.

Reichlin M. *et al.* "Antinuclear Antibodies: An Overview, Dubois' Lupus Erythematosus" 5ª ed., eds Wallace D. J. and Hahn B. H., Williams, Wilkins and Baltimore, 1997, p397-405.

Shankland S.J. *et al.* "Cell cycle regulatory proteins in renal disease: role in hypertrophy, proliferation, and apoptosis". Am. J. Physiol. Renal. Physiol., 278: F515-F529, 2000.

Van Venrooij W. J. *et al.* "Manual of Biological Markers of Disease, Section B: Autoantigens". Kluwer Academia Publishing, 1994.

Xu L. *et al.* "Human lupus T cells resist inactivation and escape death by upregulating COX-2". Nature Medicine, 10: 411-415, 2004.

Zoja C. *et al.* "Renal expression of monocyte chemoattractant protein-1 in lupus autoimmune mice". J. Am. Soc. Nephrol. 8: 720-729, 1997.

Zoja C. *et al.* "Bindarit retards renal disease and prolongs survival in murine lupus autoimmune disease". Kidney Int., 53: 726-734, 1998.

Zoja C. *et al.* "Mycophenolate mofetil combined with a cyclooxygenase-2 inhibitor ameliorates murine lupus nephritis". Kidney Int., 60: 653-663, 2001.

Tabla 1: Peso corporal

	2	3	4	5	6	7	8 meses
Vehículo	27,69 ± 0,61	27,85 ± 0,59	28,31 ± 0,56	28,08 ± 0,79	29,91 ± 0,65	31,60 ± 0,75	31,75 ± 1,11
CYC202 (200 mg/kg) Estudio preventivo	27,85 ± 0,72	28,00 ± 0,68	28,54 ± 0,45	28,92 ± 0,35	31,58 ± 0,43	30,82 ± 0,35	31,60 ± 0,52
CYC202 (100 mg/kg) Estudio preventivo	27,93 ± 0,62	27,86 ± 0,52	28,07 ± 0,57	28,64 ± 0,57	30,23 ± 0,67	31,50 ± 0,87	3,78 ± 0,91
CYC202 (100 mg/kg) Estudio terapéutico	26,71 ± 0,74	28,14 ± 0,69	29,43 ± 1,01	29,71 ± 0,82	31,45 ± 0,96	30,80 ± 1,69	29,80 ± 1,46
Los valores se expresan como media ± DE							

Tabla 2: Ingesta de alimento

	2	2,5	3	3,5	4	4,5	5 meses
Vehículo	3,77 ± 0,28	4,31 ± 0,17	4,15 ± 0,22	3,62 ± 0,35	3,54 ± 0,35	3,31 ± 0,35	3,50 ± 0,15
CYC202 (200 mg/kg) Estudio preventivo	3,54 ± 0,29	4,08 ± 0,08	4,00 ± 0,11	4,08 ± 0,21	4,00 ± 0,16	4,00 ± 0,18	3,92 ± 0,29
CYC202 (100 mg/kg) Estudio preventivo	3,69 ± 0,33	3,77 ± 0,23	3,92 ± 0,18	4,08 ± 0,18	3,92 ± 0,26	3,85 ± 0,30	3,85 ± 0,22

Los valores se expresan como media ± DE

Tabla 3: Ingesta de agua

	2	2,5	3	3,5	4	4,5	5 meses
Vehículo	4,62 ± 0,33	5,00 ± 0,30	5,00 ± 0,30	4,54 ± 0,39	5,15 ± 0,15	5,00 ± 0,23	5,08 ± 0,23
CYC202 (200 mg/kg) Estudio preventivo	5,31 ± 0,26	4,77 ± 0,20	4,92 ± 0,18	5,08 ± 0,21	4,85 ± 0,27	4,38 ± 0,43	4,23 ± 0,28
CYC202 (100 mg/kg) Estudio preventivo	6,64 ± 0,29	5,14 ± 0,40	4,21 ± 0,28	5,00 ± 0,28	5,57 ± 0,20	4,43 ± 0,20	3,93 ± 0,22

Los valores se expresan como media ± DE

5

Tabla 4: Porcentaje de supervivencia

	3	4	5	5,5	6	6,5	7	7,5	8 meses
Vehículo	100	100	92	85	85	62	38	31	31
CYC202 (200 mg/kg) Estudio preventivo	100	100	100	92	92	92	85	77	77
CYC202 (100 mg/kg) Estudio preventivo	100	100	100	100	93	71	71	71	71
CYC202 (100 mg/kg) Estudio terapéutico	100	100	100	93	71	64	36	36	36

Tabla 5: Porcentaje acumulado de ratones proteinúricos

	3	4	5	5,5	6	6,5	7	7,5
Vehículo	0	0	7,7	46,0	69,0	77,0	77,0	85
CYC202 (200 mg/kg)	0	0	0	23,1	23,1*	23,1**	23,1**	23,1**
CYC202 (100 mg/kg)	0	0	0	0**	21,4*	21,4**	42,9	42,9*
CYC202 (100 mg/kg)	0	0	7,1	21,4	28,5	35,7	50,0	57

*P<0,05, **P<0,01 frente a vehículo

10

Tabla 6: Función renal valorada por NUS sérico

	8 meses
Vehículo	50% (43-169 mg/dl)
CYC202 (200mg/kg) Estudio preventivo	30% (36-88 mg/dl)
CYC202 (100mg/kg) Estudio preventivo	33% (31-43 mg/dl)
CYC202 (100mg/kg) Estudio terapéutico	40% (30-111 mg/dl)

Tabla 7: Anticuerpos anti-ADN séricos (U/ml)

	5 meses	8 meses
Vehículo	181,30 ± 74,15	367,29 ± 149,02
CYC202 (200 mg/kg) Estudio preventivo	24,20 ± 6,52	73,39 ± 21,13*

CYC202 (100 mg/kg) Estudio preventivo	5 meses	4,04 ± 0,76**
	8 meses	76,55 ± 21,40*
CYC202 (100 mg/kg) Estudio terapéutico	8 meses	153,22 ± 90,73
Control (ratones CD-1)		6,43 ± 1,34
Los valores se expresan como media ± DE *P<0,05, **P<0,01 frente a vehículo en el momento correspondiente		

Tabla 8: Transaminasa sérica (UI/l)

	AST (IU/l)	ALT (IU/l)
CYC202 (200 mg/kg) Estudio preventivo	62,89 ± 4,70	36,44 ± 4,04
CYC202 (100 mg/kg) Estudio terapéutico	74,40 ± 1,72	36,00 ± 2,45
Control (ratones CD-1)	78,00 ± 2,28	36,40 ± 2,64
Los valores se expresan como media ± DE		

Tabla 9: Histología renal

	Hipercelularidad intracapilar	Proliferación extracapilar	Depósitos de glomérulos	Daño tubulointersticial
Vehículo	2,00 ± 0,44	1,00 ± 0,38	1,14 ± 0,34	0,71 ± 0,23
CYC202 (200 mg/kg) Estudio preventivo	0,36 ± 0,15***	0,18 ± 0,18	0,27 ± 0,19*	0,25 ± 0,16*o
CYC202 (100 mg/kg) Estudio preventivo	0,92 ± 0,23*	0,67 ± 0,26	0,92 ± 0,23	0,46 ± 0,17
CYC202 (100 mg/kg) Estudio terapéutico	1,29 ± 0,18	0,57 ± 0,20	1,14 ± 0,26	0,61 ± 0,13
Los valores se expresan como media ± DE *P<0,05, **P<0,05, ***P<0,01 frente a CYC202 (100mg/kg) desde los 5 meses				

5

Tabla 10: Monocitos/macrófagos positivos de F4/80 en el intersticio renal

	8 meses
Vehículo	29,68 ± 5,97#
CYC202 (200 mg/kg) Estudio preventivo	8,56 ± 1,94*o#
CYC202 (100 mg/kg) Estudio preventivo	18,26 ± 4,89#
CYC202 (100 mg/kg) Estudio terapéutico	21,87 ± 5,13#
Control	0,25 ± 0,25

Tabla 11: Porcentaje de supervivencia

	5	5,5	6	6,5	7	7,5	8	8,5	9	9,5	10	10,5	11	11,5	12 m
	(pretratamiento)														
Vehículo	100	100	100	90	90	90	60	30	20	10	10	10	10	10	0
CYC202 (200mg/kg)	100	100	93	87	87	80	80	67	53	40	34	20	13	13	13
MPS (1,5 mg/kg)	100	100	100	92	75	67	67	67	42	42	33	33	33	33	33
CYC202+MPS	100	100	100	94	94	94	94	94	81	75	69	62	62	62	62
Los tratamientos empezaron a los 5 meses de edad. CYC202+MPS prolongaba significativamente (P<0,0001) la vida con respecto al vehículo.															

Tabla 12: Porcentaje acumulado de ratones con proteinuria >4mg/día

	5	5,5	6	6,5	7	7,5	8	8,5	9	9,5	10	10,5	11	11,5	12 m
	(pretratamiento)														
Vehículo	0	10	20	30	40	90	90	90	90	90	90	90	90	90	90
CYC202 (200 mg/kg)	0	0	6,7	26,7	26,7	46,6*	66,6	66,6	73,3	73,3	73,3	73,3	73,3	73,3	73,3
MPS (1,5 mg/kg)	0	0	16,7	33,3	33,3	50	75	75	75	75	75	75	75	75	75
CYC202+MPS	0	6,2	6,2	6,2	6,2*	25**	37,5*	43,8*	43,8*	43,8*	43,8*	50	56,2	56,2	56,2

Cada punto refleja el nivel actual de proteinuria en los ratones supervivientes así como la última medida en los ratones fallecidos. 0,05.
**P<0,01 frente a vehículo

Tabla 13: Función renal- porcentaje acumulado de ratones con NUS >30mg/dl

	5	6	7	8	9	10	11	12 meses
Vehículo	0	10%	40%	80%	90%	90%	90%	100%
CYC202 (200 mg/kg)	0%	7%	15%	43%	57%	64%	64%	64%
MPS (1,5 mg/kg)	0%	0%	17%	42%	50%	58%	58%	67%
CYC202+MPS	0%	0%	0%	27%	40%	40%	47%	53%

Los niveles de NUS > 30 mg/dl se consideraban anormales (intervalo normal: 14-29 mg/dl)

5

Tabla 14: Histología renal

		GLOMÉRULOS		DAÑO TUBULOINTERSTICIAL
	Hipercelularidad intracapilar	Proliferación extracapilar	Depósitos inmunitarios	
Vehículo	1,60 ± 0,24	1,00 ± 0,00	2,20 ± 0,37	1,70 ± 0,09
CYC202 (200 mg/kg)	1,14 ± 0,26	0,86 ± 0,14	1,43 ± 0,30	1,29 ± 0,23
MPS (1,5 mg /kg)	1,40 ± 0,40	0,80 ± 0,20	1,80 ± 0,20	1,20 ± 0,14
CYC202+MPS	0,70 ± 0,30	0,30 ± 0,15*	0,90 ± 0,23* ^o	0,45 ± 0,21**

Los valores se expresan como puntuación media ± DE.
*p<0,05, **p<0,01 frente a vehículo; ^op<0,05 frente a MPS.

Tabla 15: Monocitos/macrófagos F4/80 en el intersticio renal (células/HPF)

Vehículo	61,5 ± 4,6
CYC202 (200 mg/kg)	4,1 ± 8,6
MPS (1,5 mg/kg)	57,2 ± 10,5
CYC202+MPS	21,8 ± 4,8** ^o

Los valores se expresan como media ± DE.
HPF=campo de alta potencia.
**p<0,01 frente a vehículo, ^op<0,05 frente a <PS.
Intervalo de ratones CD-1 de control: 0-4 células/ HPF

10

Tabla 16: Valores promedio de Cl₅₀ a las 72 horas (μM) para un panel de células propias del laboratorio y valor de Cl₅₀ redondeado usado para facilitar el cálculo

Compuesto	Cl ₅₀ media	Número de líneas celulares	Cl ₅₀ usada
1	27*	1*	25*
2	16,45	62	16
3	56*	1*	50*
4	1,04	47	1

5	1,43	13	1,5
6	1,04	13	10
7	5,31	18	5
8	0,876	35	1
9	0,250	6	0,25
10	0,753	11	1
11	0,291	7	0,5
12	0,353	7	0,5

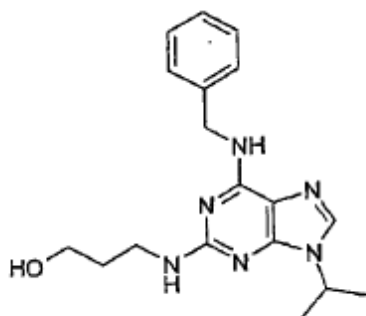
*No estaban disponibles datos propios del laboratorio de citotoxicidad,
 CI₅₀ publicadas para células HCT116 en Raynaud *et al.* Clin. Cancer Res. 11 (13): 4875-87, 2005.

