

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 582 465**

51 Int. Cl.:

**A61K 31/496** (2006.01)

**A61P 37/00** (2006.01)

**A61P 43/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.12.2011 E 11846725 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.04.2016 EP 2648728**

54 Título: **Inhibidor Quinasa Janus 2 (JAK2) para el tratamiento del lupus**

30 Prioridad:

**06.12.2010 US 420053 P**

**08.12.2010 US 420967 P**

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

**13.09.2016**

73 Titular/es:

**CEPHALON, INC. (100.0%)  
41 Moores Road P.O. Box 4011  
Frazer, PA 19355, US**

72 Inventor/es:

**DOBRZANSKI, PAWEL T. y  
SEAVEY, MATTHEW M.**

74 Agente/Representante:

**IZQUIERDO BLANCO, María Alicia**

**ES 2 582 465 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).

**Inhibidor Quinasa Janus 2 (JAK2) para el tratamiento del lupus****Descripción****5 CAMPO TECNICO**

La terapia del lupus.

**10 ANTECEDENTES**

10 El lupus (lupus eritematoso sistémico, LES) es una enfermedad crónica autoinmune que se caracteriza por la presencia de las células activadas T y B, autoanticuerpos y la inflamación crónica que ataca a varias partes del cuerpo, incluyendo la articulaciones, piel, riñones, sistema nervioso central, el tejido cardíaco y los vasos sanguíneos. En los casos graves, los anticuerpos se depositan en las células (glomérulos) de los riñones, lo que  
15 puede llevar a una inflamación y un posible fallo del riñón, conocido como la nefritis lúpica.

Aunque la causa de lupus sigue siendo desconocida, se han relacionado manifestaciones de la enfermedad con polimorfismos genéticos, toxinas y patógenos ambientales ( Morel Fairhurst, Wandstrat et al 2006.). Además, el género, las influencias hormonales y disregulación de citoquinas han sido estrechamente relacionado con el desarrollo de lupus (Aringer y Smolen 2004; Smith- Bouvier, Divekar et al 2008.). El lupus afecta nueve veces más a las mujeres que a los hombres. Puede ocurrir a cualquier edad, pero aparece con mayor frecuencia en personas entre edades de 10 y 50 años. Los afroamericanos y los asiáticos se ven afectados con mayor frecuencia que personas de otras razas.

25 No hay cura para el lupus. Los tratamientos actuales para el lupus están dirigidos para controlar los síntomas y se limitan a agentes tóxicos e inmunosupresores con graves efectos secundarios tales como glucocorticoides de dosis altas y / o hydroxchloro-quine. Una enfermedad grave (por ejemplo, los pacientes que tienen síntomas de afectación renal) requiere medicamentos más agresivos, incluyendo el micofenolato mofetil (MMF), azatioprina (AZA) y/o ciclofosfamida (CTX) (Bertsias y Boumpas 2008). El CTX, AZA y MMF son muy tóxicos e inmunosupresores, y sólo el 50 % de los pacientes tratados entran en remisión completa, con unas tasas de recaída de hasta un 30 % en un período de 2 años.

35 Las células de memoria B, y mas importante, células plasmáticas de larga vida (LL-PCs) las cuales se diferencian de las células B, son tipos de células claves implicadas en el lupus (Neubert, Meister et al. 2008; Sanz y Lee 2010). Las células plasmáticas de larga vida sintetizan y ocultan grandes cantidades de isotipo de alta afinidad cambiando anticuerpos (Meister, Schubert et al. 2007; Muller, Dieker et al. 2008). Los anticuerpos antinucleares circulantes (ANAs) aumentan las posibilidades de que los anticuerpos se depositen sobre los propios tejidos, formando complejos inmunes y con el tiempo conduce a la destrucción del tejido, la difusión del epítipo y la participación de otros sistemas de órganos. Las LL-PCs comúnmente basadas en ser quimio- y radio- resistentes , sobreexpresando diversas proteínas de choque térmico y las bombas de infusión (Obeng, Carlson et al. 2006; Neubert, Meister et al. 2008). Además, las LL -PCs residen principalmente en la médula ósea, donde están protegidas de las terapias de lupus actuales, tales como ciclofosfamida y glucocorticoides.

45 Existe una necesidad de nuevos tratamientos para el lupus, incluyendo el lupus nefritis. En particular existe una necesidad para los tratamientos de lupus que puedan dirigirse y reducir las LL -PCs.

WO2009 / 155551 A1 describe compuestos de triazolopiridina como inhibidores de la quinasa JAK, útiles en métodos para tratar o disminuir la gravedad de una enfermedad o afección sensible a la inhibición de la actividad de la quinasa JAK.

**50 RESUMEN**

El COMPUESTO A es proporcionado para usar en métodos en el tratamiento del lupus. En una realización, el sujeto es un humano. En una realización, el COMPUESTO A se administra por vía oral. En una realización, el COMPUESTO A se administra una vez al día. En una realización, el COMPUESTO A se administra dos veces al día. En una realización, el COMPUESTO A se administra como un profármaco.

60 En una realización, el COMPUESTO A se administra a una dosis en un intervalo de aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 100 mg/kg. En una realización, el COMPUESTO A se administra en una dosis de aproximadamente 50 mg/kg a aproximadamente 100 mg/kg. En una realización, el COMPUESTO A se administra en una dosis de aproximadamente 50 mg/kg. En una realización, el COMPUESTO A se administra a una dosis de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 1 g. En una realización, el COMPUESTO A se administra a una dosis de aproximadamente 5 mg a aproximadamente 100 mg. En una realización, el COMPUESTO A se administra a una dosis de aproximadamente 5 mg a aproximadamente 20 mg.

65 En una realización, el sujeto experimenta una disminución en suero de IL- 12 durante el tratamiento. En una

realización, el sujeto experimenta una disminución en el riñón del pSTAT3 durante el tratamiento. En una realización, el sujeto experimenta una disminución en el bazo de las células plasmáticas durante el tratamiento. En una realización, el sujeto experimenta una disminución de los anticuerpos antinucleares séricos durante el tratamiento. En una realización, el sujeto experimenta una disminución del suero IFN $\alpha$  durante el tratamiento. En una realización, el sujeto experimenta una disminución de la proteinuria durante el tratamiento.

**BREVE DESCRIPCION DE LOS DIBUJOS**

- 10
- Fig. 1.** La **Fig. 1** muestra una visión general de cómo el COMPUESTO A se probó en el modelo murino MRL/lpr de lupus agudo.
- 15 **Fig. 2.** La **Fig. 2** representa los niveles de COMPUESTO A en diversos tejidos 4 horas después de la administración de diversas dosis en el ratón MRL/lpr.
- Fig. 3.** La **Fig. 3** muestra la reducción de la incidencia de lymfomegaly en COMPUESTO A tratada en ratones MRL/lpr.
- 20 **Fig. 4.** La **Fig. 4** representa la reducción en el tamaño del bazo y el número total de células de leucocitos del bazo en los ratones MRL/lpr tratados con varias dosis de COMPUESTO A.
- Fig. 5.** La **Fig. 5** representa el cambio en la masa corporal de ratones MRL/lpr tratados con el COMPUESTO A.
- 25 **Fig. 6.** La **Fig. 6** representa los niveles circulantes de IL-12 de citoquinas con y sin tratamiento con el COMPUESTO A a diversas dosis en ratones MRL/lpr.
- Fig. 7.** La **Fig. 7** representa niveles de complemento C3 en ratones MRL/lpr tratados con el COMPUESTO A.
- 30 **Fig.8.** La **Fig. 8** representa secciones renales manchadas por la infiltración de leucocitos en el glomérulo en ratones MRL/lpr. Se observa mas numero de glomerulonephritis en los animales tratados con vehículo que en los animales tratados con tres COMPUESTOS A a EOS. Las flechas negras muestran un aumento de glomérulos e infiltraciones leucocitarias, en los animales tratados con dex y vehículo, pero ausente en los animales tratados con COMPUESTO A.
- 35 **Fig. 9.** La **Fig. 9** representa los niveles reducidos de JAK2, pSTAT3 en los riñones enfermos de los ratones MRL/lpr.
- Fig. 10.** La **Fig. 10** representa la reducción en el porcentaje de células plasmáticas después del tratamiento con 100 mg/kg del COMPUESTO A en los ratones MRL/lpr.
- 40 **Fig. 11.** La **Fig. 11** representa niveles reducidos de ASC en el bazo en ratones tratados por COMPUESTO A. La reducción en ASC que secretan anticuerpos anti-cromatina en una dosis de 100 mg/kg se correlaciona bien con la reducción de las proporciones de PC en el bazo como en la medición por citometría de flujo en la misma dosis. (**Fig 10**)
- 45 **Fig. 12.** La **Fig. 12** representa una visión general de cómo el COMPUESTO A se probó en el modelo espontaneo lento de ratón NZM para el lupus humano.
- 50 **Fig. 13.** La **Fig. 13** representa el aumento de la supervivencia de los ratones NZM tratados con el COMPUESTO A sobre el de vehículo o Dex.
- Fig. 14.** La **Fig. 14** representa en el tiempo los niveles de suero anti-dsDNA ANA a lo largo del tiempo con el COMPUESTO A en el tratamiento en ratones NZM.
- 55 **Fig. 15.** La **Fig. 15** representa los niveles de suero anti-smith ANA a lo largo del tiempo con el COMPUESTO A en el tratamiento en ratones NZM.
- Fig. 16.** La **Fig. 16** representa los niveles de IFN $\alpha$  de citoquinas en el suero en EOS para los ratones NZM tratados con el COMPUESTO A.
- 60 **Fig. 17.** La **Fig. 17** representa las proteínas totales en la orina medidas a lo largo del tiempo con el tratamiento con el COMPUESTO A en ratones NZM.
- 65 **Fig. 18.** Las **Fig.s 18A a E** representan los niveles de proteínas totales de la orina medidos a lo largo del tiempo por los ratones individuales NZM con el tratamiento con el COMPUESTO A.

- 5 **Fig. 19.** La **Fig. 19** representa la histopatología renal de secciones manchadas de los ratones NZM tratados con diversos controles y el COMPUESTO A. Las flechas negras señalan los glomérulos agrandados e leucocitarios infiltrados, que están ausentes en los ratones tratados con el COMPUESTO A.
- 10 **Fig. 20.** La **Fig. 20** representa la histopatología pulmonar de las secciones manchadas de los ratones NZM tratados con el COMPUESTO A.
- 15 **Fig. 21.** La **Fig. 21** representa los niveles reducidos del JAK2 enfocado en el pSTAT3 en el tejido de la enfermedad del lupus, el riñón, la dosificación posterior oral del COMPUESTO A en ratones NZM.
- 20 **Fig. 22.** La **Fig. 22** representa los niveles de IL-12 de citoquinas medidos a lo largo del tiempo con el tratamiento del COMPUESTO A en ratones NZM.
- 25 **Fig. 23.** La **Fig. 23** representa los niveles de IL-17A de citoquinas medidos a lo largo del tiempo con el tratamiento del COMPUESTO A en ratones NZM.
- 30 **Fig.24.** La **Fig. 24** representa los niveles de IL-6 de citoquinas medidos a lo largo del tiempo con el tratamiento del COMPUESTO A en ratones NZM.
- 35 **Fig. 25.** La **Fig. 25** representa los niveles de MIP-1 alfa quimiocinas medidos a lo largo del tiempo con el tratamiento del COMPUESTO A en ratones NZM.
- 40 **Fig. 26.** La **Fig. 26** representa los niveles de quimiocina CXCL10/IP-10 medidos en el suero a lo largo del tiempo con el tratamiento del COMPUESTO A en ratones NZM.
- 45 **Fig. 27.** La **Fig. 27** representa los niveles de quimiocina CXCL9/MIG medidos en el suero a lo largo del tiempo con el tratamiento del COMPUESTO A en ratones NZM.
- 50 **Fig. 28.** **Fig. 28** representa los niveles de citocina IL-4 medidos en el suero a lo largo del tiempo con el tratamiento del COMPUESTO A en ratones NZM.
- 55 **Fig. 29.** La **Fig. 29** representa los niveles de citocina IL-13 medidos en el suero a lo largo del tiempo con el tratamiento del COMPUESTO A en ratones NZM.
- 60 **Fig. 30.** La **Fig. 30** representa los niveles de TNFalfa medidos en el suero a lo largo del tiempo con el tratamiento del COMPUESTO A en ratones NZM.
- 65 **Fig.31.** La **Fig.31** representa los niveles de quimiocina KC/IL-8 medidos en el suero a lo largo del tiempo con el tratamiento del COMPUESTO A en ratones NZM.
- Fig.32.** La **Fig. 32** representa la masa del bazo de los ratones NZM tratados con el COMPUESTOA en EOS.
- Fig. 33.** La **Fig. 33** representa el promedio de la masa corporal medido a través del tiempo en los ratones NZM tratados con el COMPUESTO A.
- Fig. 34.** La **Fig. 34** representa los niveles medios de la resorción ósea biomarcador CTx medidos a lo largo del tiempo en el suero de los ratones NZM tratados con el COMPUESTO A.
- Fig. 35.** La **Fig. 35** representa la proporción de células plasmáticas del bazo CD19/B220- CD38+ CD138+ en los ratones NZM tratados con el COMPUESTO A, la parte superior muestra el porcentaje de los datos representados gráficamente, la parte de abajo proporciona una imagen de gráfico de puntos prima representante de la citometría de flujo.
- Fig. 36.** La **Fig. 36** representa la frecuencia de células secretoras de anticuerpo anti- cromatina ASC ANA de bazos de ratones NZM tratados con el COMPUESTO A.
- Fig. 37.** La **Fig. 37** representa la expresión media del marcador CD38 en los ratones NZM tratados con el COMPUESTO A.
- Fig. 38.** La **Fig. 38** representa el porcentaje de células plasmáticas de vida corta en el bazo en los ratones NZM tratados con el COMPUESTO A.
- Fig. 39.** La **Fig. 39** representa el porcentaje de células plasmáticas de vida corta en la medula ósea en ratones NZM tratados con el COMPUESTO A.