Tabla 17: Valores medios de CI₅₀ (μM) para compuestos contra CDK/ciclina y enzimas Aurora a partir de ensayos de cinasa propios del laboratorio

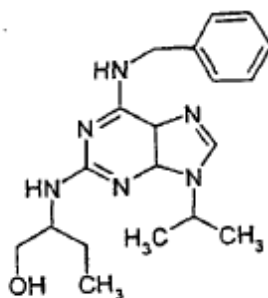
Compuesto	CDK1B	CDK2A	CDK2E	CDK4D1	CDK6D3	CDK7H	CDK9T1	AurA	AurB
1	>100	8,84	0,946	45,7	n/a	0,603	2,03	n/a	n/a
2	17,5	2,80	0,208	27,5	55,5	0,438	1,04	>100	n/a
3	>100	83,08	7,67	>100	n/a	>20	2,72	n/a	n/a
4	7,46	1,05	0,505	2,82	1,04	8,57	1,88	0,038	0,030
5	15,9	1,24	0,931	2,75	1,94	27,0	2,71	0,051	0,023
6	7,60	0,373	0,126	19,3	9,19	1,33	0,338	>10	>10
7	4,95	0,223	0,071	7,63	6,27	0,983	0,195	>10	>10
8	1,99	2,00	0,354	0,089	0,168	0,053	0,034	0,652	0,399
9	2,00	1,67	0,204	0,118	0,110	0,147	0,097	0,094	0,021
10	1,49	0,115	0,013	5,10	6,40	0,455	0,081	>10	>100
11	0,667	0,304	0,054	0,066	n/a	0,266	0,029	0,028	0,008
12	1,03	0,076	0,025	1,02	n/a	2,38	0,215	0,161	0,025

REIVINDICACIONES

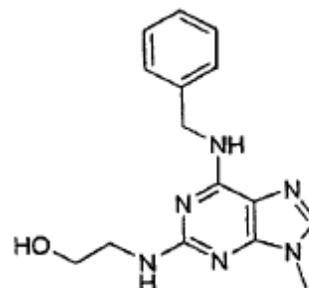
1. Uso de un inhibidor purínico de CDK2 y/o CDK7 y/o CDK9 seleccionado de



[1]

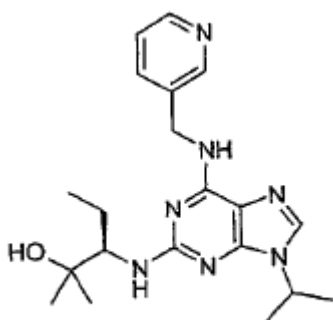


[2]

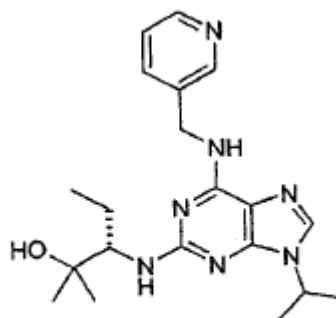


[3]

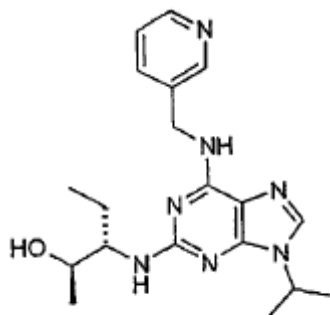
5



[5]



[6]



[8]

10

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en la preparación de un medicamento para el tratamiento de lupus inducido por fármacos o lupus sistémico eritematoso (LSE).

15

2. Uso según la reivindicación 1, en el que el medicamento es para tratar lupus sistémico eritematoso (LSE).

3. Uso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el medicamento es para uso en terapia de combinación con metilprednisolona.

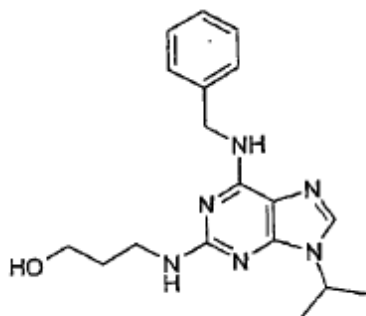
20

4. Uso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el inhibidor de CDK2 y/o CDK7 y/o CDK9 está en una cantidad suficiente para retardar el inicio de la proteinuria y el deterioro de la función renal.

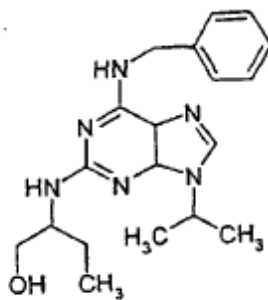
5. Uso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el inhibidor de CDK2 y/o CDK7 y/o CDK9 está en una cantidad suficiente para reducir los cambios glomerulares y tubointersticiales.

25

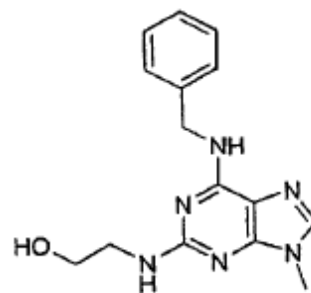
6. Una combinación que comprende un inhibidor purínico de CDK2 y/o CDK7 y/o CDK9 seleccionado de:



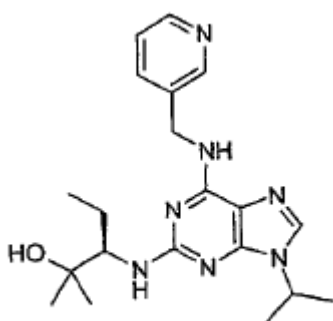
[1]



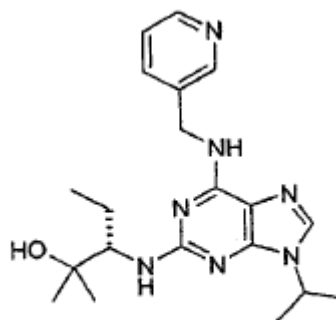
[2]



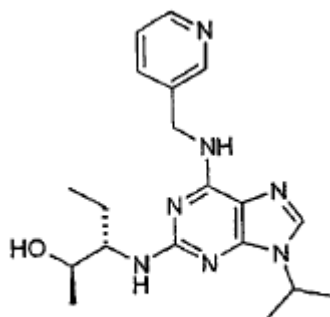
[3]



[5]

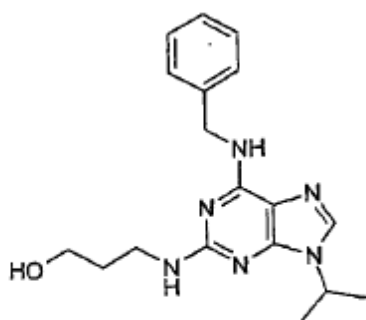


[6]

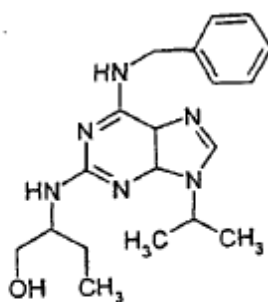


[8]

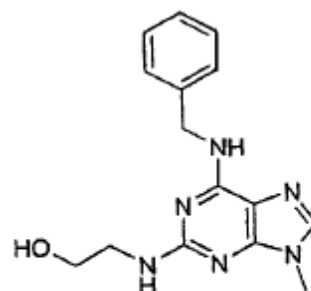
- 5 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y metilprednisolona.
7. Una composición farmacéutica que comprende una combinación según la reivindicación 6 y un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.
- 10 8. Un producto farmacéutico que comprende un inhibidor purínico de CDK2 y/o CDK7 y/o CDK9 seleccionado de



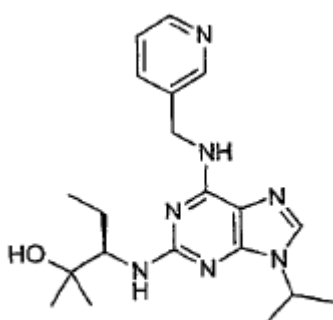
[1]



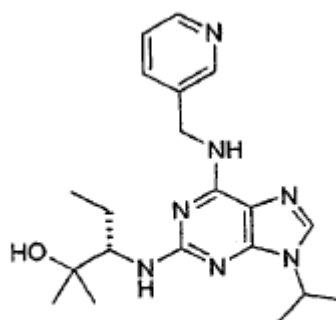
[2]



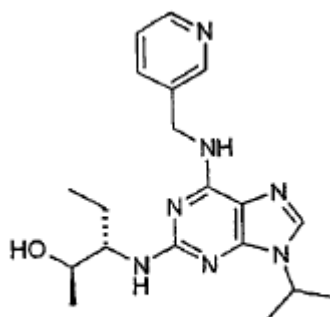
[3]



[5]



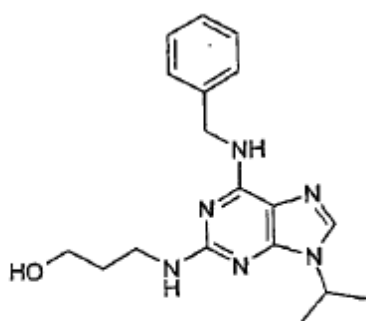
[6]



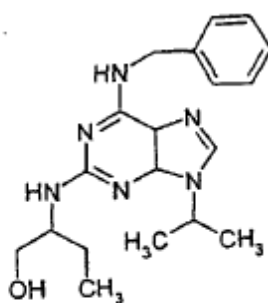
[8]

- 5 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y metilprednisolona como preparación combinada para uso simultáneo, secuencial o separado en terapia.
9. Un producto farmacéutico según la reivindicación 8, en el que el inhibidor purínico de CDK2 y/o CDK7 y/o CDK9, o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y metilprednisolona se administran simultáneamente.
- 10 10. Un producto farmacéutico según la reivindicación 8 o la reivindicación 9, que comprende adicionalmente un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.
11. Un producto farmacéutico según una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, para uso en el tratamiento de enfermedad reumática autoinmunitaria o autoinmunidad específica de órgano.
- 15 12. Un producto farmacéutico según la reivindicación 11, en el que la enfermedad reumática autoinmunitaria se selecciona de lupus inducido por fármacos o lupus sistémico eritematoso (LSE).
- 20 13. Un producto farmacéutico según la reivindicación 12, en el que la enfermedad reumática autoinmunitaria es lupus sistémico eritematoso (LSE).
14. Una composición farmacéutica que comprende:

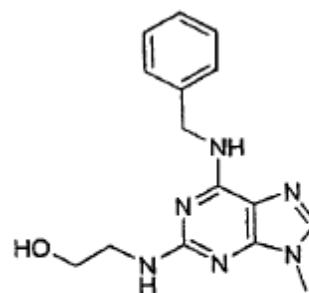
(i) un inhibidor purínico de CDK2 y/o CDK7 y/o CDK9 seleccionado de



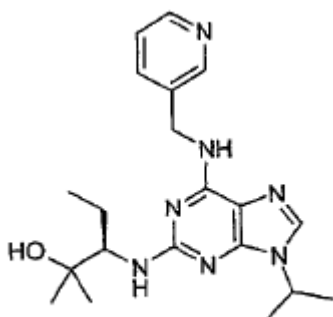
[1]



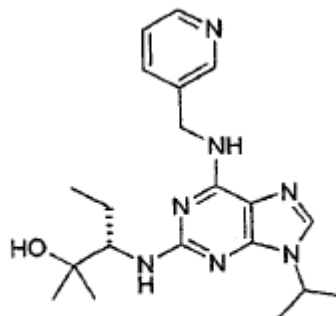
[2]



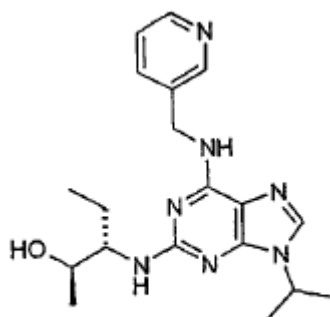
[3]



[5]



[6]



[8]

5 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; y

(ii) metilprednisolona;

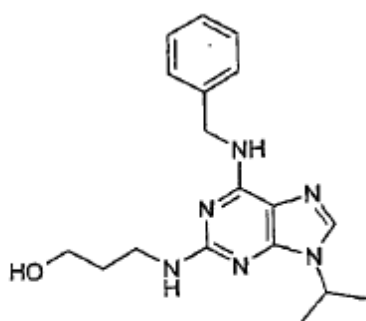
mezclados con un diluyente, excipiente o vehículo farmacéuticamente aceptable.

10 15. Una composición farmacéutica según la reivindicación 7 o 14, o un producto farmacéutico según una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 13, en los que el inhibidor purínico de CDK2 y/o CDK7 y/o CDK9 se selecciona de roscovitina y olomoucina y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.

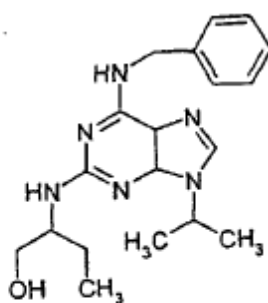
15 16. Una composición farmacéutica según la reivindicación 7 o 14, o un producto farmacéutico según una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 13, en los que el inhibidor purínico de CDK2 y/o CDK7 y/o CDK9 es roscovitina o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

20 17. Uso de una combinación según la reivindicación 6 en la preparación de un medicamento para tratar lupus inducido por fármacos o lupus sistémico eritematoso (LSE).

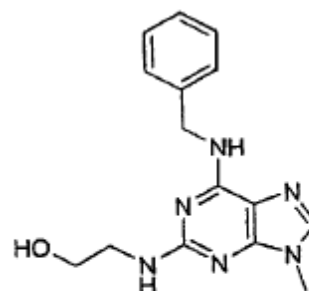
18. Uso de un inhibidor purínico de CDK2 y/o CDK7 y/o CDK9 seleccionado de



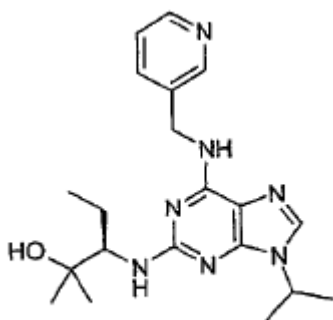
[1]



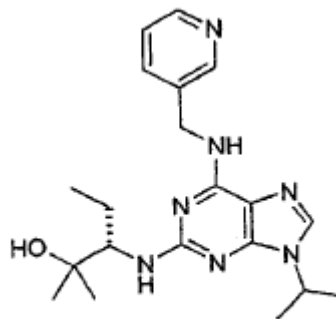
[2]



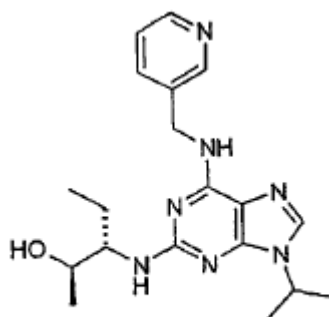
[3]



[5]



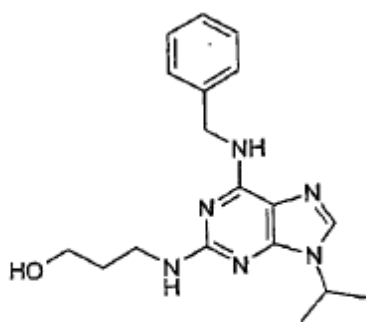
[6]



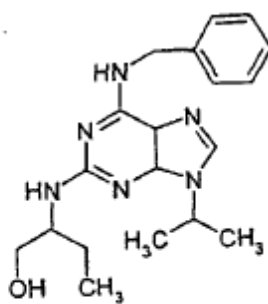
[8]

5 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en la preparación de un medicamento para tratar lupus inducido por fármacos o lupus sistémico eritematoso (LSE), en el que el medicamento es para uso en combinación con metilprednisolona.

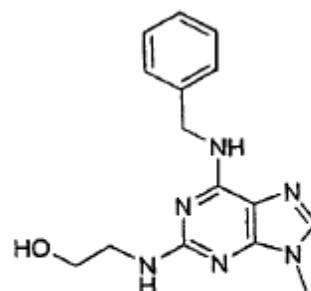
10 19. Uso de metilprednisolona en la preparación de un medicamento para tratar lupus inducido por fármacos o lupus sistémico eritematoso (LSE), en el que el medicamento es para uso en combinación con un inhibidor purínico de CDK2 y/o CDK7 y/o CDK9 seleccionado de



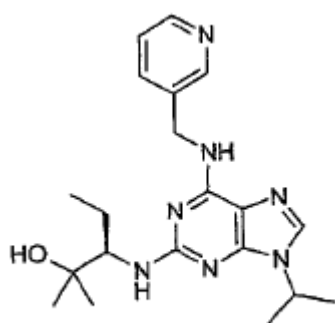
[1]



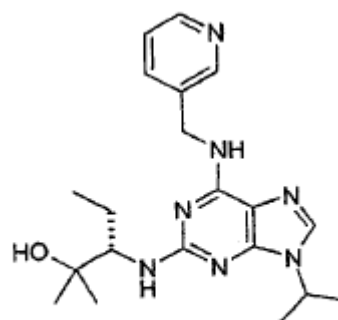
[2]



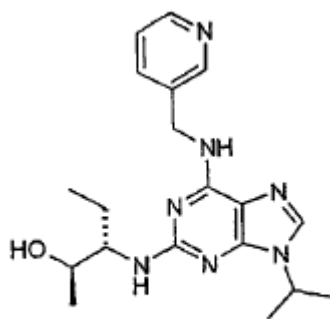
[3]



[5]



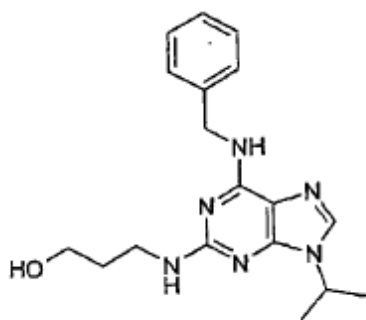
[6]



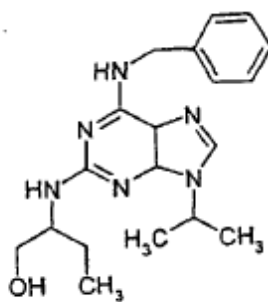
[8]

5 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

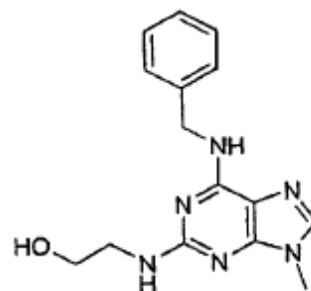
20. Uso de un inhibidor purínico de CDK2 y/o CDK7 y/o CDK9 seleccionado de



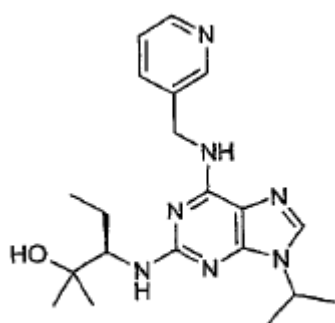
[1]



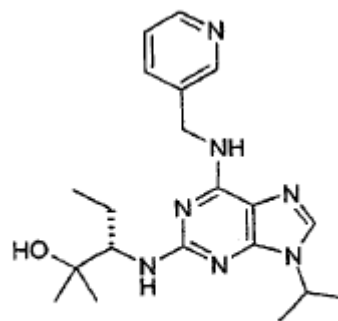
[2]



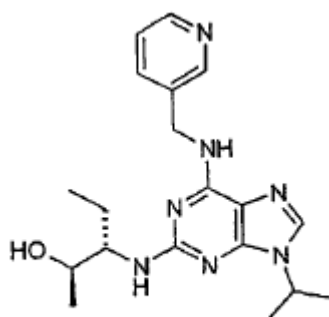
[3]



[5]



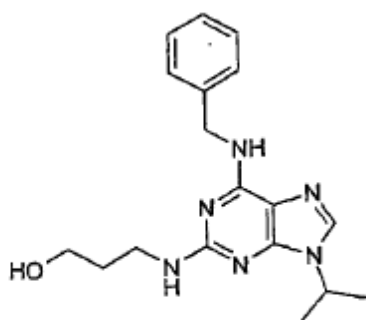
[6]



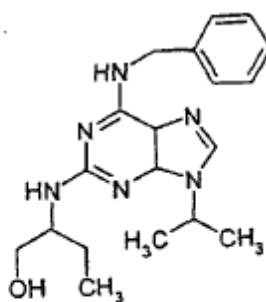
[8]

5 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; y metilprednisolona, en la preparación de un medicamento para tratar lupus inducido por fármacos o lupus sistémico eritematoso (LSE).

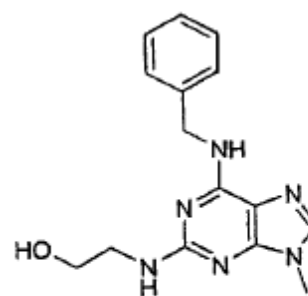
21. Uso de un inhibidor purínico de CDK2 y/o CDK7 y/o CDK9 seleccionado de:



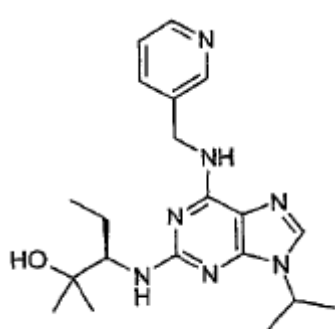
[1]



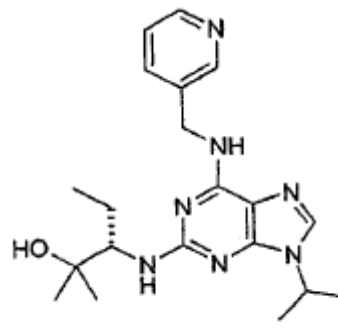
[2]



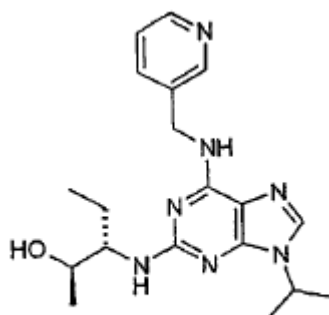
[3]



[5]



[6]



[8]

5 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en la preparación de un medicamento para el tratamiento de
lupus inducido por fármacos o lupus sistémico eritematoso (LSE), en el que dicho tratamiento comprende administrar
a un sujeto simultánea, secuencial o separadamente el inhibidor purínico de CDK2 y/o CDK7 y/o CDK9, o una sal
farmacéuticamente aceptable del mismo, y metilprednisolona.

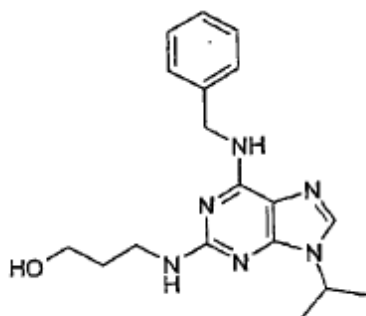
10 22. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 17 a 21 en el que la enfermedad reumática autoinmunitaria es
lupus sistémico eritematoso (LSE).

23. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 o 17 a 22, en el que el inhibidor purínico de CDK2 y/o
CDK7 y/o CDK9 se selecciona de roscovitina y olomoucina.

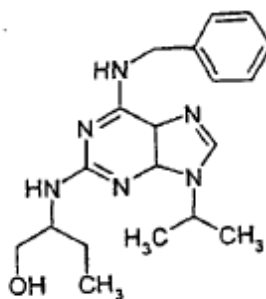
15 24. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13 o 17 a 22, en el que el inhibidor purínico de CDK2 y/o
CDK7 y/o CDK9 es roscovitina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma.

25. Un inhibidor purínico de CDK2 y/o CDK7 y/o CDK9 seleccionado de

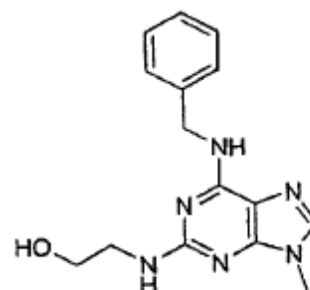
20



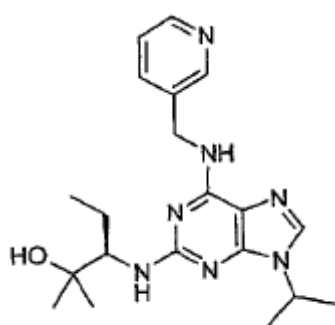
[1]



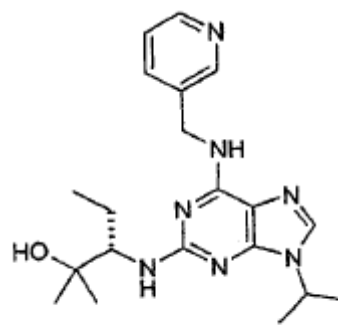
[2]



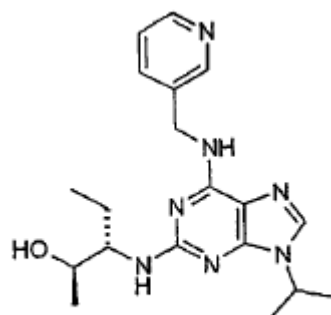
[3]



[5]



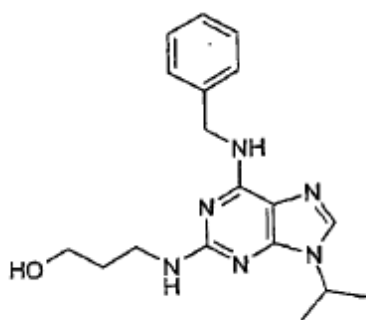
[6]



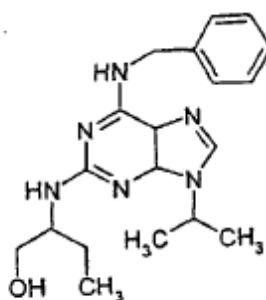
[8]

5 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para uso en el tratamiento de lupus inducido por fármacos o lupus sistémico eritematoso.