**Fig. 40.** La **Fig. 40** representa el porcentaje de células plasmáticas de larga vida en el bazo en los ratones NZM tratados con el COMPUESTO A.

**Fig. 41.** **Fig. 41** representa el porcentaje de células plasmáticas de larga vida en la médula ósea en ratones NZM tratados con el COMPUESTO A.

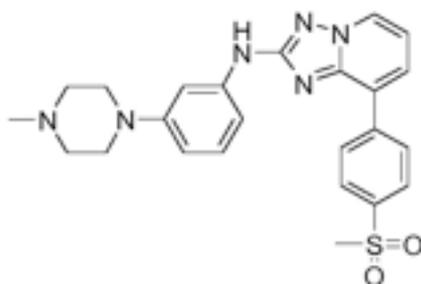
**Fig. 42.** La **Fig. 42** representa un resultado representativo de citometría de gráficos de puntos de puerta en vivo, CD19-negativas, CD38-positivo, el bazo y las células plasmáticas de la médula ósea de ratones NZM tratados con el COMPUESTO A y cerradas de acuerdo con los marcadores en los ejes X e Y.

## DESCRIPCION DETALLADA DE LAS REALIZACIONES ILUSTRATIVAS

Tal como se utiliza en el presente documento el término "aproximadamente" cuando se hace referencia a un valor medible tal como una cantidad, una duración temporal, y similares, pretende abarcar variaciones razonables del valor, tales como, por ejemplo, 610 % del valor especificado. Por ejemplo, la frase "aproximadamente 50%" puede incluir el 610% de 50, o de 45% a 55%.

Tal como se utiliza aquí, el término "sujeto" incluye animales de sangre caliente, preferiblemente mamíferos, incluidos los humanos. En una realización preferida, el sujeto es un primate. En una realización aún más preferida, el sujeto es un humano.

Proporcionado es el COMPUESTO A para uso en métodos para el tratamiento del lupus en un sujeto. El COMPUESTO A es un inhibidor de JAK2 con el nombre químico [8-(4 - metanosulfonilfenil)-[1,2,4]triazolo[1,5-a]piridin-2-il]-[3-(4-metil- piperazin-1-10il)-fenil]-amina. El COMPUESTO A tiene la siguiente estructura:



El COMPUESTO A utilizado en la presente invención se puede administrar en cualquier forma química adecuada, incluyendo formas de sal farmacéuticamente aceptables del compuesto original que preferiblemente se convierten en el compuesto original (es decir, COMPUESTO A) después de la administración. En la presente memoria, "sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a un derivado del compuesto original en el que el compuesto se modifica preparando un ácido o base se sal de los mismos. Ejemplos de sales farmacéuticamente aceptables incluyen sales de ácidos minerales o orgánicos de residuos básicos de amina.

Por lo tanto, en una realización, el COMPUESTO A se administra como un derivado de sal del compuesto original. En una realización, el compuesto A se administra como una sal de ácido del compuesto A.

Cualquier método apropiado de administración puede ser utilizado. Los ejemplos incluyen la inyección (subcutánea, intravenosa, parenteral, intraperitoneal, intratecal, etc.), oral, rectal, transmucoso, inhalación, y transdérmico. Cuando se administra por inyección, la inyección puede ser embolada o infusión continua.

El COMPUESTO A se administra preferiblemente por inyección IV o por una forma de dosificación oral, tal como en un comprimido o cápsula. Por ejemplo, el COMPUESTO A se puede proporcionar como un polvo estéril liofilizado, que puede reconstituirse con, por ejemplo, agua estéril para la inyección, solución salina acuosa (NaCl), o manitol acuoso antes de la inyección. Por lo tanto, en una realización, el COMPUESTO A se administra por inyección intravenosa (IV). En otra realización, el COMPUESTO A se administra por vía oral. En una realización, el COMPUESTO A se administra por vía oral en un comprimido. En otra realización, el COMPUESTO A se administró por vía oral en una cápsula.

Para la administración oral, el COMPUESTO A se puede formular fácilmente combinando COMPUESTO A con vehículos farmacéuticamente aceptables bien conocidos por aquellos en la técnica. Tales vehículos permiten que el COMPUESTO A sea formulado en comprimidos, píldoras, grageas, cápsulas, líquidos, geles, jarabes, pastas, suspensiones, emulsiones, y similares, para la ingestión oral en un sujeto a tratar. Las preparaciones farmacéuticas para su uso oral pueden obtenerse combinando el COMPUESTO A con un excipiente sólido, moliendo opcionalmente la mezcla resultante y procesando la mezcla de gránulos, después de añadir auxiliares adecuados, si se desea, para obtener comprimidos o núcleos de grageas. Los excipientes adecuados incluyen cargas o diluyentes, aglutinantes, disgregantes, lubricantes, antiadherentes, deslizantes, humectantes y agentes activos de superficie,

colores y pigmentos, agentes aromatizantes, edulcorantes, adsorbentes, y enmascadores de sabor.

5 Los diluyentes se añaden típicamente en una pequeña cantidad del fármaco activo para incrementar el tamaño del comprimido. El diluyente más común es la lactosa, que existe en dos formas isoméricas, alfa-lactosa o beta-lactosa, y puede ser cristalino o amorfo. Varios tipos de lactosa incluyen secado por pulverización de monohidrato de lactosa (tal como Super-Tab™), monohidrato de alfa- lactosa (tal como Fast Flo®), anhidro alfa-lactosa, anhidro beta-lactosa, y la lactosa aglomerada. Otros diluyentes incluyen azúcares, tales como azúcar NF compresible, excipiente de dextrosa NF, y dextratos NF. Un diluyente preferido es el monohidrato de lactosa (tal como Fast Flo®). Otros diluyentes preferentes incluyen la celulosa microcristalina (tal como Avicel® PH, y CEOLUS™) y la celulosa microfina (tal como Elcema®).

15 Los diluyentes pueden incluir almidón y derivados de almidón. Los almidones incluyen almidones naturales obtenidos a partir de trigo, maíz, arroz y patatas. Otros almidones incluyen almidón pregelatinizado NF y glicolato de almidón de sodio NF. Los almidones y derivados de almidón funcionan también como desintegrantes. Otros diluyentes incluyen sales inorgánicas, tales como fosfato de calcio dibásico USP (tal como Di-Tab® y Emcompress®), fosfato de calcio tribásico NF (tal como Tri-Tab® y Tri-Cafos®) y sulfato de calcio NF (tal como Compactrol®). Tales polioles como manitol USP, sorbitol NF y xilitol NF también pueden servir como diluyentes. Muchos diluyentes funcionan también como desintegrantes y aglutinantes, y estas propiedades adicionales deben ser tenidas en cuenta al desarrollar una formulación.

20 Los desintegrantes se incluyen en formulaciones de comprimidos para romper los comprimidos en partículas del ingrediente farmacéutico activo y excipientes que facilitarán la disolución del ingrediente activo y mejorar la biodisponibilidad del ingrediente activo. El almidón y derivados del almidón, incluyendo sal sódica de enlace cruzado de un carboximetil éter de almidón (tal como almidón glicolato de sodio NF, Explotab® y Primogel®) son desintegrantes útiles. Un desintegrante preferente es el almidón pregelatinizado tal como almidón 1500®. Otro desintegrante preferente es carboximetilcelulosa sódica de enlace cruzado (tal como croscarmelosa de sodio NF, Ac -Di - Sol®). Otros desintegrantes incluyen polivinilpirrolidona de enlace cruzado (tal como Crospovidona NF), celulosa microcristalina (tal como Avicel® PH).

30 Los aglutinantes son usados como un excipiente de granulación húmeda para aglomerar el ingrediente farmacéutico activo y los otros excipientes. Un aglutinante es seleccionado para mejorar el flujo de polvo y para mejorar la compactabilidad. Los aglutinantes incluyen derivados de celulosa tales como celulosa microcristalina NF, metilcelulosa USP, carboximetilcelulosa sódica USP, hidroxipropil-metilcelulosa USP, NF hidroxietil celulosa, y NF hidroxipropil celulosa. Otros aglutinantes incluyen polividona, polivinilpirrolidona, gelatina NF, gomas naturales (tales como acacia, tragacanto, guar y pectina), pasta de almidón, pregelatinizado almidón NF, sacarosa NF, jarabe de maíz, polietilenglicoles y alginato de sodio, alginato de calcio y amonio, silicato de magnesio y aluminio, polietilenglicoles. Un aglutinante preferido es polivinilpirrolidona, en particular, Povidona USP y preferentemente, povidona K-29/32.

40 Los lubricantes se utilizan en formulación de comprimido para evitar que el comprimido se pegue a las caras de los troqueles y para reducir la fricción durante las etapas de compresión. Los lubricantes incluyen típicamente aceites vegetales (tales como aceite de maíz), aceites minerales, polietilenglicoles (tales como PEG-4000 y PEG- 6000), sales de ácido esteárico (tal como estearato de calcio y estearil fumarato de sodio), sales minerales (tales como talco), sales inorgánicas (tales como cloruro de sodio), sales orgánicas (tales como benzoato de sodio, acetato de sodio y oleato de sodio) y alcoholes de polivinilo. Un lubricante preferido es estearato de magnesio.

50 Los núcleos de grageas pueden proporcionarse con recubrimientos adecuados. Para este propósito, se pueden usar soluciones de azúcar concentradas, que opcionalmente pueden contener goma árabe, talco, polivinilpirrolidona, gel carbopol, polietilenglicol, y/o dióxido de titanio, soluciones de laca y disolventes orgánicos adecuados o mezcla de disolventes. Se pueden añadir colorantes o pigmentos a los comprimidos o recubrimientos de las grageas para identificar o para caracterizar diferentes combinaciones de dosis de los compuestos activos.

55 Las preparaciones farmacéuticas que pueden usarse por vía oral incluyen cápsulas de ajuste suave hechas de gelatina, así como cápsulas blandas, selladas hechas de gelatina y un plastificante, tal como glicerol o sorbitol. Las cápsulas duras pueden contener el COMPUESTO A en mezcla con relleno tal como lactosa, aglutinantes tales como almidones y/o lubricantes tales como talco o estearato de magnesio y, opcionalmente, estabilizantes. En las cápsulas blandas, el COMPUESTO A puede disolverse o suspenderse en líquidos adecuados, tales como aceites grasos, parafina líquida, o polietilenglicoles líquidos. Además, se pueden añadir estabilizantes. Todas las formulaciones para administración oral deben estar en dosis adecuadas para dicha administración.

60 Para la administración bucal, las composiciones pueden tomar la forma de comprimidos o pastillas formuladas de manera convencional.