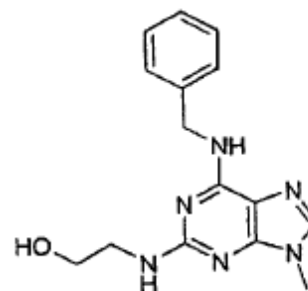
26. Un inhibidor purínico de CDK2 y/o CDK7 y/o CDK9 seleccionado de



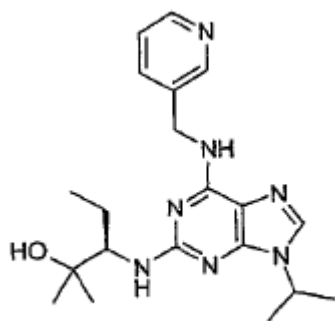
[1]



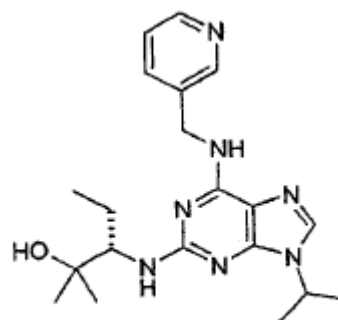
[2]



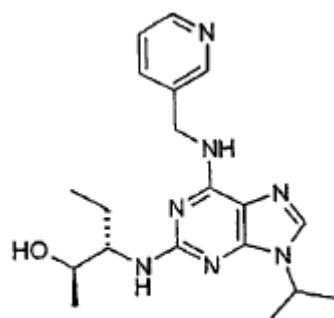
[3]



[5]



[6]



[8]

- 5 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y metilprednisolona, para uso en el tratamiento de lupus inducido por fármacos o lupus sistémico eritematoso.