65 Para la administración por inhalación, el COMPUESTO A se entrega convenientemente en la forma de una presentación de pulverización de aerosol desde envases presurizados o un nebulizador, con el uso de un propulsor

5 adecuado, por ejemplo, diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano, dióxido de carbono u otro gas adecuado. En el caso de un aerosol presurizado la unidad de dosificación puede determinarse proporcionando una válvula para suministrar una cantidad medida. Las cápsulas y cartuchos de, por ejemplo , gelatina para uso en un inhalador o insuflador pueden formularse conteniendo una mezcla en polvo del compuesto y una base adecuada de polvo tal como lactosa o almidón.

10 El COMPUESTO A se puede formular para administración parenteral por inyección, por ejemplo, mediante inyección de bolo o infusión continua. Las formulaciones para inyección pueden presentarse en forma de dosificación unitaria, por ejemplo, en ampollas o en recipientes de dosis múltiples, con un conservante añadido. Las composiciones pueden tomar formas tales como suspensiones, soluciones o emulsiones en vehículos oleosos o acuosos, y pueden contener agentes de formulación tales como de suspensión, estabilizantes y/o dispersantes.

15 Las formulaciones farmacéuticas para administración parenteral incluyen soluciones acuosas del COMPUESTO A en forma soluble en agua. Adicionalmente, las suspensiones del COMPUESTO A se pueden preparar como suspensiones apropiadas de inyección oleosas. Adecuados disolventes lipófilos o vehículos incluyen aceites grasos tales como aceite de sésamo, o ésteres de ácidos grasos sintéticos, tales como oleato de etilo o triglicéridos, o liposomas. Las suspensiones de inyección acuosas pueden contener sustancias que aumentan la viscosidad de la suspensión, tales como carboximetilcelulosa de sodio, sorbitol, o dextrano. Opcionalmente, la suspensión también puede contener estabilizantes o agentes adecuados que aumentan la solubilidad del COMPUESTO A para permitir la preparación de soluciones muy concentradas.

20 El COMPUESTO A puede ser de una forma de polvo para su constitución con un vehículo adecuado, por ejemplo, agua estéril libre de pirógenos, antes de su uso.

25 El COMPUESTO A también se puede formular en composiciones rectales tales como supositorios o enemas de retención, por ejemplo, que contienen bases de supositorio convencionales tales como manteca de cacao u otros glicéridos.

30 Además de las formulaciones descritas previamente, el COMPUESTO A también se puede formular como una preparación de depósito. Tales formulaciones de acción prolongada pueden administrarse por implantación (por ejemplo subcutánea o intramuscular) o por inyección intramuscular. Así, por ejemplo, el COMPUESTO A se puede formular con adecuados materiales poliméricos o hidrófobos (por ejemplo como una emulsión en un aceite aceptable) o resinas de intercambio iónico, o como derivados poco solubles, por ejemplo, como una sal poco soluble.

35 Los liposomas y las emulsiones son ejemplos bien conocidos de vehículos de suministro o portadores para fármacos hidrófobos. También pueden emplearse ciertos disolventes orgánicos tales como dimetilsulfóxido, aunque normalmente a coste de una mayor toxicidad. Además, el COMPUESTO A se puede administrar utilizando un sistema de liberación sostenida, tal como matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen el agente terapéutico. Varias formas de materiales de liberación sostenida se han establecido y son bien conocidos por los expertos en la técnica. Las cápsulas de liberación sostenida pueden, dependiendo de su naturaleza química, liberar el COMPUESTO A durante unas pocas horas hasta más de 100 días.

40 Las composiciones farmacéuticas también pueden comprender adecuados vehículos o excipientes en fase sólida o gel. Ejemplos de tales vehículos o excipientes incluyen pero no se limitan a carbonato de calcio, fosfato de calcio, diversos azúcares, almidones, derivados de celulosa, gelatina, y polímeros tales como polietilenglicoles.

45 El COMPUESTO A se administra en una cantidad eficaz para tratar el lupus, es decir, una cantidad eficaz para prevenir, aliviar o mejorar los síntomas de la enfermedad, prolongar la supervivencia del sujeto a tratar, y/o un impacto favorable en los biomarcadores relacionados con el lupus en el sujeto. La determinación de la cantidad efectiva del COMPUESTO A está bien dentro de la capacidad de los expertos en la técnica a la luz de la descripción detallada y los ejemplos proporcionados en el presente documento. La cantidad efectiva puede variar dependiendo de factores tales como el tamaño del sujeto, la gravedad de la enfermedad lupus, la frecuencia de administración (por ejemplo, una vez al día vs. varias veces al día), la manera de administración del compuesto, de la salud y condiciones co-mórbidos del sujeto, el juicio y experiencia del médico que prescribe (por ejemplo, con los mismos o similares drogas), el modo de administración, las características de biodisponibilidad de la forma de dosificación administrada, el régimen de dosis seleccionado, y el tipo de tratamiento concurrente (por ejemplo, glucocorticoides). Por ejemplo , la cantidad efectiva del COMPUESTO A para la monoterapia puede ser una dosis superior a la cantidad del COMPUESTO A que es efectiva cuando se utiliza junto al COMPUESTO A en combinación con otras terapias con lupus. Las dosis efectivas pueden extrapolarse a partir de curvas de dosis-respuesta derivadas de sistemas de prueba modelo in vitro o animal, y se pueden basar en el área de superficie o el peso del sujeto.

50 El tratamiento puede iniciarse con dosificaciones más pequeñas que son menores que la dosis óptima del compuesto. Posteriormente, la dosis se puede aumentar mediante pequeños incrementos hasta que se alcanza un efecto óptimo bajo las circunstancias. La dosis diaria total puede dividirse y administrarse en porciones durante el día si se desea. Para optimizar el régimen de la dosificación, la eficacia del COMPUESTO A se puede supervisar

mediante la supervisión del efecto del tratamiento en varios biomarcadores en un tratamiento de un sujeto sometido a estudio. Se incluyen biomarcadores útiles enumerados en la sección de Ejemplos en el presente documento (por ejemplo, anticuerpos antinucleares, citoquinas tales como IFN e IL- 12, proteinuria, la inhibición JAK2, etc.). Dos biomarcadores especialmente convenientes para supervisar la eficacia del tratamiento del lupus son la proteinuria y los anticuerpos antinucleares. Una dosis efectiva del COMPUESTO A alterará el biomarcador(s) en la forma deseada, en comparación con el nivel de biomarcadores antes del tratamiento (por ejemplo, disminuir la proteinuria, disminuir los anticuerpos antinucleares, disminuir pSTAT3, etc.) Por lo tanto, una dosis efectiva del COMPUESTO A puede optimizarse a partir de una dosis baja y, a continuación aumentarla gradualmente durante el seguimiento de uno o más de estos biomarcadores. En general, es preferible obtener la evaluación inicial del biomarcador(s) (por ejemplo, proteinuria o anticuerpos antinucleares) del paciente antes de comenzar la terapia y una o más evaluaciones adicionales en diferentes puntos de tiempo durante el tratamiento. En este uso, se determina una determinación de la línea de base antes de la terapia y entonces los cambios en biomarcador(s) (por ejemplo, proteinuria o anticuerpos antinucleares) se determinan durante el curso de la terapia. Alternativamente, se pueden realizar dos o más determinaciones sucesivas durante el tratamiento sin la necesidad de una medición de línea de base pre- tratamiento. En este uso, la primera evaluación de biomarcadores(s) (por ejemplo, la proteinuria o anticuerpos antinucleares) debe hacerse a partir del sujeto como un nivel de línea de base para determinar si el nivel está aumentando o disminuyendo.

En realizaciones preferidas, el sujeto sometido a tratamiento con el COMPUESTO A experimenta un cambio deseable en uno o más biomarcadores asociados con la enfermedad lupus. Adecuados biomarcadores asociados a lupus incluyen lymphomegaly, esplenomegalia, bazo repletos de leucocitos, IL-12 en suero, C3 en suero, celularidad glomerular del riñón, la infiltración intersticial renal, pSTAT3 del riñón, células plasmáticas del bazo, los anticuerpos antinucleares séricos, los anticuerpos antinucleares anti-dsDNA en suero, IFN $\alpha$  en suero, proteinuria, infiltrados pulmonares, IL-17A en suero, IL-6 en suero, CCL3/MIP-1 $\alpha$  en suero, CXCL10/IP-10 en suero, CXCL9/MIG en suero, IL-4 en suero, IL-13 en suero, TNF $\alpha$  en suero, KC/IL-8 en suero, y CTx en suero. Por lo tanto, en una realización, el sujeto experimenta una disminución de lymphomegaly durante el tratamiento con el COMPUESTO A. En otra realización, el sujeto experimenta una disminución de la esplenomegalia durante el tratamiento con el COMPUESTO A. En otra realización, el sujeto experimenta una disminución en los recuentos de leucocitos del bazo durante el tratamiento con el COMPUESTO A. En otra realización, el sujeto experimenta una disminución de IL-12 en suero durante el tratamiento con el COMPUESTO A. En otra realización, el sujeto experimenta un aumento del C3 en suero durante el tratamiento con el COMPUESTO A. En otra realización, el sujeto experimenta una disminución en la celularidad glomerular del riñón durante el tratamiento con el COMPUESTO A. En otra realización, el sujeto experimenta una disminución de la infiltración intersticial renal durante el tratamiento con el COMPUESTO A. En otra realización, el sujeto experimenta una disminución de pSTAT3 en el riñón durante el tratamiento con el COMPUESTO A. En otra realización, el sujeto experimenta una disminución en las células plasmáticas del bazo durante el tratamiento con el COMPUESTO A. En otra realización, el sujeto experimenta una disminución de anticuerpos antinucleares en suero durante el tratamiento con el COMPUESTO A. En otra realización, el sujeto experimenta una disminución en los anticuerpos antinucleares anti-dsDNA del suero durante el tratamiento con el COMPUESTO A. En otra realización, el sujeto experimenta una disminución de IFN $\alpha$  en suero durante el tratamiento con el COMPUESTO A. En otra realización, el sujeto experimenta una disminución de la proteinuria durante el tratamiento con el COMPUESTO A. En otra realización, el sujeto experimenta una disminución de infiltrados pulmonares durante el tratamiento con el COMPUESTO A. En otra realización, el sujeto experimenta una disminución de IL-17A en suero durante el tratamiento con el COMPUESTO A. En otra realización, el sujeto experimenta una disminución de IL-6 en suero durante el tratamiento con el COMPUESTO A. En otra realización, el sujeto experimenta una disminución de CCL3/MIP-1 $\alpha$  en suero durante el tratamiento con el COMPUESTO A. En otra realización, el sujeto experimenta una disminución de CXCL 10/IP-10 en suero durante el tratamiento con el COMPUESTO A. En otra realización, el sujeto experimenta una disminución de CXCL9/MIG en suero durante el tratamiento con el COMPUESTO A. En otra realización, el sujeto experimenta una disminución de IL-4 en suero durante el tratamiento con el COMPUESTO A. En otra realización, el sujeto experimenta una disminución de IL-13 en suero durante el tratamiento con el COMPUESTO A. En otra realización, el sujeto experimenta una disminución de TNF $\alpha$  en suero durante el tratamiento con el COMPUESTO A. En otra realización, el sujeto experimenta una disminución de KC/IL-8 en suero durante el tratamiento con el COMPUESTO A. En otra realización, el sujeto experimenta una disminución de CTx en suero durante el tratamiento con el COMPUESTO A.

El régimen de administración del COMPUESTO A puede variar dependiendo de factores tales como los farmacokinetics de la forma de dosificación, el tipo de síntomas del lupus siendo tratado o inhibido, el tamaño del sujeto, la gravedad de la enfermedad del lupus y el eficaz dosificación. El momento de la administración del COMPUESTO A se puede variar fácilmente por el médico que lo trata para optimizar la eficacia y minimizar los efectos secundarios teniendo en cuenta las consideraciones anteriores y la presente descripción detallada.

Existe una amplia flexibilidad en los programas de dosificación para el COMPUESTO A de acuerdo con la presente invención. En ciertas realizaciones, los programas de dosificación pueden ser adaptados a partir de esquemas de dosificación conocidos por ser adecuados para otros inhibidores JAK. Por ejemplo, los inhibidores tasocitinib JAK (CP- 690550) y INCB028050 mostraron ser efectivos en la artritis reumatoide en dosis de 5-30 mg dos veces al día, o 4-10 mg una vez al día, respectivamente (Coombs, JH et al. 2010; [www.medpagetoday.com/MeetingCoverage/ACR/23308](http://www.medpagetoday.com/MeetingCoverage/ACR/23308)). A pesar de que la técnica anterior de inhibidores JAK se

utilizo para tratar la artritis reumatoide y no el lupus, la comparación es posible debido a una efectiva inhibición JAK es responsable en el tratamiento de ambas enfermedades.