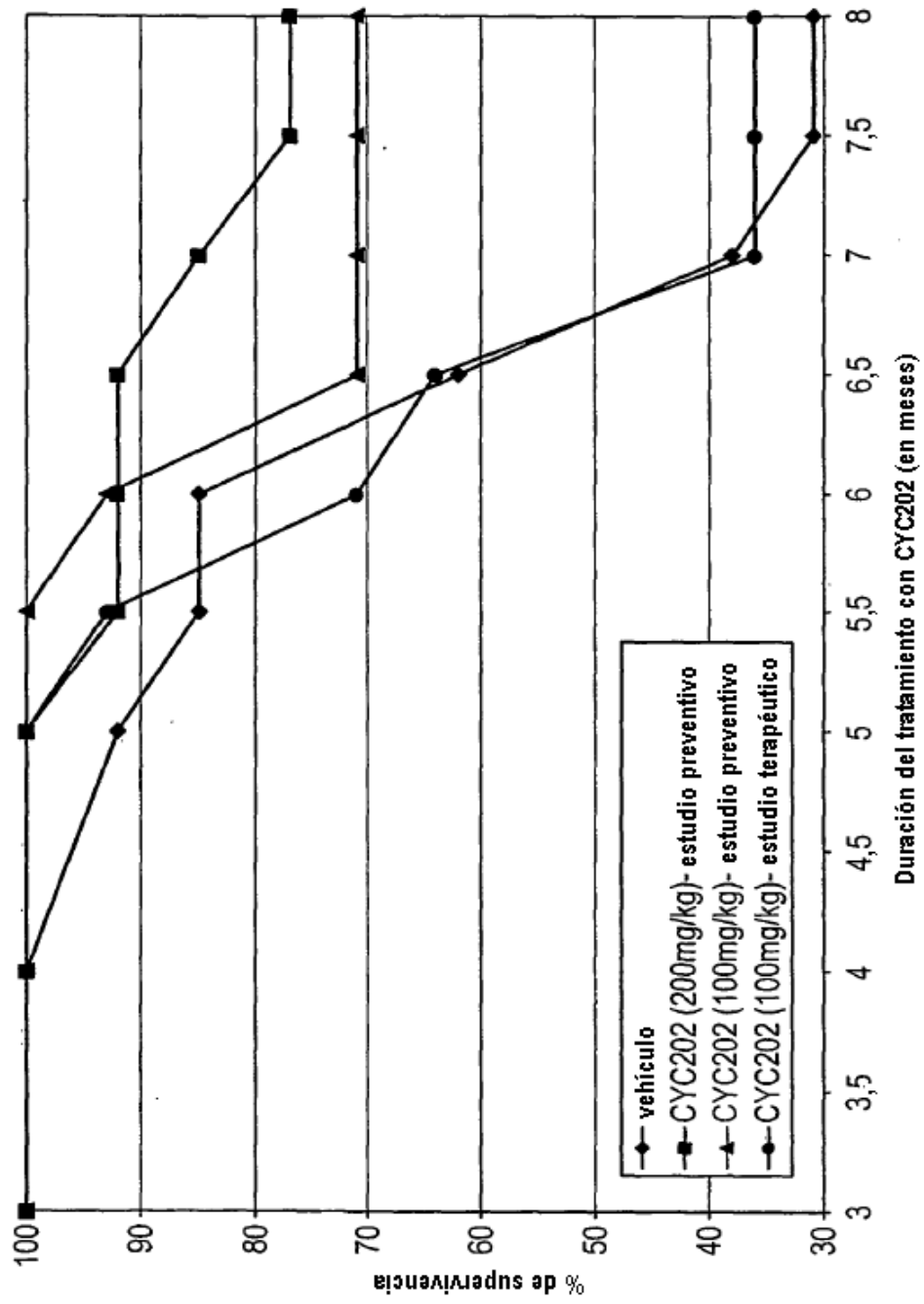


FIG. 1

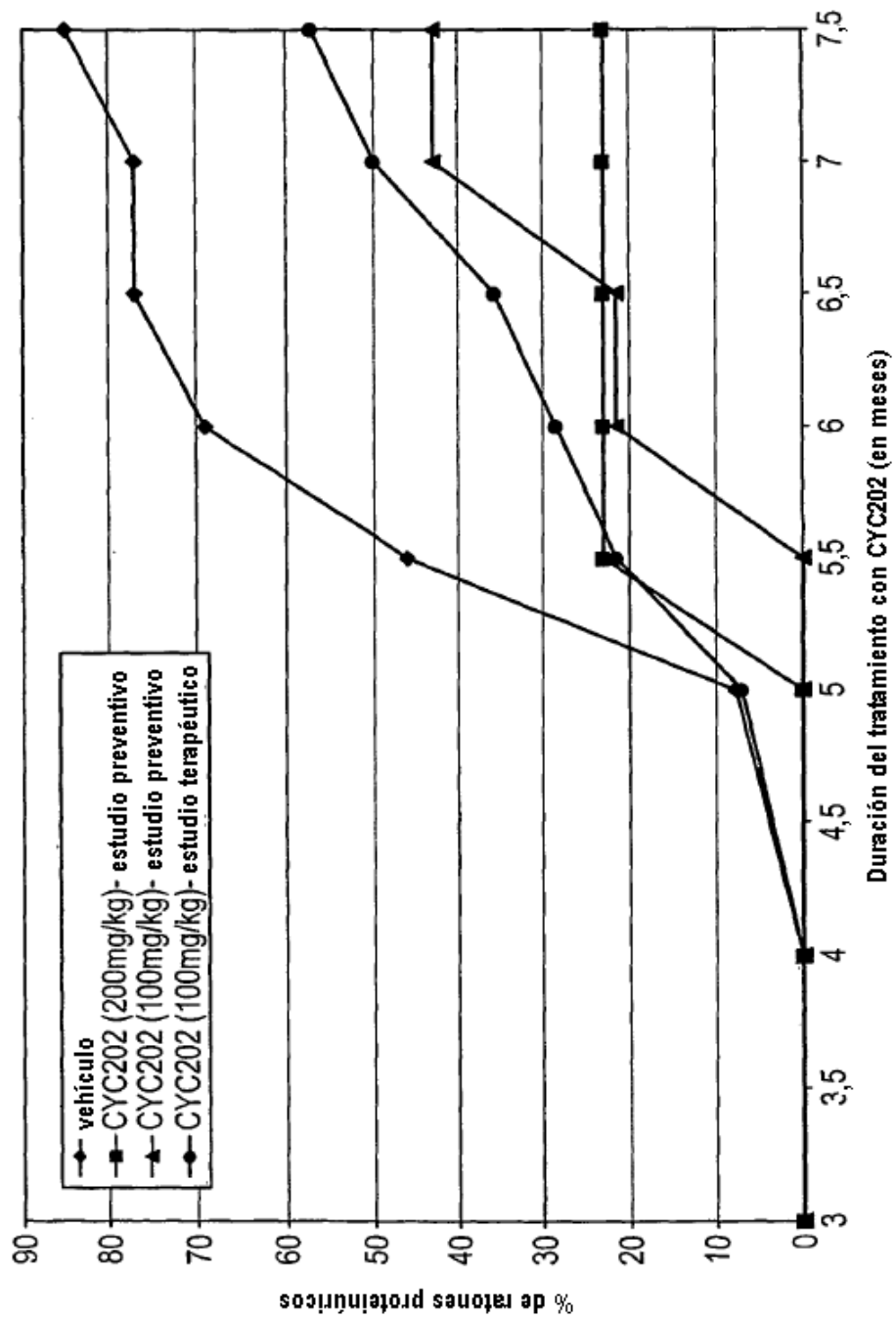


FIG. 2

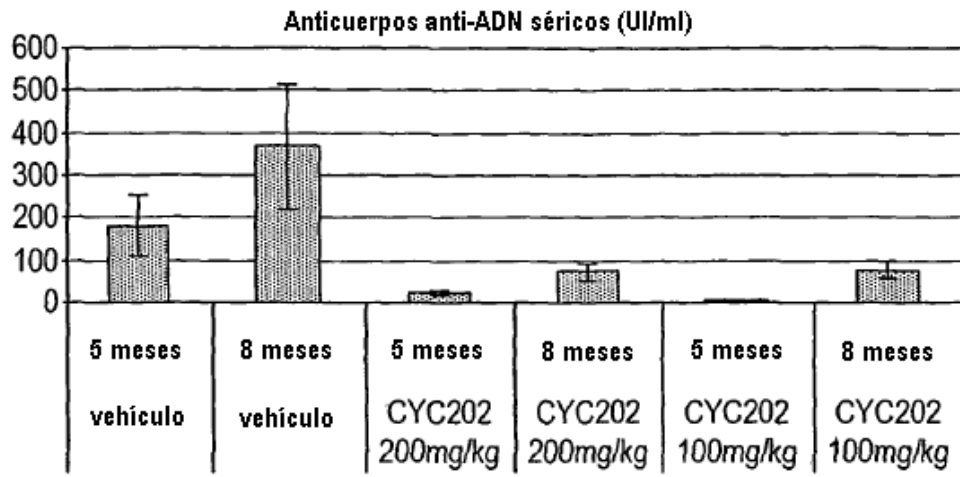


FIG. 3

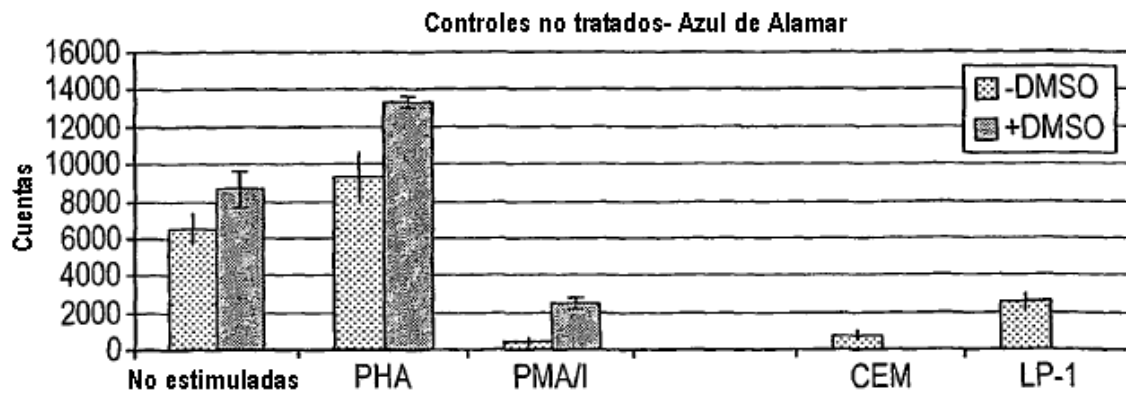
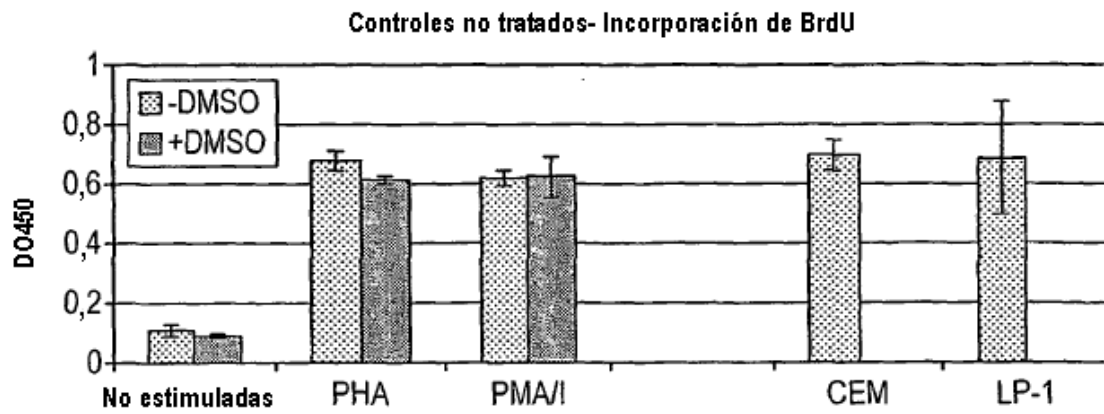
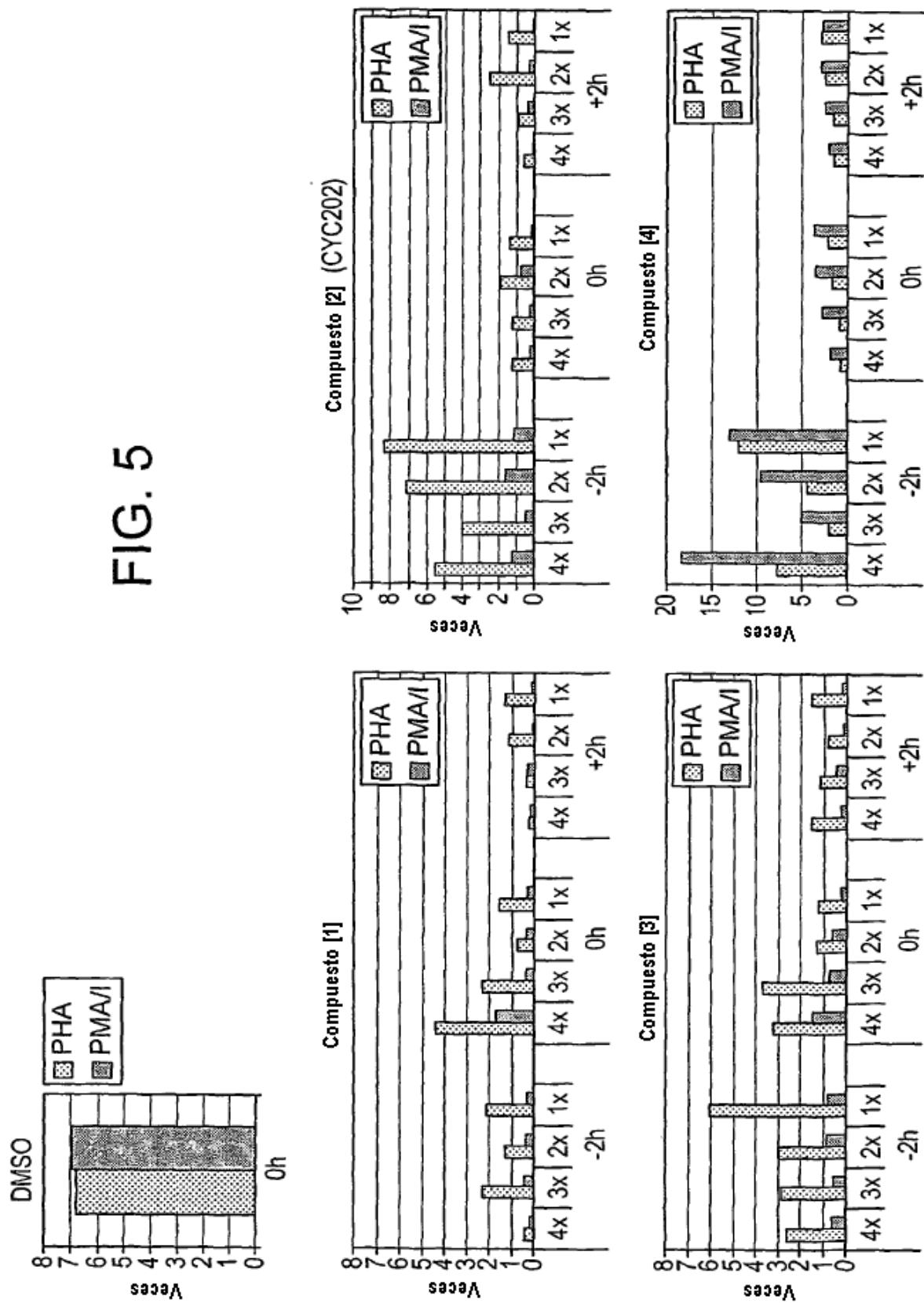


FIG. 4



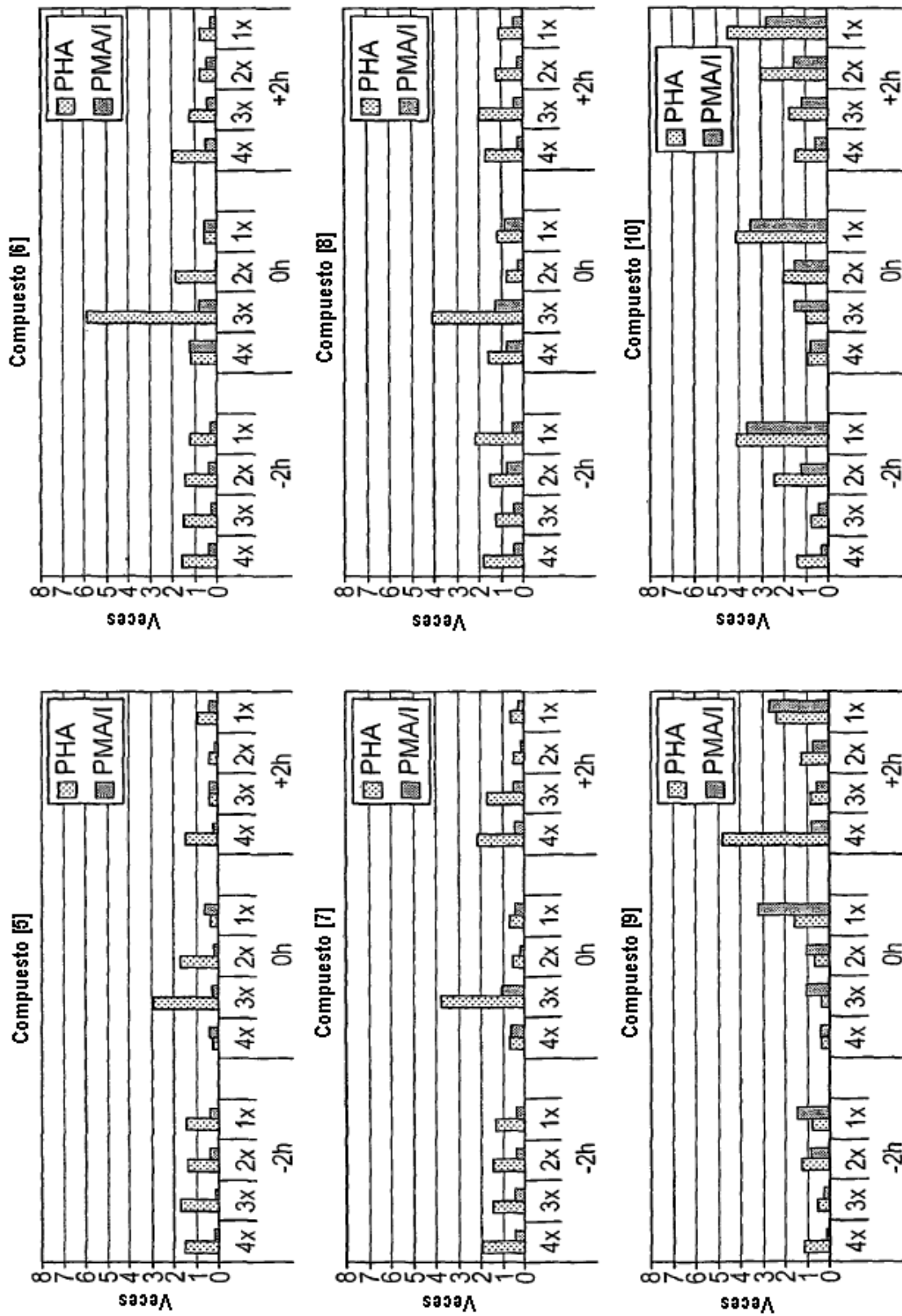
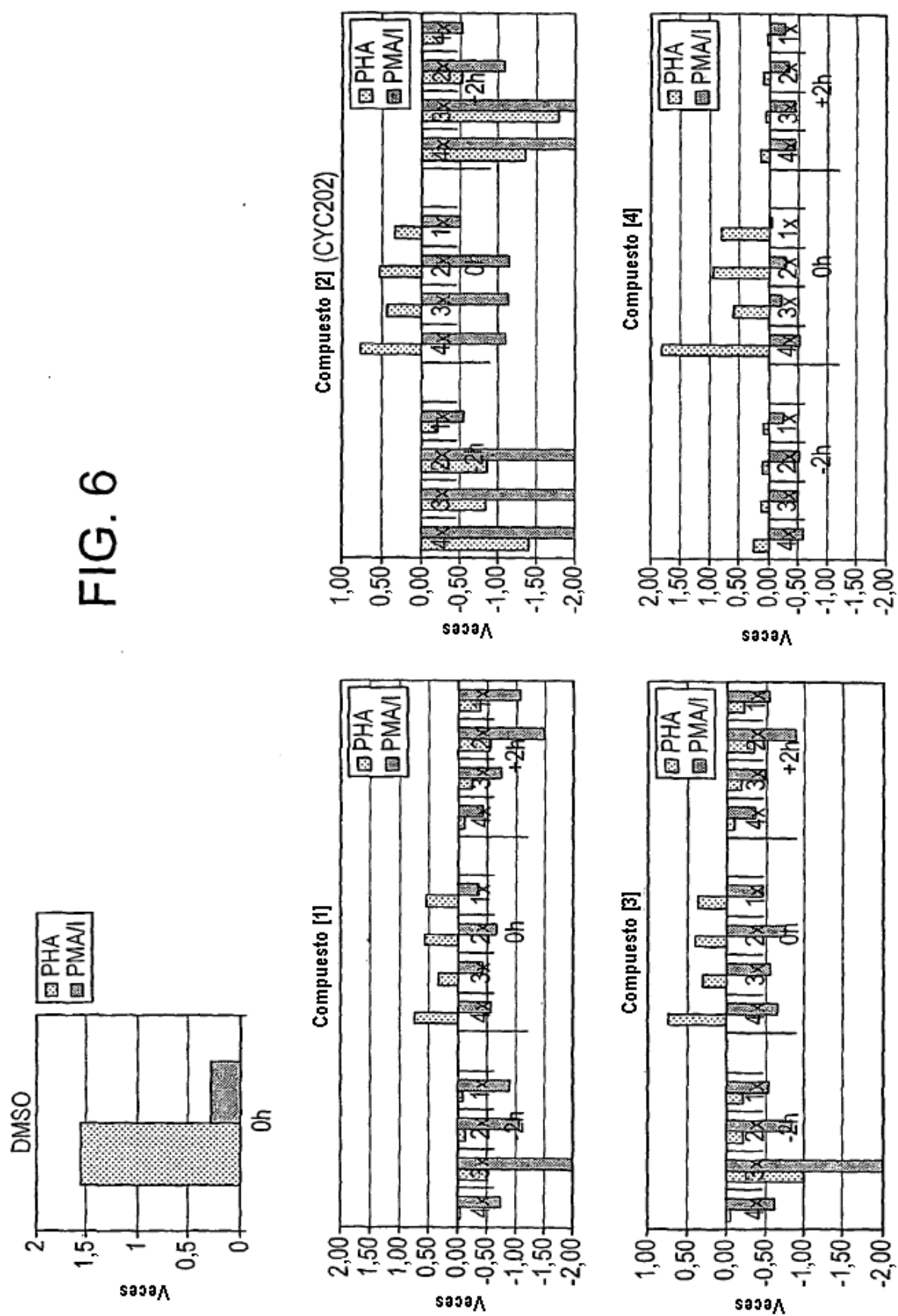


FIG. 5 CONT

FIG. 6



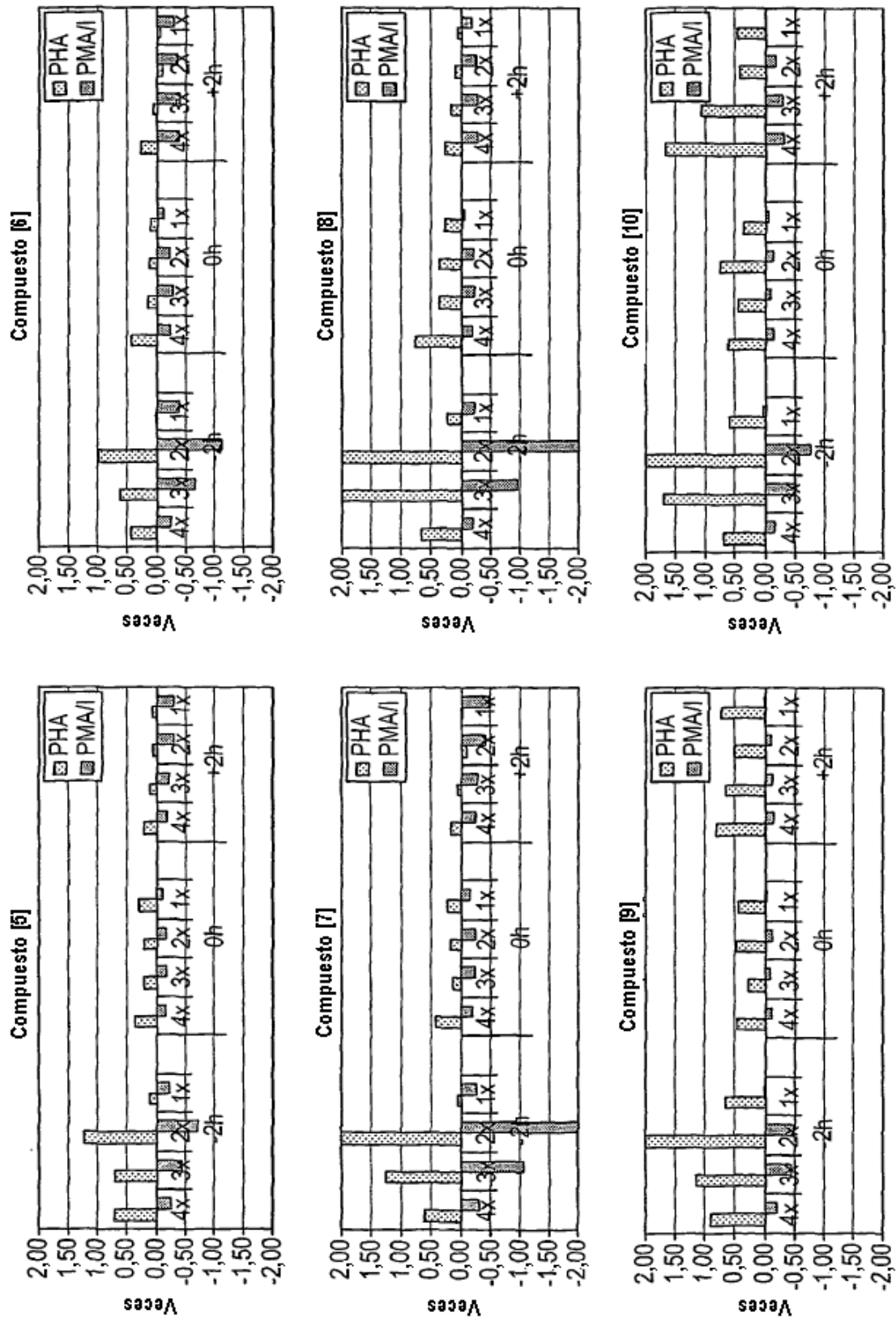


FIG. 6 CONT

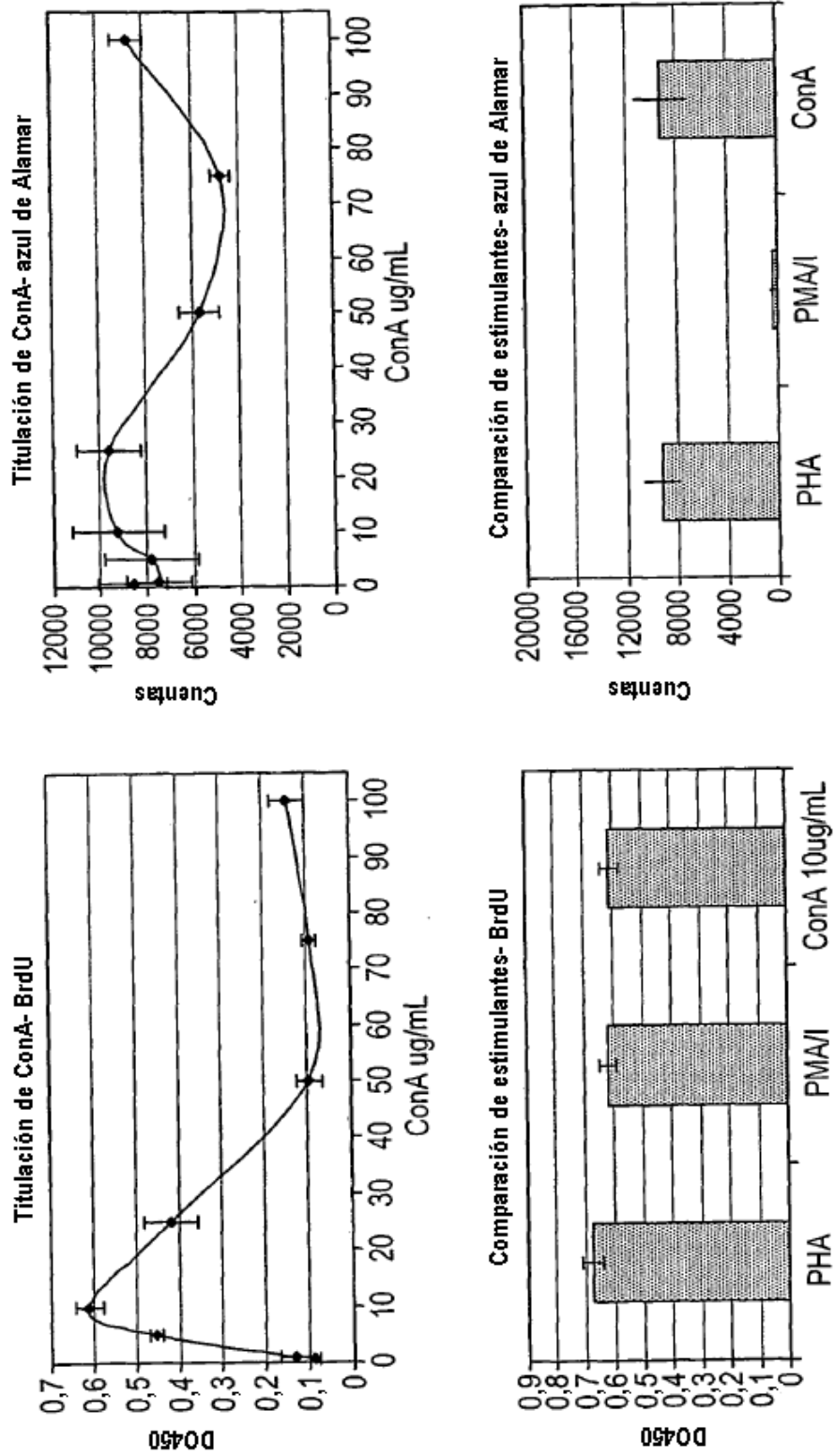


FIG. 7

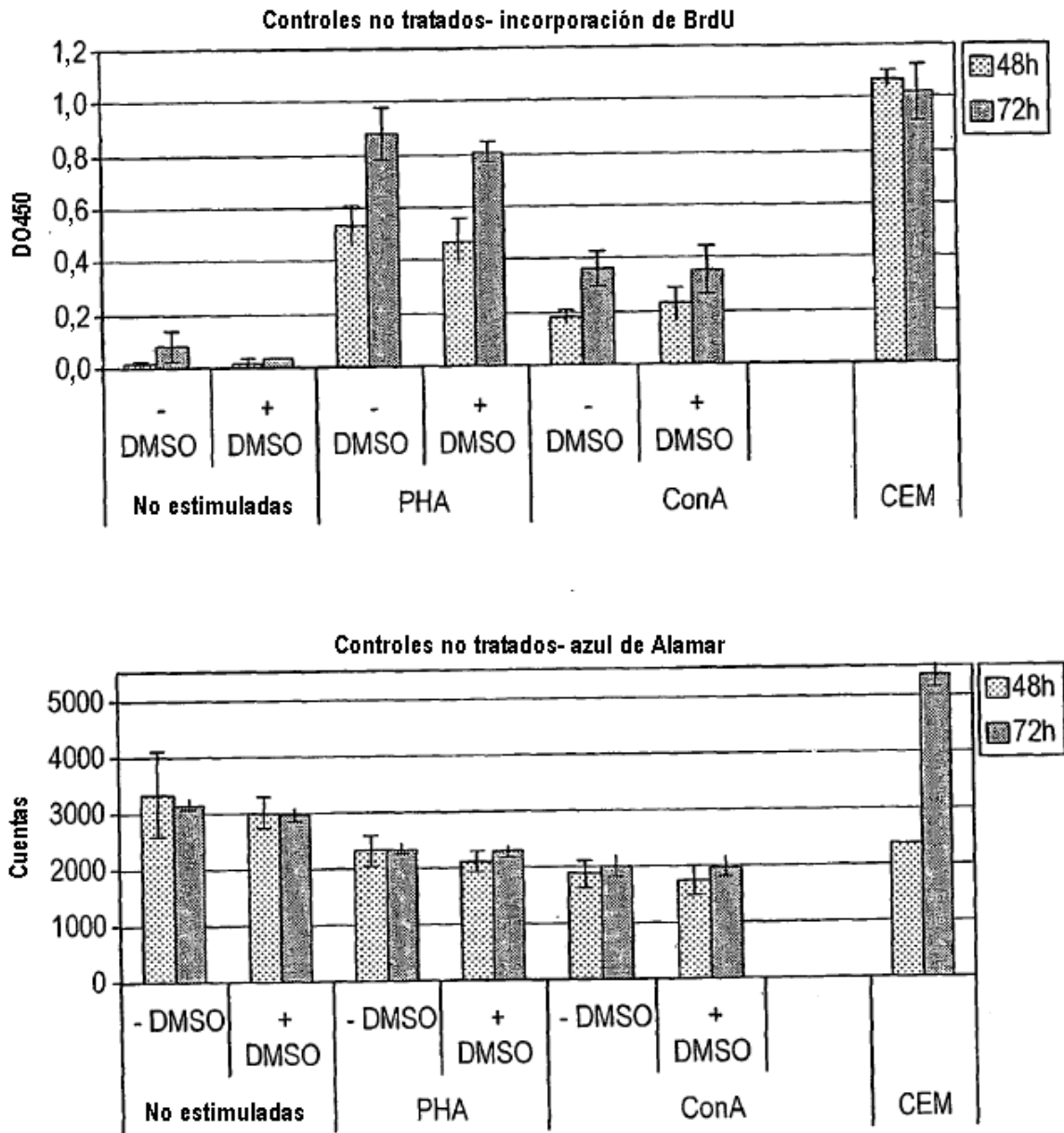


FIG. 8

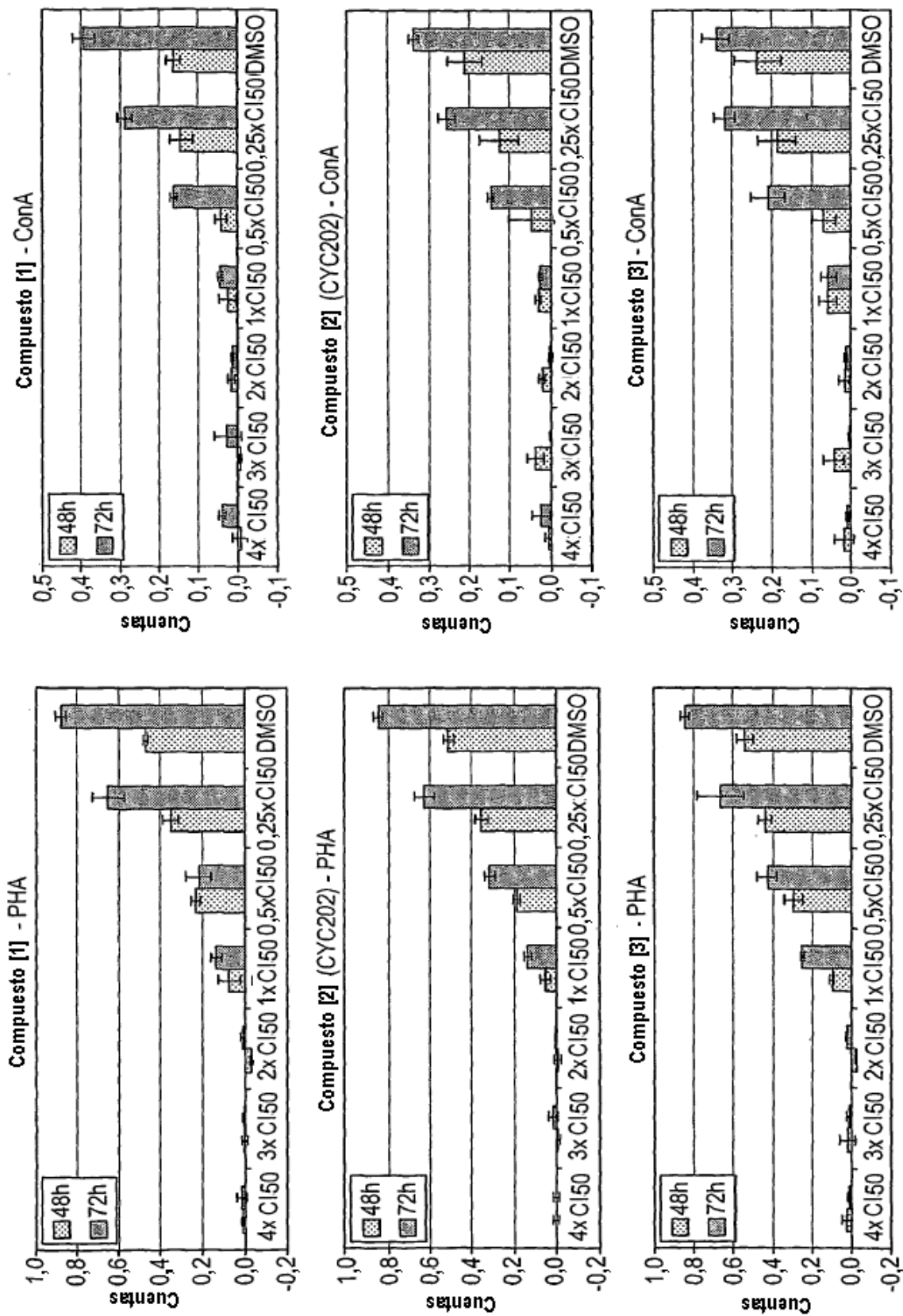