5 El COMPUESTO A se puede administrar en cualquier dosis adecuada. En una realización, el COMPUESTO A se administra en una dosis de aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 1 g/kg de peso corporal. En otra realización, el COMPUESTO A se administra en una dosis de aproximadamente 0,1 mg/kg a aproximadamente 200 mg/kg de peso corporal. En otra realización, el COMPUESTO A se administra en una dosis de aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 500 mg/kg de peso corporal. En otra realización, el COMPUESTO A se administra en una dosis de aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal. En otra realización, el COMPUESTO A se administra en una dosis de aproximadamente 10 mg/kg a aproximadamente 200 mg/kg de peso corporal. En otra realización, el COMPUESTO A se administra en una dosis de aproximadamente 10 mg/kg a aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal. En otra realización, el COMPUESTO A se administra en una dosis de aproximadamente 25 mg/kg a aproximadamente 150 mg/kg de peso corporal. En otra realización, el COMPUESTO A se administra en una dosis de aproximadamente 50 mg/kg a aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal. En otra realización, el COMPUESTO A se administra en una dosis de aproximadamente 55 mg/kg a aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal. En otra realización, el COMPUESTO A se administra en una dosis de aproximadamente 1 mg/kg de peso corporal. En otra realización, el COMPUESTO A se administra en una dosis de aproximadamente 5 mg/kg de peso corporal. En otra realización, el COMPUESTO A se administra en una dosis de aproximadamente 10 mg/kg de peso corporal. En otra realización, el COMPUESTO A se administra en una dosis de aproximadamente 50 mg/kg de peso corporal. En otra realización, el COMPUESTO A se administró a una dosis de aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal. En otra realización, el COMPUESTO A se administró a una dosis de aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 1 g. En otra realización, el COMPUESTO A se administró a una dosis de aproximadamente 0,5 mg a aproximadamente 500 mg. En otra realización, el COMPUESTO A se administró a una dosis de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 100 mg.

25 En otra realización, el COMPUESTO A se administró a una dosis de aproximadamente 5 mg a aproximadamente 50 mg. En otra realización, el COMPUESTO A se administró a una dosis de aproximadamente 5 mg a aproximadamente 30 mg. En otra realización, el COMPUESTO A se administró a una dosis de aproximadamente 5 mg a aproximadamente 20 mg. En otra realización, el COMPUESTO A se administró a una dosis de aproximadamente 1 mg. En otra realización, el COMPUESTO A se administró a una dosis de aproximadamente 5 mg. En otra realización, el COMPUESTO A se administró a una dosis de aproximadamente 10 mg. En otra realización, el COMPUESTO A se administró a una dosis de aproximadamente 20 mg. En otra realización, el COMPUESTO A se administró a una dosis de aproximadamente 30 mg. En otra realización, el COMPUESTO A se administró a una dosis de aproximadamente 40 mg. En otra realización, el COMPUESTO A se administró a una dosis de aproximadamente 50 mg. En otra realización, el COMPUESTO A se administró a una dosis de aproximadamente 100 mg. En otra realización, el COMPUESTO A se administró a una dosis de aproximadamente 200 mg. Las dosis anteriores son adecuados para cualquier método de administración del COMPUESTO A, y son especialmente adecuadas para la dosificación oral.

40 El COMPUESTO A se puede administrar a las dosis descritas anteriormente de acuerdo con cualquier programa adecuado. Las cantidades de dosis del COMPUESTO A puede ser constantes o variar dentro del programa de dosis. Las dosis del COMPUESTO A pueden mantenerse a un nivel constante durante el programa a menos que (a) los cambios de un biomarcador(s) no son observados, en cuyo caso las dosis posteriores pueden aumentar, o (b) se observa significativa toxicidad relacionada con la droga, en cuyo caso las dosis posteriores se pueden reducir, por ejemplo en aproximadamente del 20-30% en cada caso. Un programa adecuado del COMPUESTO A típicamente estará en el intervalo de dosificación de una vez al mes para administración de dosis múltiples al día. En una realización preferida, se administra el COMPUESTO A una vez al día. En otra realización, el COMPUESTO A se administra una vez por semana. En otra realización, el COMPUESTO A se administra dos veces al día. En otra realización, el COMPUESTO A se administra tres veces por día. En otra realización, el COMPUESTO A se administra cuatro veces por día.

55 Uno o más tratamientos de lupus se pueden utilizar en combinación con la administración del COMPUESTO A. Tales tratamientos incluyen agentes lupus, incluyendo, pero no limitado a los glucocorticoides, hydroxchloroquine, micofenolato mofetil (MMF), azatioprina (AZA) y ciclofosfamida (CTX). Las dosis apropiadas de estos agentes son bien conocidos en la técnica.

## MATERIALES Y METODOS

### *Animales*

60 Se obtuvieron ratones femeninos MRL/lpr de seis semanas de edad propensos al lupus (Jackson Labs, #000485) y no propensos al lupus Jackson Labs, #000486) de los Laboratorios Jackson (Bar Harbor, ME). Se obtuvieron espontáneos ratones hembra SLE-propensos NZBWF1/J(NZM) (catálogo n°. 100008) y ratones no propensos al lupus (con tiempo antes del experimento) NZW/LacJ (n° de catálogo. 001058) de los Laboratorios Jackson (Bar Harbor, ME) de 15-semanas de edad. Todos los ratones se mantuvieron en un ciclo de 24 horas luz/oscuridad, con comida y agua disponible ad libitum. Todos los procedimientos experimentales de animales

fueron aprobados por y de acuerdo a las regulaciones del Comité de Cuidado y Uso de Animales Institucional (IACUC) de Cephalon, Inc; aprobado IACUC protocolo #03-040 y #03-03-041.

Los ratones MRL/lpr desarrollan una rápida enfermedad linfoproliferativa debido una molécula inactiva Fas previniendo las adecuadas apoptosis de las células autorreactivas T y B en los tejidos linfoides primarios y secundarios (deficiencia en tanto mecanismo central y periférico tolerancia). Debido a esta alteración del mecanismo de tolerancia, un porcentaje de todas las células T y B que entran en la periferia tienen una alta probabilidad de responder al auto proteína/tejidos y así iniciar la autoinmunidad temprana en la vida. Los ratones modelo MRL/lpr desarrollan varios síntomas similares a la enfermedad inflamatoria crónica que son características del temprano y tardío lupus incluyendo la generación de anticuerpos anti-nucleares, artritis, manifestaciones dermatológicas, glomerulonefritis mediada por inmunocomplejos, que conduce a la proteinuria y finalmente la muerte. Menores fenómenos caracterizados son el CNS y manifestaciones cardíacas, ambas de los cuales son más comunes en los seres humanos. Previos estudios de optimización y validación mostraron claramente que la enfermedad se manifiesta solamente en animales MRL/lpr enfermos y no en los ratones de control MRL/Mp, y que los anticuerpos antinucleares (ANAs) conducen una forma rápida de entre 4-12 semanas a la aparición de la nefritis lúpica alrededor de las semanas 18-25 con la presencia de proteinuria. La mortalidad es mayor en las hembras y se produce alrededor de las 25 semanas de edad, la enfermedad renal incluye glomerulonefritis, infiltrados glomerulares, esclerosis y vasculitis. Se puede observar que tanto la esplenomegalia y lymphomegalia se asocia con la dermatitis.

La cepa NZM actúa como un modelo de ratón de impulsado genéticamente, progresivo, lupus eritematoso sistémico (SLE). La evolución de la enfermedad en ratones NZM se caracteriza por una activación anormal de células policlonales B con una alta producción de diversos autoanticuerpos, incluyendo los dirigidos contra el ADN y otros antígenos nucleares, y en contra de las proteínas del citoesqueleto. Elevados complejos inmunes circulantes pueden conducir a una glomerulonefritis fatal en ratones más viejos.

#### COMPUESTO A

El COMPUESTO A se preparó de una manera análoga al procedimiento de cinco pasos que se describe a continuación (véase el Ejemplo 35 de la Solicitud Internacional No. PCT/US10 /37363):

Paso 1: A una solución de una piperazina 1-(3-bromo-fenil) (aproximadamente 1 g) y ácido acético (aproximadamente 0,4 ml) en metanol (aproximadamente 25 ml) se añade 37 % de formaldehído en agua/metanol (alrededor de 56,7:37:6,3, agua:formaldehído:metanol; aproximadamente 5 ml). La mezcla se agita a temperatura ambiente durante aproximadamente 18 horas. La suspensión se enfría a aproximadamente 5°C en un baño de hielo/agua y cianoborohidruro de sodio (aproximadamente 5 g) que se añade en pequeñas porciones. La mezcla se agita y se calienta a temperatura ambiente durante aproximadamente 18 horas. Se vierte en la mezcla lentamente cloruro de amonio acuoso saturado (aproximadamente 200 ml) y se agita durante aproximadamente 1 hora. La mezcla se extrae con diclorometano (3 x 75 sobre 50 ml). Las capas orgánicas combinadas se secan sobre sulfato de magnesio, se filtran y se evaporan. El material se coloca bajo un vacío alto durante aproximadamente 18 horas para proporcionar 1-(3-bromo-fenil)-4-metil-piperazina como un aceite amarillo pálido (aproximadamente 1 g). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ, ppm): 7.10 (dd, J=8.2, 8.2 Hz, 1H), 7.04 (dd, J=2.1, 2.1 Hz, 1H), 6.95 (ddd, J=7.8, 1.7, 0.7 Hz, 1H), 6.83 (ddd, J=8.3, 2.4, 0.6 Hz, 1H), 3.23-3.18 (m, 4H), 2.58-2.54 (m, 4H), 2.35 (s, 3H). MS = 255, 257 (MH)+.

Paso 2: A una solución de 3-bromo-piridin-2-ilamina (aproximadamente 10 g) en 1,4-dioxano (aproximadamente 100 ml) se añade gota a gota isotiocianato de etoxicarbonilo (aproximadamente 7 ml). La mezcla se agita bajo una atmósfera de nitrógeno durante aproximadamente 18 horas. Los componentes volátiles se evaporan para dar un sólido ceroso. El material recuperado se tritura con hexano (aproximadamente 250 ml). N-(3-bromo-2-piridinil)-N'-carboetoxi-tiourea se aísla y se usa sin purificación adicional. <sup>1</sup>H NMR 400 MHz, (D<sub>3</sub>C)<sub>2</sub>SO, δ, ppm): 11.46 (s, 1H), 11.43 (s, 1H), 8.49 (dd, J=4.6, 1.5 Hz, 1H), 8.18 (dd, J=8.0, 1.5 Hz, 1H), 7.33 (dd, J=8.0, 4.7 Hz, 1H), 4.23 (q, J=7.1 Hz, 2H), 1.27 (t, J=7.2 Hz, 3H). MS = 215 (MH)+.

Paso 3: A una suspensión agitada de hidrócloruro de hidroxilamina (aproximadamente 17 g) y N, N-diisopropiletilamina (aproximadamente 26 ml) en una mezcla de metanol (aproximadamente 70 ml) se añade N- etanol (aproximadamente 70 ml) (3-bromo-2-piridinil) -N'-carboetoxi-tiourea. La mezcla se agita durante aproximadamente 2 horas a temperatura ambiente y después se calienta a aproximadamente 60°C durante aproximadamente 18 horas. La suspensión se enfría a temperatura ambiente, se filtra y se aclara con metanol, agua y luego metanol. 8-bromo[1,2,4]triazolo[1,5 - a]piridin-2-ilamina se aísla como un sólido (alrededor de 8 g) de color blanquecino. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, (D<sub>3</sub>C)<sub>2</sub>SO, δ, ppm): 8.58 (d, J=6.4 Hz, 1H), 7.73 (d, J=7.6 Hz, 1H), 6.80 (t, J=7.0 Hz, 1H), 6.25 (s, 2H). MS = 213, 215 (MH)+.