FIG. 9

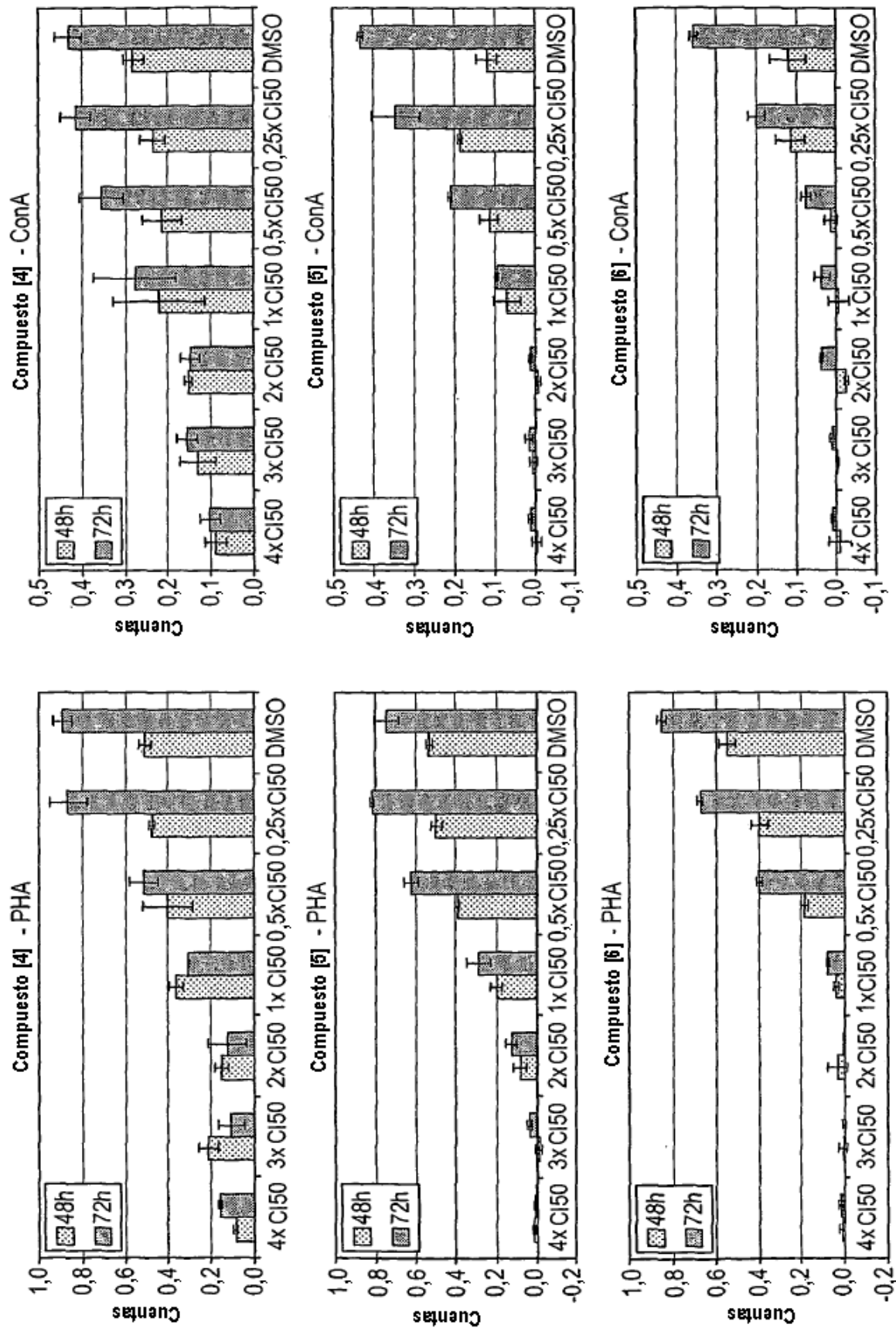


FIG. 9 CONT

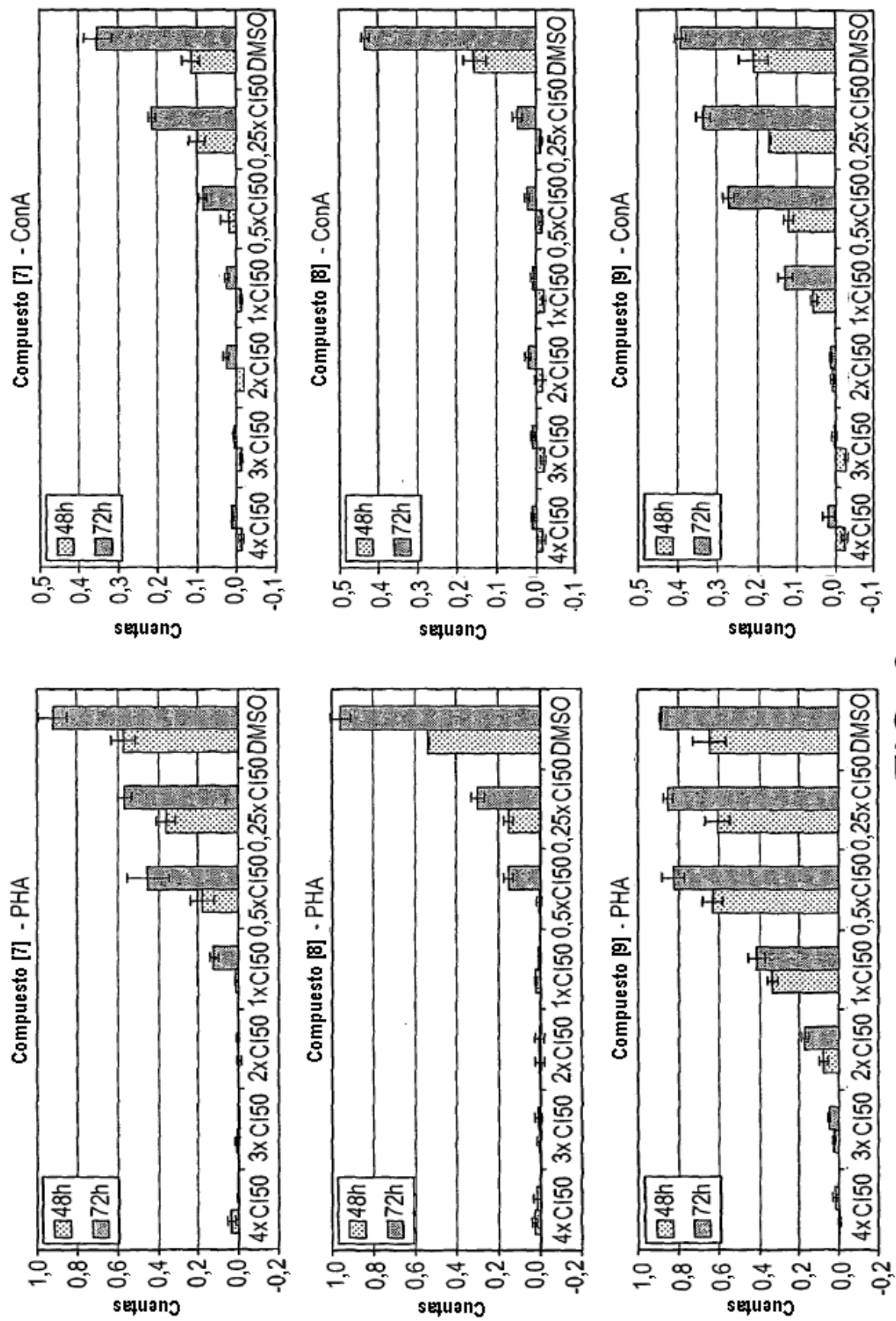


FIG. 9 CONT

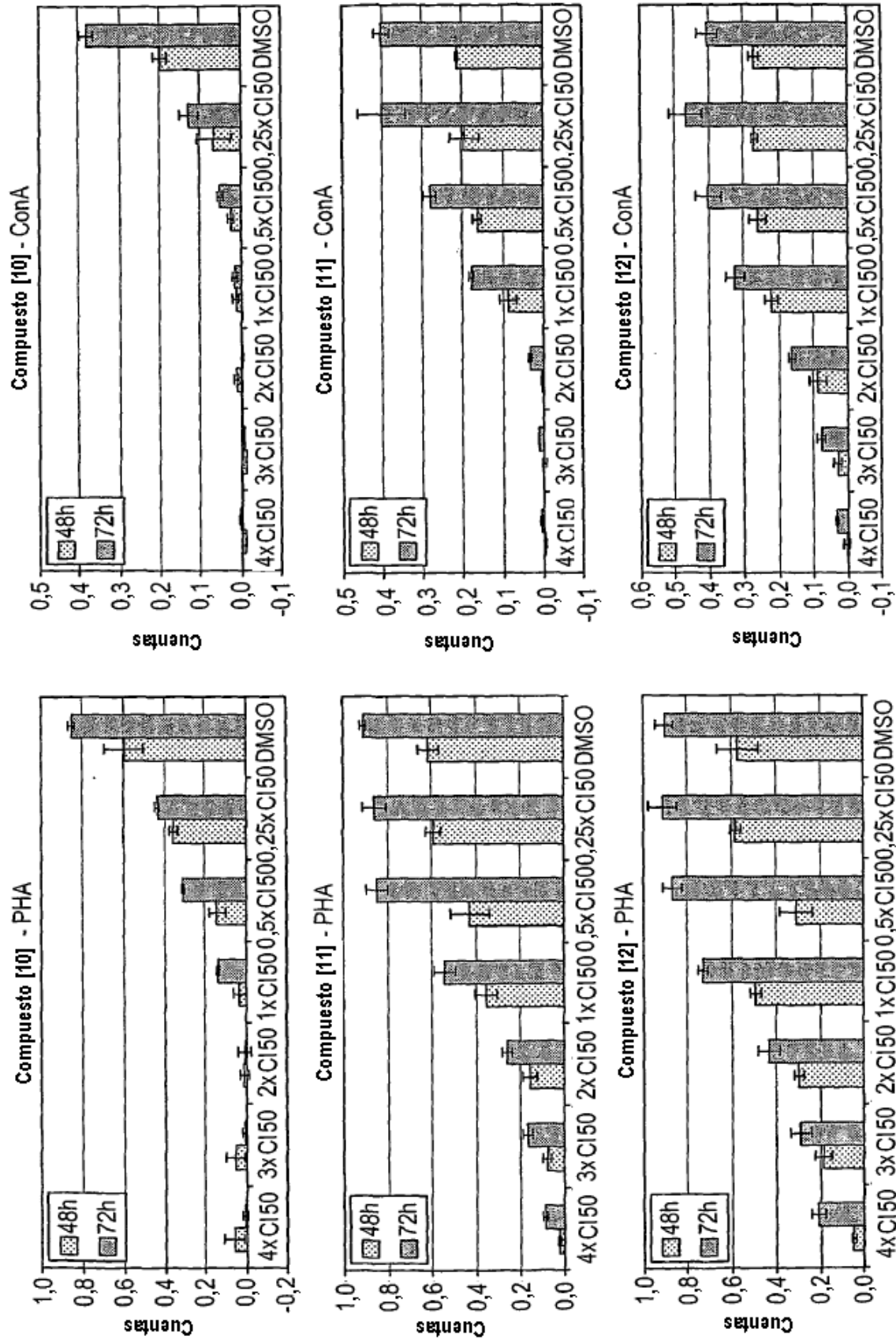


FIG. 9 CONT

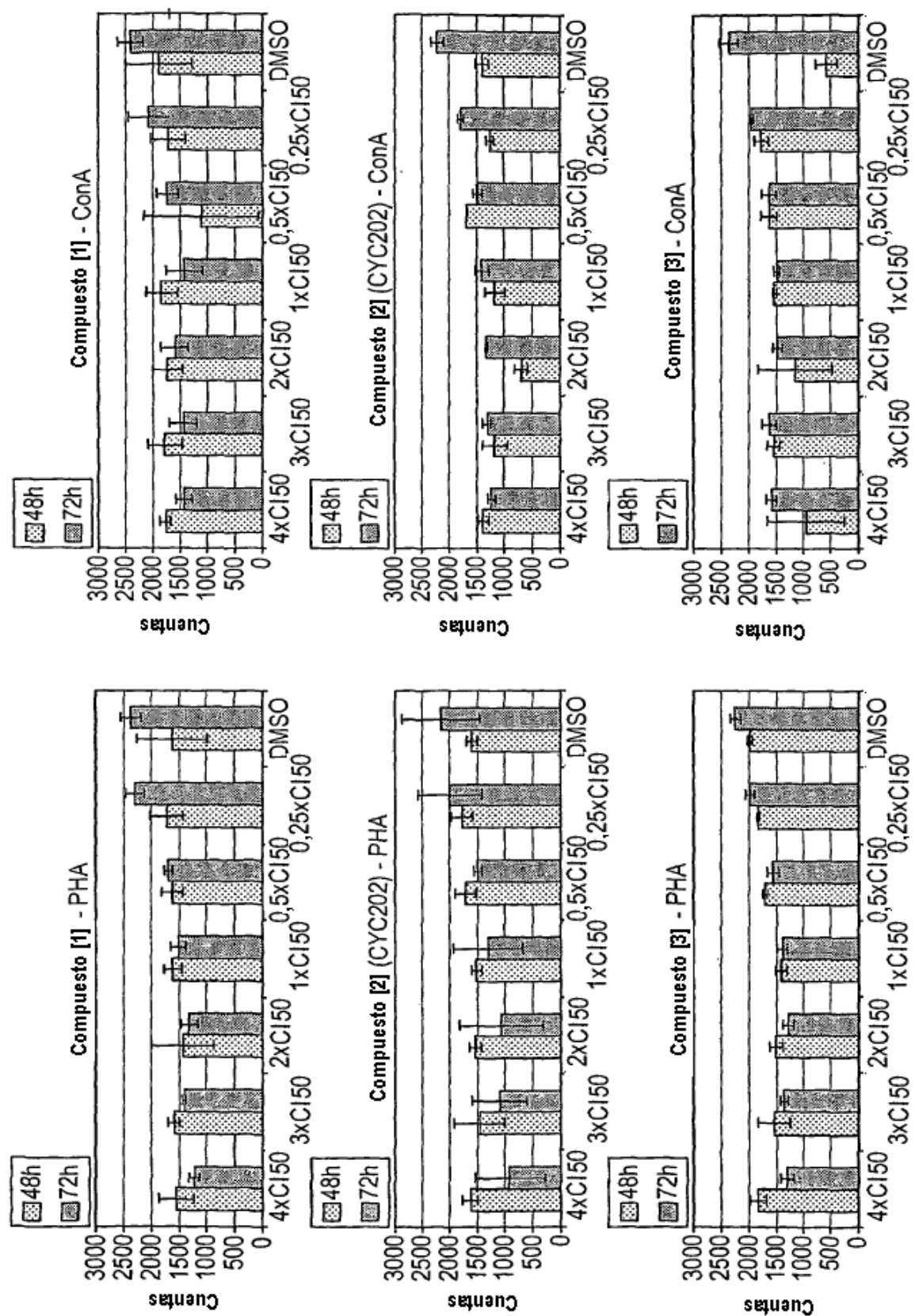


FIG. 10

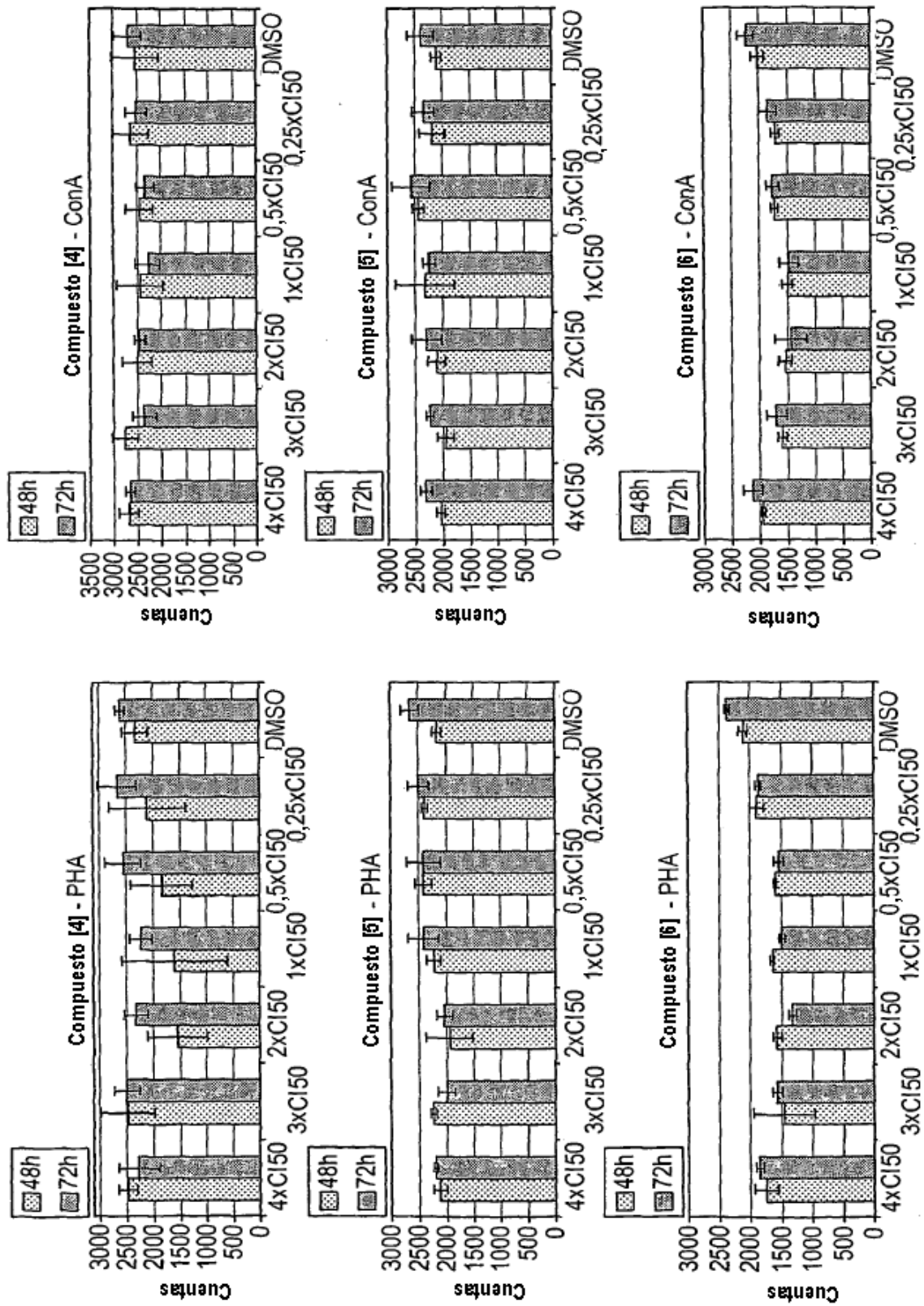


FIG. 10 CONT

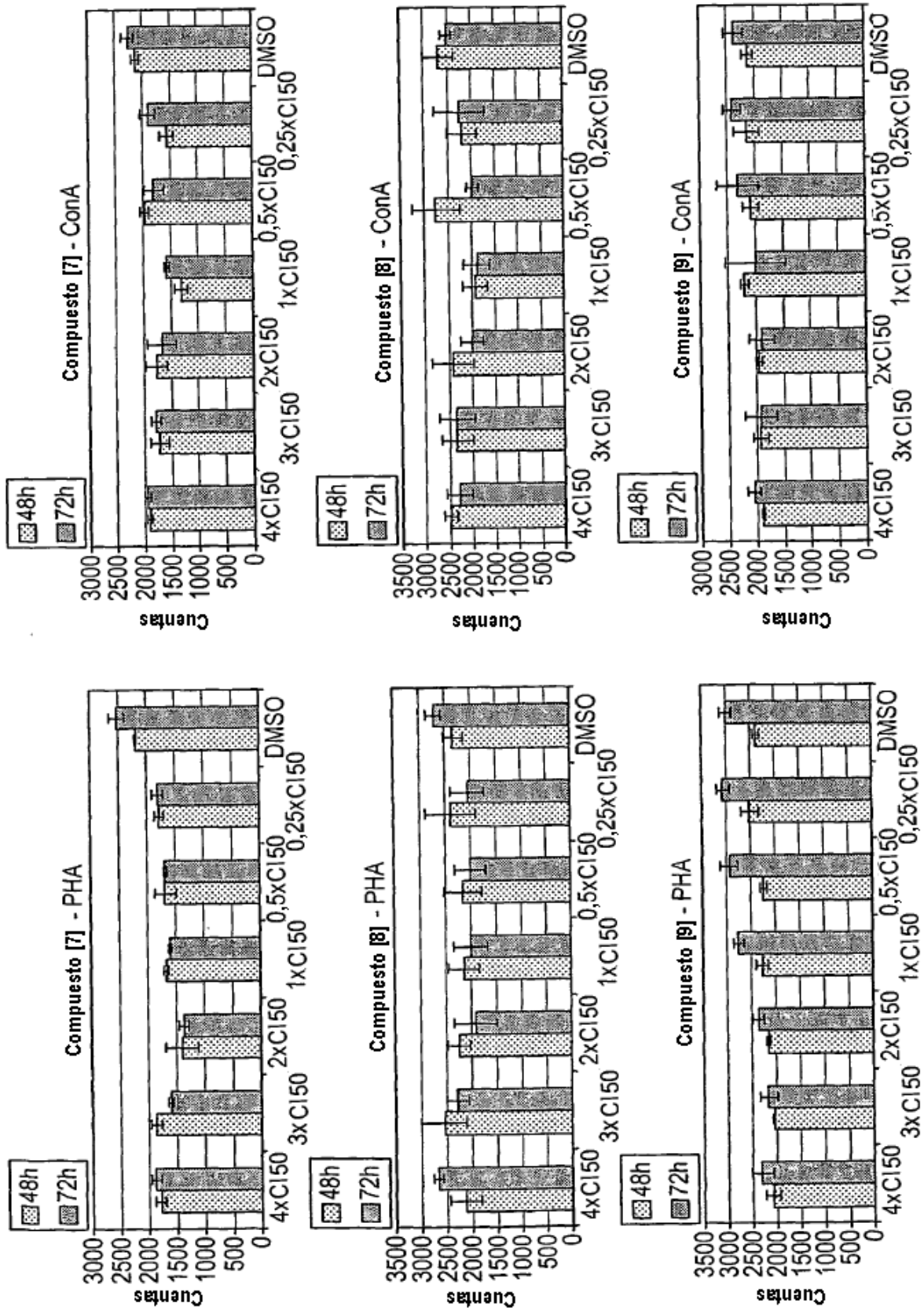


FIG. 10 CONT

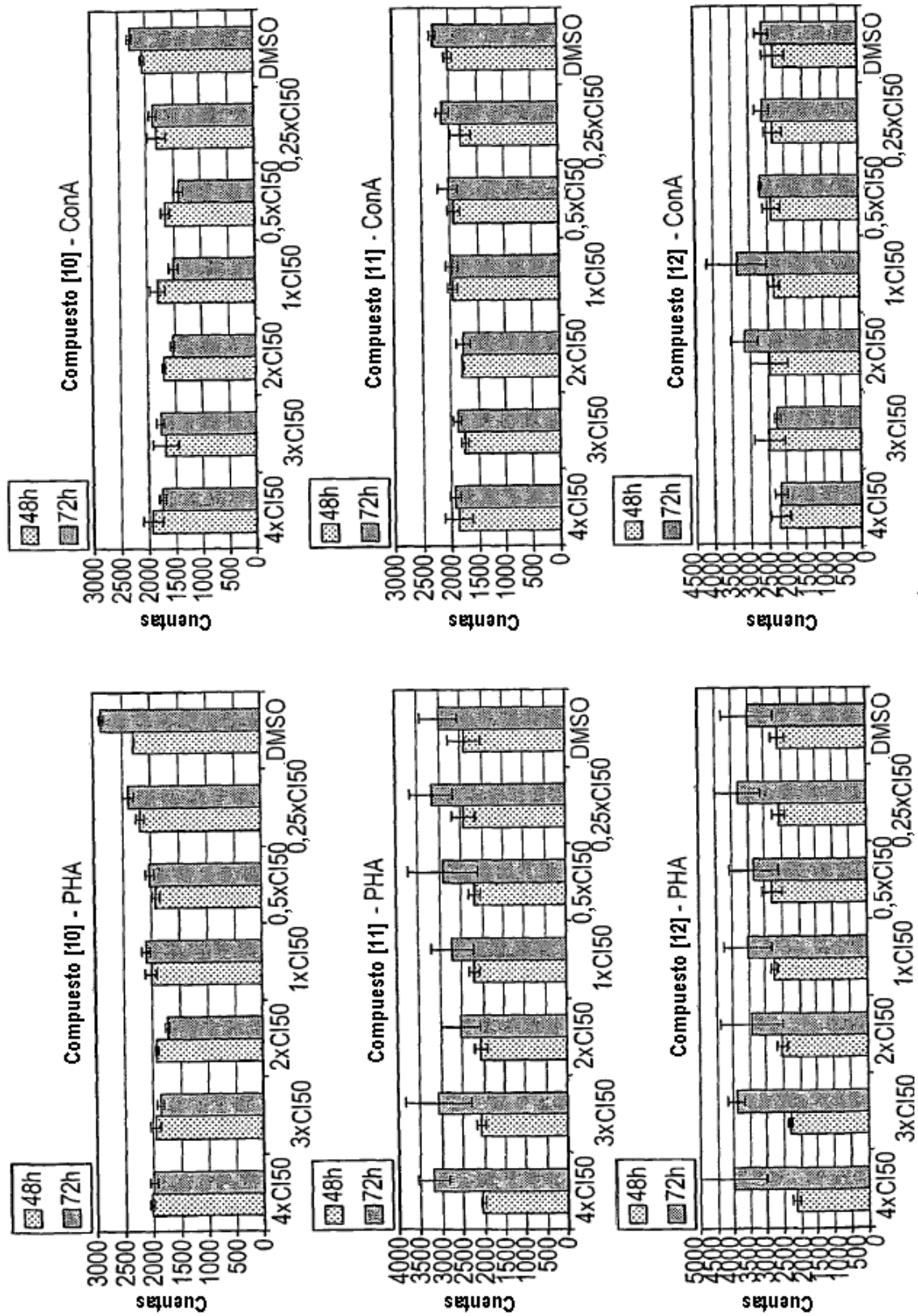


FIG. 10 CONT