Paso 4: Se carga con acetato de paladio (aproximadamente 0,2 g) y trifetilfosfina (aproximadamente 0,6 g) un tubo de horno secado. El tubo se evacua a alto vacío y toma una retroactiva bajo una corriente de nitrógeno durante aproximadamente 5 minutos. Se añade un disolvente adecuado tal como 1,4-dioxano (alrededor de 10 ml) y la

mezcla se agita en atmósfera de nitrógeno durante un tiempo adecuado (por ejemplo, durante unos 10 minutos). Se añaden 8-bromo [1,2,4]triazolo[1,5-a] piridin-2-ilamina (0,75 g), (4-methylsulfonylphenyl) borónico (aproximadamente 1 g), un disolvente adecuado, tal como N, N- dimetilformamida (aproximadamente 10 ml) y una base adecuada, tal como aproximadamente 1,5 M de carbonato sódico en agua (aproximadamente 10 ml). La mezcla se agita durante aproximadamente 2 minutos a temperatura ambiente en atmósfera de nitrógeno a continuación, el tubo se sella y se calienta a aproximadamente 80°C durante aproximadamente 18 horas. La mezcla se transfiere a una matraz de fondo redondo, y los volátiles se evaporan a presión reducida. El producto se aísla de una manera adecuada. Por ejemplo, puede ser añadida agua (aproximadamente 100 ml) y se agita la mezcla. El sólido puede entonces recogerse por filtración, y opcionalmente se enjuaga con agua, se seca al aire, se tritura con éter/diclorometano (alrededor de 4:1; aproximadamente 10 ml), se filtra y se aclara con éter. Se aísla como un sólido de color canela (aproximadamente 0,6g), 8-(4-metanosulfonil-fenil)-[1,2,4]triazolo[1,5-a] piridin-2-ilamina. MP = 236-239 °C. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, (D<sub>3</sub>C)<sub>2</sub>SO, δ, ppm): 8.63 (d, J=6.3 Hz, 1H), 8.38 (d, J=7.9 Hz, 2H), 8.03 (d, J=7.9 Hz, 2H), 7.84 (d, J= 7.3 Hz, 1H), 7.03 (t, J=7.0 Hz, 1H), 6.21 (br s, 2H), 3.28 (s, 3H). MS = 289 (MH)+.

Paso 5: a un tubo de horno secado se añade acetato de paladio (aproximadamente 10 mg) y 2,2'-bis-diciclohexilfosfanil-bifenil (aproximadamente 30 mg) , 8-(4-metanosulfonil-fenil)-[1,2,4]triazolo[1,5-a]piridin-2-ilamina (aproximadamente 75 mg), 1-(3-bromo-fenil)-4-metilpiperazina (aproximadamente 80 mg), una base adecuada, tal como carbonato de cesio (aproximadamente 270 mg) y un disolvente adecuado, tal como 1,4-dioxano (aproximadamente 5 ml). El tubo se evacua y se toma tres veces una retroactiva con nitrógeno. El tubo se selló y se calienta a aproximadamente 80°C durante aproximadamente 72 horas. La mezcla se enfría a temperatura ambiente y el producto se aísla de una manera adecuada. Por ejemplo, la mezcla enfriada se puede diluir con diclorometano (aproximadamente 10 ml), se filtra a través de un tapón de tierra de diatomeas, se enjuaga con diclorometano y se evaporó. El material se puede purificar, por ejemplo, mediante cromatografía, por ejemplo, la utilización de un aparato de purificación automatizada de ISCO (por ejemplo, columna de gel de sílice modificada de amina 5 % → 100 % de acetato de etilo en hexanos). [8-(4-metanosulfonil-fenil)-[1,2,4] triazolo [1,5-a]piridin-2-il]-[3-(4-metilpiperazin-1-il)-fenil]-amina (es decir, el compuesto a) se aísla como un amarillo sólido (aproximadamente 0,07 g). MP = 232-234 °C. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ, ppm): 8.49 (d, J=7.2 Hz, 1H), 8.25 (d, J=7.5 Hz, 2H), 8.08 (d, J=7.9 Hz, 2H), 7.65 (d, J=7.7 Hz, 1H), 7.38 (s, 1H), 7.27-7.20 (m, 1H), 7.04-6.95 (m, 2H), 6.84 (s, 1H), 6.60 (d, J=8.0 Hz, 1H), 3.30-3.25 (m, 4H), 3.10 (s, 3H), 2.63-2.58 (m, 4H), 2.38 (s, 3H). MS = 463 (MH)+.

### 30 **Citometría de Flujo**

Los anticuerpos utilizados para la citometría de flujo consistieron en anti-ratón de CD138-APC (eBioscience, San Diego, CA), anti-ratón CD19-FITC (eBioscience, San Diego, CA), anti-ratón CD38-PE (eBioscience, San Diego, CA) y anti- ratón CD45R/B220-Cyc (eBioscience, San Diego, CA), control de isotipo de rata IgG1-APC (eBioscience, San Diego, CA), control de isotipo de rata IgG2a PE (eBioscience, San Diego, CA). Todas las muestras se analizaron usando un citómetro de flujo Accuri C6. Se utilizó un medio completo para todos los experimentos que implican el cultivo ex vivo de esplenocitos para todos los experimentos ELISPOTEI medio completo consistía en RPMI 1640 (Cellgro, Manassas, VA) , más 1% de Pen-Strep (Cellgro, Manassas, VA), 1 % de L-Gln (Cellgro, Manassas, VA) , 1 % NEAA (Cellgro, Manassas, VA) , β -ME (Cellgro, Manassas, VA), más un 10 % de SFB (Cellgro, Manassas, VA) .

Lavado, esplenocitos RBC-lisados se tiñeron para los marcadores de células plasmáticas que se utilizó anteriormente en los informes publicados (Neubert, Meister et al., 2008). Tal como se utiliza aquí, el término "célula de plasma " se referirá a la siguiente definición inmunofenotipo : se definieron como células plasmáticas como eventos in vivo CD19-negativas, CD45R/B220-negativas, CD138-positivas , CD138-positivas para el modelo MRL/lpr. Se recogieron un total de 200,000-500,000 eventos por tubo/muestra. Insuficientes determinación de muestras limitadas de células plasmáticas en la médula ósea. La tinción de flujo de protocolo fue como sigue, brevemente, las células se suspendieron en medio completo (definido anteriormente) y 2,5 mg de anti-CD16/CD32 (FcBlock) con anti-CD19-FITC, anti-CD38-PE, anti-CD45R/B220-Cyc anticuerpos y anti-CD138-APC. Después de 20 minutos de tinción en hielo, las muestras se lavaron después se fijaron. Todas las muestras fueron replicadas con apropiados, isotipos coincidentes como se describe a continuación.

### **Análisis Luminex de muestras de suero de citoquinas**

Para el procesamiento de las muestras de suero para el análisis de citoquinas, se descongeló en hielo un plasma congelado a -80°C, vórtex, y se centrifugó durante 10 minutos para eliminar los residuos y agregados. Se utilizó un total de 25 a 50 ml de suero para los ensayos de Luminex® siguiendo las instrucciones del fabricante. Se midieron diez diferentes citoquinas de ratón utilizando la citoquina ratón 10-plex kit de cuentas (Invitrogen, Carlsba , CA, no. LMC0001). Brevemente, las placas de filtro (Millipore, Billerica, MA, no. MAIPSWU10), fueron pre-mojadas con 200 ml de solución de lavado (componente del kit) y 25 ml de perlas se añadieron por pocillo. Se diluyeron las muestras de suero y se añadió un volumen total de 50 ml por pocillo (es decir, 25 ml de muestra de suero, más 25 ml de diluyente de ensayo proporcionado por el fabricante). Se incubaron placas con perlas durante 2 horas a temperatura ambiente (RT) en un agitador orbital en la oscuridad. Al final de la incubación, la placa(s) se lavaron dos veces en un buffer kit, se añadió anticuerpos secundarios biotinilados a una dilución 1:10 (100 ml) en diluyente de biotina proporcionado en el kit. Se añadió estreptavidina en diluyente de ensayo a 100 ml por pocillo, luego se incubaron durante 30 minutos a RT en la oscuridad. Las placas se lavaron 3 veces y luego se añadió 100 ml de

solución del kit de lavado y se agitó durante 2-3 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad. Se ejecutaron las placas inmediatamente después de este periodo de incubación en una unidad de Luminex xMAP 200 con la adquisición de datos y el software de análisis (Invitrogen, San Diego, CA, no. MAP0200). Todos los lavados de grano se realizaron utilizando una unidad de colector de vacío (Pall, Ann Arbor, MI no. 5017). Para todos los ensayos de citoquinas Luminex, los valores por debajo del límite de detección establecidos por el punto más bajo a lo largo de la norma o fijados por el fabricante fueron considerados fuera de rango, no se estimaron, pero supone el punto más bajo a lo largo de la curva estándar para ese ensayo particular.

### Analisis de Orina

Las muestras de orina fueron ácidas precipitadas para la recuperación total de proteínas y análisis. Las muestras para las que se emitió suficiente orina se utilizaron para el análisis leukouria Uristix® (estudio MRL/lpr solamente). Brevemente, se preparó una solución de proteína estándar a partir de sueros de ratón normal y fue utilizado como un estándar para el ensayo de proteínas en orina de ratón por la turbidez. La preparación estándar fue la siguiente: 0, 5, 10, 15, 20, 30, 40, y 50 ml de 4 mg/mL del suero de ratón del estándar de la solución de la proteína como se proporciona en el kit añadiendo por duplicado en dos columnas. Se añadió PBS a pocillos individuales para ajustar el volumen final a 50 ml. Para la preparación de muestras de orina, se centrifugaron muestras de orina a 9880 x g durante 3 minutos utilizando una mesa de micro-centrífuga. Se añadió sobrenadante de la orina (1-50 ml) por duplicado. Se añadió PBS para ajustar el volumen a 50 ml en total. Para el ensayo de turbidez: se añadió 25 ml de 0,1 N HCl en columnas blancas y 250 ml de ácido sulfosalicílico 3% en las columnas de prueba. La microplaca se incubó durante 10 minutos a RT y se leyeron las placas usando un lector de ELISA con un solo haz a 450 nm. Para el ensayo de tira Uristix®, se diseñaron y etiquetaron tiras. Se colocaron veinte microlitros de orina en cada cuadrado de tira de ensayo y se incubaron durante al menos 30 segundos antes de que el resultado se registrara. Para todos los ensayos basados en el total de la placa de análisis de orina, los valores por debajo del límite de detección establecido por el punto más bajo a lo largo de la norma o establecido por el fabricante fueron considerados fuera de rango, no se estimaron, pero supone el punto más bajo a lo largo de la curva estándar para ese ensayo particular.

### Histología

Para los análisis histológicos, el riñón y el pulmón (sólo modelo NZM) se retiraron a la izquierda de cada animal y se fijaron en 10% tamponada neutra al 10% de formalina (EMD) durante 48 horas en un eje de balancín orbital a 25°C, después se lavaron durante la noche con corriendo dH<sub>2</sub>O y se almacenaron en etanol al 70% a 4°C hasta el momento de ser procesados. Manchas de riñón utilizadas para los análisis histológicos incluyen hematoxilina y eosina (H&E), ácido periódico de Schiff (PAS) y tricrómico (Wistar Institute, Filadelfia, PA). Todas las 3 secciones teñidas fueron utilizadas por el patólogo con fines de puntuación. Toda puntuación histológica se realizó cegada y por una junta independiente certificada por un patólogo médico veterinario (Julie Engiles, VMD, DACVP; Universidad de Pennsylvania). Se utilizaron múltiples manchas para determinar los valores de puntuación. Imágenes en **las figuras 8, 19 y 20** muestran el área más afectada de la sección seleccionada ciegamente por el patólogo.

Método de calificación del riñón IC- GN (Smith, Dong et al., 2007):

1. Celularidad glomerular - Marcador 1-5: nulo, bajo, moderado, alto, grave
2. Necrosis glomerular - Marcador 1-5: nulo, bajo, moderado, alto, grave
3. La glomeruloesclerosis - Marcador 1-5: nulo, bajo, moderado, alto, grave
4. Infiltración intersticial - Marcador 1-5: nulo, bajo, moderado, alto, grave
5. La atrofia tubular - Marcador 1-5: nulo, bajo, moderado, alto, grave
6. La fibrosis intersticial - Marcador 1-5: nulo, bajo, moderado, alto, grave
7. La vasculitis - Marcador 1-5: nulo, bajo, moderado, alto, grave

Definiciones patólogo específicas:

- La necrosis se definió por la presencia de restos/picnosis nucleares dentro del penacho glomerular indicativo de "necro-sis". En muchas muestras, este fue un hallazgo muy leve y raro dentro de sólo unos pocos segmentos del mechón glomerular. También se considerado un borramiento del mechón glomerular por PAS positivo, tricrómico de necrosis de material negativo.
- La esclerosis glomerular se define por un aumento de fibroplasia o fibrosis dentro del mechón glomerular o de cápsula. A veces, la esclerosis glomerular se considera una "fase terminal" del cambio glomerular, pero aquí se clasifica como aquellos que demuestran una progresiva fibrosis "activa" como glomerular "esclerosis".
- atrofia tubular se clasificó por el aumento de diámetro de la luz y/o aplanamiento del epitelio tubular renal, o la deserción de los túbulos.
- La infiltración intersticial se consideró como infiltrados inflamatorios.
- La vasculitis - Una definición más floja de la vasculitis a tener en cuenta como una patología vascular no inflamatoria (degenerativa/proliferativa). La mayoría de los cambios vasculares fueron leves y podrían ser considerados "arteriosclerosis", caracterizados por la proliferación de las

células del músculo liso, y la hialinización de la matriz extracelular. Este cambio puede reflejar la hipertensión secundaria a la patología glomerular. En muy pocos animales se manifestó "vasculitis". La mayoría de los cambios inflamatorios estaban dentro de las paredes de los vasos sanguíneos, con poco o ningún daño al endotelio, y no manifestaban fugas hemorragias/fibrinas. Muchos también tienen bordes perivasculares de los fibroblastos.

#### **Análisis Farmacodinámica (PD)**

Se recogieron el bazo y el riñón en el día 118 (modelo NZM) o el día 98 (modelo MRL/lpr) tres horas después de la administración de la dosis final y se congelaron rápidamente en hielo seco, se enfrió con isopenteno y se almacenaron a -80°C. Lisados del bazo y los riñones fueron procesados mediante el siguiente protocolo. Setecientos microlitros "tampón de extracción de tejido" generado por la combinación de cóctel inhibidor de la proteasa (Calbiochem, no. 539136) y la fosfatasa cóctel inhibidor de la fosfatasa (Thermo Scientific, no. 78420) o un cóctel Roche inhibidor de la fosfatasa (Roche, no. 04906837001) en el reactivo de extracción de tejido I (Invitrogen, no. FNN0071) se añadieron a cada muestra. Las muestras se congelaron homogeneizadas utilizando un homogeneizador Polytron PT 1035 (VWR, No 97036-082). Después de la homogeneización, la muestra se centrifugó a 4°C durante 2000 x g durante 10 minutos, el sobrenadante se volvió a centrifugar a 4°C a la velocidad máxima, 14000 x g, durante 15 minutos. Los sobrenadantes se retiraron cuidadosamente para evitar captación de la capa superior de escombros lípidos/adiposos. La concentración de proteína se ajustó a 3 mg/ml utilizando un ensayo de proteína BCA (Pierce, no 83228). Se analizó la actividad del bazo JAK/STAT (pSTAT1/3/5a/b), usando el kit de talón Luminex® 3-plex (Invitrogen). Ambos ensayos se realizaron según las instrucciones del fabricante.

#### **Análisis Farmacocinético (PK)**

Muestras del plasma, riñón y bazo se sometieron a un análisis cuantitativo para determinar las concentraciones de compuestos. Las muestras de sangre se recogieron en tubos heparinizados y se colocaron en hielo hasta que se centrifugaron (16.000 x g, 5 minutos) para separar el plasma. Se recogió el sobrenadante y se almacenó en un análisis en espera de -20°C. En el momento del análisis, se añadieron dos volúmenes de acetonitrilo frío que contenían un patrón interno (alprenolol) a cada muestra, las cuales fueron agitadas y centrifugadas. Se eliminó el sobrenadante, se colocaron en un vial auto-muestreador y la cantidad de compuesto presente en las muestras se analizó por cromatografía de líquidos/espectrometría de masas (LC- MS- MS). La concentración de compuesto en las muestras se cuantificó contra un vehículo solamente (es decir, el grupo del control del vehículo bien del bazo o de los riñones contra el grupo de vehículo de la cepa ensayada) curva estándar (específico del tejido) realizado a través de dilución en serie en un intervalo de concentración desde 5 hasta 20000 ng/mL. Las muestras que contienen concentraciones mayores del 10% por encima de la parte superior de la curva estándar se diluyeron a 1:10 con acetonitrilo. El límite de detección del plasma, riñón y bazo era <10 ng/mL.

#### **Los ensayos de ELISA de anticuerpos antinucleares (ANA)**

La determinación de los anticuerpos antígeno anti-dsDNA y anti-Smith se llevaron a cabo mediante un ensayo ELISA generado a medida internamente. Se adquirieron placas recubiertas de cromatina de Inova Diagnostics, Inc. Se utilizó bovino purificado de timo dsDNA (Sigma, St. Louis, MI) o bovina purificada Smith antígeno (Genway, San Diego, CA) como recubrimiento de antígeno para la detección de anticuerpos anti-dsDNA y anti-Smith Ag respectivamente. Las placas recubiertas se lavaron con bBorato de Sulfato de Saline (BSS) y se bloquearon con BSS que contenía 1% de Albúmina Sérica Bovina (BSA) y 0,1% de detergente de Tween- 20. Las curvas de calibración se generaron utilizando los anticuerpos anti-cromatina del ratón (Sigma, 2B1) ó de suero de MRL/lpr de 25 semanas de edad. Los anticuerpos anti-dsDNA de ratón (Abcam, Cambridge, MA), o los anticuerpos antígeno anti-Smith del ratón (Abcam) fueron utilizados como estándares para cada ensayo. El anticuerpo secundario fue adquirido de Abcam (anti-ratón pAb-HRP de cabra), el sustrato se adquirió de Rockland (Gilbertsville, PA) (TMB), y detuvo el tampón de reacción que se generó usando 1 ml de ácido sulfúrico concentrado en 20 ml de dH2O. Se leyeron placas desarrolladas usando un espectrofotómetro Victor-X4 a una lectura de 450 nM con una longitud de referencia de onda de 570 nM. Para todos los ensayos ANA ELISA, los valores por debajo del límite de detección establecido por el punto más bajo a lo largo de la norma o fijado por el fabricante se consideraron fuera de cobertura y no se estimaron, pero se asume que el punto más bajo a lo largo de la curva estándar para este ensayo en particular.

#### **Ensayos Elíspot de Anticuerpos Secretores de Células B**

Se encargaron componentes Elíspot de células B a Mabtech (Nacka Strand, Suecia) y las placas de filtro de nitrocelulosa IP fueron ordenadas a Millipore (Billerica, MA). Se recubrieron pocillos Elíspot con ADN de doble cadena de timo bovino purificado (Sigma), bovino purificado antígeno Smith (Genway) o cromatina de pollo purificado filtrado hervido de las células rojas de la sangre de pollo lisado (Rockland, Gilbertsville, PA) a 10 mg/mL. Los bazos se procesaron utilizando la homogeneización de vidrio, se filtró a través de un filtro de células estéril de 60 mm y los glóbulos rojos (GR) zadas utilizando BioLegend (San Diego, CA) tampón de lisis. Se añadieron esplenocitos procesados a cada pocillo en medio del cultivo. Para evitar el sesgo de verdaderos ex vivo de frecuencias de anticuerpos secretores de tipos de células (ASC), las células no se estimularon con un mitógeno

policlonal como LPS, sino más bien se incubaron en medio solo para permitir el control de la liberación genuina ex vivo de anticuerpos. El anti-ratón pan-IgG se utilizó como control positivo para el total de IgG productoras de ASCs y se utilizó para normalizar los resultados. En una fase de prueba inicial las frecuencias para cada antígeno fueron identificadas en cada modelo. Para la cromatina y el total de IgG solamente, se añadieron 30,000 esplenocitos a cada pocillo; para el antígeno de Smith y dsDNA, se añadieron 500,000 células a cada pocillo. Se añadieron diferentes cantidades de esplenocitos para diferentes antígenos, debido a los límites de saturación de frecuencias únicas por pocillo. Estos límites fueron establecidos previamente. Eliospot de células B se incubaron durante la noche a 37°C. Para desarrollar cada ensayo, se añadieron anticuerpos secundarios a cada pocillo, incubaron, se lavaron y se utilizó estreptavidina fosfatasa alcalina como el conjugado; el sustrato utilizado fue BCIP-NBT. Las placas se desarrollaron hasta que las manchas fueran visibles. Todos los análisis Elispot se realizaron utilizando un inmunoensayo escáner de C.T.L. y el software Biospot (celular Technology Ltd., Shaker Heights, OH). Los resultados se muestran como valores en los que los materiales y las células sólo los pocillos se substrajeron.

### **Análisis estadístico**

Todas las estadísticas se realizaron utilizando el software Graph Pad Prism 5.0. El final del estudio de los análisis se analizó utilizando dos colas de Mann-Whitney o pruebas t de estudiantes emparejados (datos de supervivencia) en las que se indica en la leyenda de Figura. Para gráficos que muestran cambios en el tiempo, de 1 vía ANOVA se utilizaron en la comparación entre grupos. Para cambios porcentuales entre los grupos en las comparaciones del área bajo la curva (AUC) se determinó para cada parámetro en comparación con el vehículo en la diferencia porcentual a menos que se indique lo contrario en las mediciones de EOS.

### **EJEMPLOS**

#### **Ejemplo 1. El COMPUESTO A trata con eficacia el lupus en ratones MRL/lpr**

##### **Protocolo**

Los ratones MRL/lpr primero fueron aleatorizados, hemorragias iniciales recogidas, y los pesos corporales registrados para las mediciones de la línea de base (**Fig. 1**). Todos los ratones eran marcados individualmente en la oreja y se controlaron durante todo el experimento (por ejemplo, "Grupo # -Cage carta-Ratón #", por lo que "3B5" = Grupo 3 (G3), jaula B, ratón 5 #). Los ratones fueron emparejados por edad y el tratamiento comenzó a las 6-8 semanas de edad. Se realizaron muestras de sangre de mejilla y de orina semanalmente durante todo el experimento. Los ratones fueron individualmente rastreados para varios parámetros que incluyen citoquinas y niveles de anticuerpos antinucleares, la proteinuria, la masa corporal, lymphomegaly, la salud general y la mortalidad. Todos los parámetros fueron evaluados cada dos meses, excepto la mortalidad que se controló diariamente. Todos los grupos estaban formados por un mínimo de al menos 10 a 12 ratones por grupo. Experimentos ex vivo incluyen el análisis de citometría de flujo de células plasmáticas, el complemento del suero C3 y niveles de anticuerpos antinucleares; proteína en la orina y leucocitos, perfiles de citoquinas en suero, patología histo renal, y la determinación de los niveles de compuestos (farmacocinética (PK)) en el bazo, el riñón y plasma. Los ratones fueron rastreados en una base individual. Para todos los datos, los ratones se agruparon en poblaciones y los datos graficados como mean±SEM. Se registraron observaciones bimensuales y los datos recogidos por cada grupo, excepto la mortalidad que se realizó a diario. Se analizaron las lecturas de etapa final como se describe en la sección Materiales y métodos (arriba) y en la **Fig. 1**. Para el tratamiento con el COMPUESTO A, los ratones fueron tratados con el COMPUESTO A en suspensión en PEG400 más 1% de DMSO proporcionado por vía oral (po) dos veces al día (bid) de 8 a 11 semanas de edad (es decir, para la dosis de 100 mg/kg, se administraron a los animales 100 mg/kg en AM y 100 mg/kg en PM), a continuación, se descansa sin tratamiento de 11 a 18 semanas de edad, después se vuelven a iniciar tratamientos farmacológicos p.o. del COMPUESTO A con dosificador b.i.d. en las tres semanas restantes hasta las 21 semanas de edad. El estándar de atención incluye dexametasona (DEX) previsto en 1,5 mg/kg, tres veces por semana, i.p. Vehículo fue PEG400 + 1% de DMSO administrado por vía oral dos veces al día, al mismo tiempo que el tratamiento de drogas del COMPUESTO A. El análisis farmacocinético de la retención de tejido para este modelo se puede encontrar en la **Fig. 2**. Es de destacar que con respecto a la **Fig. 2** es que el nivel de COMPUESTO A en el riñón fue similar al nivel de exposición del plasma. Esto es importante debido a que el riñón es un sitio importante en la patología de la enfermedad de lupus.

##### **Lymphomegalia, esplenomegalia, y el recuento de leucocitos**

Los ratones MRL/lpr tratados con el COMPUESTO A presentaron menor lymphomegalia en 55 mg/kg y 100 mg/kg, pero no en 30 mg/kg, dosis (100% sin lymphomegalia de 100 y 55 mg/kg, 0% para el vehículo;  $p < 0,05$ ) (**Fig. 3**). Los ratones MRL/lpr tratados con el COMPUESTO A mostraron esplenomegalia (es decir, la masa bazo) en dosis de 100 mg/kg y 55 mg/kg ( $p < 0,001$  y  $p < 0,05$ , respectivamente) en comparación con el vehículo (49,4% de disminución de 55 mg/kg y 74,1% de disminución de 100 mg/kg frente a el vehículo) (**Fig. 4**, panel superior). A 100 mg/kg, el COMPUESTO A disminuye la masa del bazo hasta el nivel de un animal de control de no lupus (MRL/Mp; 98 mg) (**Fig. 4**, panel superior). Los ratones MRL/lpr tratados con el COMPUESTO A presentaron un menor recuento de leucocitos totales en comparación con el vehículo tanto en dosis de 55 mg/kg como en 100 mg/kg ( $p < 0,05$ ), pero no tan bajo como en animales MRL/Mp de no lupus (**Fig. 4**, panel inferior).

Estos resultados son importantes porque la esplenomegalia (hinchazón del bazo), la lymphomegalia (hinchazón de ganglios linfáticos), y la hiperproliferación de las células T y B son indicativos de la enfermedad de lupus en ratones MRL/lpr. Por lo tanto, la reducción en el número de linfocitos en general, y por lo tanto el tamaño del bazo y de los ganglios linfáticos, indican que el COMPUESTO A controla parcialmente las respuestas autoinmunes sistémicas durante el tratamiento. Por otra parte, el hecho de que la masa del bazo y el número total de células no caen por debajo de los controles históricos de no lupus sugiere que el COMPUESTO A no causó una inmunosupresión abierta, lo que podría esperarse de un bloqueo completo de quinasa JAK. Por lo tanto, el COMPUESTO A es ventajoso ya que proporciona un efecto terapéutico deseable sin efectos secundarios desfavorables.

**Tolerabilidad**

Los ratones MRL/ pr tratados con el COMPUESTO A no exhibieron cambios significativos en la masa corporal (**Fig. 5**). Para cada dosis testada no se observó una manifestación de toxicidad, y de hecho la masa corporal aumentó, lo que sugiere una mejora en la salud general en comparación con el vehículo.

**IL-12**

Los ratones MRL/lpr tratados con el COMPUESTO A exhibieron una caída de los niveles de citoquinas IL-12 durante las fases de tratamiento de 8-11 semanas de edad y de 18-21 semanas de edad, pero el aumento del nivel de tratamiento durante los días festivos, de 12-20 semanas de edad (**Fig. 6**; \* p< 0,05, \*\* p< 0,01; 56,1% de disminución de 100 mg/kg y 50,7% de disminución de 55 mg/kg en comparación con el vehículo).

Estos datos son importantes, ya que apoya la conclusión de que las cascadas inflamatorias de citoquinas en bloques del COMPUESTO A implicadas en el lupus, tales como IL-12.

**C3**

Los ratones MRL/lpr tratados con el COMPUESTO A muestran un significativo aumento de la concentración de C3 en suero relativa al vehículo en la dosis de 55 mg/kg y 100 mg/kg (aumento del 52,5% para 100 mg/kg y el aumento del 51,4% para 55 mg/kg a lo largo del vehículo; p< 0,05) (**Fig. 7** ). Estos datos son importantes porque el nivel de C3 en el suero se correlaciona indirectamente con la magnitud o extensión de la inflamación.

Pacientes con LES muestran niveles reducidos de C3 y C4 en el tiempo, lo que es indicativo de un aumento de la inflamación sistémica, lo que resultan daños en los tejidos de los órganos. Pero con el tratamiento estos factores de rebote, indican que el tratamiento esta reduciendo la inflamación sistémica y por lo tanto el tratamiento efectivo de la enfermedad. Por lo tanto, un aumento de C3 en suero es indicativo de la resolución de la enfermedad lupus y el tratamiento (Boumpas, Furie et al. 2003).

**Nefritis lúpica**

La etapa terminal de nefritis lúpica fue evaluada por la histopatología y anotada por un patólogo certificado por el consejo para la evaluación de los daños renales totales en los animales afectados (**Figura 8**; . **Tabla 1**). Los ratones MRL/lpr tratados con el COMPUESTO A mostraron disminuciones en tanto infiltraciones/glomerulonefritis celulares y el tamaño glomerular en hematoxilina y eosina (H&E) secciones renales manchadas en comparación con ambos grupos de dexametasona y el vehículo de tratamiento (**Fig. 8**). Los ratones MRL/lpr tratados con el COMPUESTO A mostraron reducciones significativas en la celularidad glomerular (33,3 % de disminución; p< 0,01), la infiltración intersticial (40 % de reducción ; p< 0,01) y vasculitis ( 46,1 % de disminución ; p < 0,01 ) en comparación con los vehículos a la dosis 100 mg/kg, similar a la dexametasona (**Tabla 1**). A la dosis de 55 mg/kg, el COMPUESTO A redujo la infiltración intersticial (33,3% de disminución, p< 0,05) en comparación con vehículo (**Tabla 1**).

Estos resultados son importantes porque muestran que el tratamiento de ratones MRL/lpr con el COMPUESTO A pueden ralentizar y/o prevenir el desarrollo de la nefritis lúpica en ratones propensos al lupus.

Tabla 1. MRL/lpr Puntuación riñón (grado puntuación: 0-5; media $\pm$ 6SD)

Grupo	Celularidad Glomerular	Necrosis Glomerular	Glomerulosclerosis	Infiltración Intersticial	Atrofia Tubular	Fibrosis Intersticial	Vasculitis
Vehículo	3.60 +/- 0.55	2.60 +/- 0.55	2.40 +/- 0.89	3.00 +/- 0.71	2.00 +/- 0.00	2.00 +/- 0.00	2.60 +/- 0.55
COMPONENTE A 30 mg/kg	2.60 +/- 0.55 <sup>1</sup>	1.80 +/- 0.45	1.60 +/- 0.55	2.20 +/- 0.45	1.20 +/- 0.45	1.60 +/- 0.55	1.80 +/- 0.45
COMPONENTE A 55 mg/kg	3.20 +/- 0.45	1.80 +/- 0.45	2.00 +/- 0.00	2.00 +/- 0.71 <sup>1</sup>	2.20 +/- 0.45	1.20 +/- 0.45	2.00 +/- 0.00
COMPONENTE A 100 mg/kg	2.40 +/- 0.55 <sup>2</sup>	1.8 +/- 0.45	2.20 +/- 0.84	1.80 +/- 0.84 <sup>2</sup>	1.40 +/- 0.55	1.40 +/- 0.55	1.40 +/- 0.55 <sup>2</sup>
Dex 1.5 mg/kg	3.00 +/- 0.71	2.00 +/- 0.00	2.00 +/- 0.00	1.60 +/- 0.55 <sup>3</sup>	1.20 +/- 0.45	1.20 +/- 0.45	1.40 +/- 0.55 <sup>2</sup>
Comparado a Vehículo	<sup>1</sup> p<0.05	<sup>2</sup> p<0.01	<sup>3</sup> p<0.001	1-forma ANOVA			

### Pharmacodynamics

La inhibición de fosforilada STAT-3 (pSTAT3) se utilizó como un marcador de derivadas farmacodinámico (PD) de la inhibición de JAK2. Se observaron reducciones significativas renales pSTAT3 tanto en dosis de 55 mg/kg y 100 mg/kg del COMPUESTO A en ratones MRL/lpr cuatro horas después de la dosis final del fármaco en el fin de estudio (EOS) el día 147 de edad (día 91 de estudio) (Fig. 9).

Este dato es importante porque muestra que el COMPUESTO A inhibía eficazmente JAK2 en un lugar de particular importancia para el lupus - el riñón.

### Células plasmáticas

Los ratones MRL/lpr tratados con el COMPUESTO A mostraron una disminución de las células plasmáticas del bazo en dosis de 100 mg/kg en comparación con el vehículo (65,5% de disminución, p< 0,01) (Fig. 10). Los ratones MRL/lpr tratados con el COMPUESTO A exhibieron reducidas frecuencias de células secretoras de anticuerpos anti-cromatina (ASC) en el bazo a la dosis de 100 mg/kg en comparación con el vehículo (89,1% de disminución, p< 0,001) (Fig. 11).

Este dato es importante porque las células plasmáticas son responsables de la generación de autoanticuerpos, y se cree que las células plasmáticas de larga vida son una de las raíces de los propagadores de la continuación de la patogénesis del lupus en seres humanos (Espeli, Bokers et al.; Neubert, Meister et al. 2008). Las células de plasma de larga vida (LL-PC) pueblan principalmente la médula ósea (BM), pero también se pueden encontrar en el bazo en sitios de inflamación, y son conocidas por ser resistentes a la ciclofosfamida, una terapia aceptada para el tratamiento de la nefritis lúpica (Chevrier, Genton et al., 2009).

### Ejemplo 2. El COMPUESTO A trata con eficacia el lupus en ratones NZM

#### Protocolo

Los ratones de una edad acoplada, femeninos, NZM o NZW/LacJ, fueron madurados para el estudio de la nefritis lúpica en un total de 7 meses o 210 días en la que la orina fue recogida el tiempo para una detección de la proteinuria. Los ratones con 0.5-1.0 mg/ml de proteína en la orina según lo determinado por un ensayo de precipitación de proteína total basada en la densidad óptica y comprobado a 30-300 mg/dl de proteína como se determina mediante un ensayo de palo se consideraron proteinuria positiva y seleccionado para un estudio entrada. Se normalizaron grupos para contener una distribución de Gauss de la proteinuria en animales positivos (es decir, 1/3 bajo la proteinuria, 1/3 medio, 1/3 de altura) y luego distribuidos al azar entre los grupos antes de la marca de lado y tomando las medidas de referencia, incluyendo las colecciones de orina y suero. Un total de cinco ratones de la población total fueron seleccionados al azar para la evaluación de la histología renal basal. Tratamientos y ensayos para cada grupo se describen en la Fig. 12. En resumen, con un mínimo de 10 ratones por grupo, se administró el COMPUESTO A a 100 mg/kg o 55 mg/kg, ambas dos veces al día y por vía oral. Para los estándares de cuidado, se proporcionó ciclofosfamida (CTX) a 50 mg/kg, una vez por semana, proporcionado ip y dexametasona a 1,5 mg/kg, tres veces a la semana, ip. El vehículo incluyó DMSO al 3%, 10 % y 87% Solutol PBS. Los tratamientos se iniciaron en el día de edad, 212, algunos ratones murieron poco después del tratamiento, pero todos los animales, independientemente del estado de salud se contaron en contra del tamaño total del grupo del

momento de la dosificación. Nefritis lúpica en etapa terminal fue evaluada por histopatología y anotada por un patólogo certificado por el consejo para la evaluación del total del daño renal en los animales afectados utilizando el método de puntuación descrito por Smith et al (Smith, Dong et al., 2007). Es importante señalar, que todas las gráficas mostradas en las figuras relevantes muestran día 0 como el "inicio del tratamiento" y por lo tanto representa 212 días de edad. El día-98 o "final del tratamiento/estudio" representa 310 días de edad para los animales NZM. Todos los gráficos muestran el tiempo como "día de estudio" con el día de estudio empezando en 212 días de edad y terminando a 310 días de edad.

### **Supervivencia**

Los ratones NZM tratados con el COMPUESTO A exhibieron significativamente un aumento de la supervivencia relativo al vehículo en dosis de 55 mg/kg y 100 mg/kg (70% de supervivencia de 100 mg/kg y 90% de supervivencia de 55 mg/kg en EOS;  $p < 0,01$ ). La supervivencia fue comparada al estándar del agente de cuidado CTX (70% de supervivencia a EOS;  $p < 0,001$ ) (**Fig. 13**). Junto con el MMF y la azatioprina, la ciclofosfamida es una opción de tratamiento actual para los pacientes que sufren de nefritis lúpica, ya que actúa como un potente agente inmunosupresor, sin embargo, debido a sus graves efectos secundarios sólo se utiliza en los casos más graves.

### **Anticuerpos antinucleares (ANA)**

Los ratones NZM tratados con el COMPUESTO A exhibieron niveles totales reducidos de suero anti-dsDNA ANAs durante todo el curso de la enfermedad (73,9% de disminución de 100 mg/kg, 67,0% de disminución de 55 mg/kg en comparación con el vehículo;  $p < 0,01$ ). Reducción en anti-dsDNA ANAs por el COMPUESTO A fue a la par con el estándar del agente de cuidado CTX (65,3% de disminución en comparación con el vehículo;  $p < 0,001$ ) (**Fig. 14**). El tratamiento con el COMPUESTO A (y CTX) también redujo significativamente el antígeno anti-Smith ANA ( $p < 0,05$ ) (**Fig. 15**).

Este dato es importante porque la presencia de anticuerpos anti-dsDNA se asocia con un pobre pronóstico del lupus y está fuertemente asociado con el desarrollo, y a menudo fatal, la nefritis lúpica (Egner 2000; Kiss, Lakos et al., 2009).

### **IFN $\alpha$**

Los ratones NZM tratados con el COMPUESTO A presentaron una modesta pero significativa reducción de IFN $\alpha$  en suero en comparación con el vehículo (73,2% de disminución de 100 mg/kg y 70,2% de disminución de 55 mg/kg;  $p < 0,05$ ) (**Fig. 16**). Ni el nivel de agente de cuidado (es decir, CTX o DEX) mostró una reducción significativa.

Estos datos son importantes porque el tipo de citoquinas I IFN, IFN $\alpha$ , han sido fuertemente ligadas a la patogénesis del lupus y es una de las primeras rupturas de citoquinas que conducen a manifestaciones de lupus en seres humanos (Niewold, Hua et al. 2007). De hecho, actualmente las terapias de lupus se están desarrollando para que específicamente el IFN $\alpha$  se enfoquen en neutralizar IFN $\alpha$  circulante en pacientes con lupus (por ejemplo, MedImmune, MEDI -545). Una disminución de esta 'firma IFN $\alpha$ ' en pacientes con lupus es un biomarcador utilizado para determinar la eficacia de un medicamento experimental probado (Sozzani, Bosisio et al.).

### **La Proteinuria**

Los ratones NZM tratados con el COMPUESTO A mostraron significativamente la proteína en la orina total reducida durante el curso de la enfermedad para ambos grupos de tratamiento, 55 mg/kg y 100 mg/kg, con respecto al vehículo (76,25 disminución y 81,8 % de disminución en comparación con el vehículo respectivamente;  $p < 0,001$ ). (**Fig. 17**). La reducción fue comparable al nivel de agente de cuidado CTX (67,1% de disminución;  $p < 0,001$ ). Los datos para cada ratón en cada grupo de tratamiento se muestra en las **figuras 18A a 18E**. Los ratones NZM tratados con el COMPUESTO A presentaron una menor proteinuria en comparación con el DEX o el vehículo (magnitud por ejemplo, menos variable y duración de la respuesta), comparable a CTX. El tratamiento con el COMPUESTO A llevó los niveles de proteína por debajo de los niveles de proteína de ratones de control sin lupus, de la misma edad (**Fig. 17**; Línea de puntos).

Estos resultados son importantes porque un aumento de proteínas en la orina (proteinuria) es el resultado directo del daño renal asociado con nefritis lúpica. Por otra parte, el hecho de que el COMPUESTO A redujera los niveles de proteína en la orina por debajo de los niveles históricos de los animales de control sin lupus indica que el COMPUESTO A no se limitara simplemente a la protección de los animales del avance de la enfermedad, sino que en realidad fuera la reversión de la enfermedad del lupus.

### **Glomerulonefritis, Daños del Pulmón**

Los ratones NZM tratados con el COMPUESTO A mostraron una disminución de la celularidad glomerular en las dosis de 55 mg/kg y 100 mg/kg en comparación con el vehículo (59,3 % de disminución y 56,2 % de disminución, respectivamente;  $p < 0,001$ ) (**Tabla 2**). Los ratones NZM tratados con el COMPUESTO A en las dosis de 55 mg/kg y 100 mg/kg mostraron una disminución de fibrosis intersticial y vasculitis en comparación con el vehículo (58,3% y 8,3% de disminución, respectivamente;  $p < 0,05$ ) (**Tabla 2**). Los ratones NZM tratados con el COMPUESTO A mostraron una disminución de las patologías renales, comparables a los de un control parental emparejados por edad de no-enfermedad NZW/LacJ (**Fig. 19**). Los ratones NZM tratados con el COMPUESTO A en la dosis de 55 mg/kg y 100 mg/kg (y CTX) previno de infiltraciones pulmonares en comparación con la dexametasona y el vehículo

en los animales tratados (Fig. 20).

**Tabla 2. Puntuaciones Renales NZM (grado puntuación: 0-5; mean±6SD)**

Grupo	Celularidad Glomerular	Necrosis Glomerular	Glomerulosclerosis	Infiltración Intersticial	Atrofia Tubular	Fibrosis Intersticial	Vasculitis
Vehículo	3.22 ± 0.83	2.11±/0.60	2.55±/1.33	2.44±/1.33	2.66±/1.22	2.44±/1.33	1.20±/0.44
COMPONENTE A 55 mg/kg	1.33±/0.50 <sup>3</sup>	1.22±/0.44	1.00±/0.0 <sup>1</sup>	1.11±/0.33	1.22±/0.44	1.0±/0.0 <sup>1</sup>	1.11±/0.33 <sup>1</sup>
COMPONENTE A 100 mg/kg	1.44±/0.52 <sup>3</sup>	1.44±/0.72	1.22±/0.66	1.22±/0.44	1.33±/0.50	1.22±/0.44	1.44±/0.52
CTX 50 mg/kg	2.0±/0.70 <sup>1</sup>	1.77±/0.83	2.11±/1.16	1.55±/1.01	2.00±/1.32	1.55 ±/1.01	1.33±/0.50
Dex 1.5 mg/kg	3.0±/0.81	3.0±/0.81	3.42±/1.27	2.71±/0.47	3.14±/1.46	2.71±/1.25	2.42±/1.13
Referencia NZM 8mos	2.50±/1.00	1.50±/0.57	2.00±/0.81	1.50±/1.00	2.00±/1.41	2.00±/1.41	1.75±/0.50
Control sin lupus	1.40±/0.89 <sup>2</sup>	1.20±/0.44	1.20±/0.44	1.20±/0.44	1.40±/0.89	1.20±/0.44	1.20±/0.44
Comparado a Vehículo	<sup>1</sup> p<0.05	<sup>1</sup> p<0.01	<sup>3</sup> p<0.001	2-forma ANOVA			

Estos datos son importantes porque la celularidad glomerular, la fibrosis intersticial y la vasculitis son indicadores de la glomerulonefritis asociada con el lupus. El hecho de que el COMPUESTO A no fuera solo capaz de prevenir un aumento de estos factores, sino de reducirlos en comparación con los ratones estándares NZM de 7 meses, indica que el COMPUESTO A se va más allá de la mera protección en los animales de la progresión de la enfermedad y de hecho de la inversión del curso de la enfermedad. Además, el edema pulmonar o la vasculitis pulmonar y los derrames de la pleura pueden conducir a complicaciones respiratorias superiores tales como neumonía. La capacidad del COMPUESTO A para la prevención de vasculitis pulmonar y la inflamación es una ventaja de la presente invención, ya que estos son complicaciones comunes de la enfermedad del lupus.

### Farmacodinámica

Usando el marcador farmacodinámico de fósforo-STAT3 para la inhibición de JAK2, los niveles de pSTAT3 en los riñones de ratones tratados fueron significativamente más bajos que los de cualquiera de los vehículos o CTX (cambio %; p<0,01) (Fig. 21).

Este dato es importante porque muestra que el COMPUESTO A inhibía eficazmente JAK2 en un lugar de particular importancia en el lupus - el riñón.

### Citoquinas

Los ratones NZM tratados con el COMPUESTO A mostraron una significativa reducción de los niveles séricos de varias citocinas asociadas con la progresión del lupus en comparación con el vehículo (Figuras 22-31). Por ejemplo, las dosis de 55 mg/kg y 100 mg/kg del COMPUESTO A redujo significativamente la IL-12 (99,4% y 99,9% de disminución; p<0,001) (Fig. 22), IL-17A (79,1% y 86,2% de disminución; p<0,001) (Fig. 23), IL-6 (98,2% y 97,0% de disminución; p<0,001) (Fig. 24), CCL3/MIP-1α (94,5% de disminución para ambas dosis; p<0,01) (Fig. 25), CXCL10/IP-10 (47,3% y 80,0% de disminución; p<0,01) (Fig. 26), CXCL9/MIG (83,7% y 85,7% de disminución; p<0,001) (Fig. 27), IL-4 (98,7% y 91,8% de disminución; p<0,01) (Fig. 28), IL-13 (86,2% y 79,5% de disminución; p<0,001) (Fig. 29), TNFα (92,3% y 88,3% de disminución; p<0,001) (Fig. 30), y KC/IL-8 (78,0% y 72,9% de disminución; p<0,001) (Fig. 31) en comparación con el vehículo.

Estos resultados son importantes porque estas citoquinas son elevadas en pacientes con lupus, y están involucradas en el aumento de los brotes de lupus y la respuesta inmune en curso para que los antígenos propios perpetúen la enfermedad (Chun, Chung et al. 2007; Tucci, Lombardi et al. 2008). La reducción o la modulación en estos perfiles de citoquinas puede proporcionar un beneficio favorable en los pacientes y proporciona un indicador indirecto de la resolución de la enfermedad. (Morimoto, Tokano et al. 2001; Aringer y Smolen 2004; Chun, Chung et al. 2007; Niewold, Hua et al. 2007; Fu, Chen et al. 2008 ; Tucci, Lombardi et al. 2008).

### Esplenomegalia

Los ratones NZM tratados con el COMPUESTO A mostraron una significativa reducción total del estudio final de la masa del bazo (EOS) en comparación con los vehículos (73,5% de disminución en 100 mg/kg y 71,8% de disminución en 55 mg/kg;  $p < 0,001$ ). (Fig. 32). La disminución en las masas del bazo observada en el COMPUESTO A era comparable a CTX.

Estos datos son importantes porque la esplenomegalia (hinchazón del bazo) es un indicativo de la enfermedad del lupus en ratones NZM.

### **Tolerabilidad**

Los ratones NZM tratados con el COMPUESTO A no exhibieron ningún cambio en la masa corporal en cualquiera de las dosis (Fig. 33).

### **Actividad de los Osteoclastos**

Los ratones NZM tratados con el COMPUESTO A mostraron una significativa reducción en la resorción ósea como se mide usando un biomarcador de actividad de los osteoclastos (es decir, c-telopéptido de colágeno tipo I reticulante; CTx) (Bouزيد, Bahlous et al.). El COMPUESTO A reduce los niveles de CTx en suero en los ratones NZM tratados (46,7% de disminución en 100 mg/kg y 37,8% de disminución en 55 mg/kg de vs. vehículo;  $p < 0,01$ ) (Fig 34).

Este dato es importante porque sugiere que el COMPUESTO A puede afectar a la actividad de los osteoclastos y/o afectar las citoquinas implicadas en la remodelación ósea durante enfermedades inflamatorias crónicas tales como SLE. La capacidad del COMPUESTO A para reducir la actividad de los osteoclastos es importante porque la actividad de los osteoclastos es mayor durante el lupus, lo que provoca la desmineralización ósea y la pérdida general de masa ósea, lo que lleva a un aumento de las fracturas, lesiones y la necesidad de reemplazo de articulaciones. (Kamen y Alele) El estándar de cuidado para el tratamiento del lupus, glucocorticoides tales como dexametasona, metilprednisolona y prednisona, puede exacerbar este problema y, además, llevar a la pérdida ósea mediante el desequilibrio de los osteoclastos sobre la actividad celular de osteoblastos (Cunningham 2007). Consecuentemente, los pacientes de lupus con la desmineralización ósea son a menudo tratados con bisfosfonatos para restaurar la pérdida del hueso; pero este tratamiento es tóxico para el sistema renal y por lo tanto son contraproducentes en el tratamiento de pacientes de lupus con el desarrollo de la nefritis lúpica (Body, Diel et al. 2004). Así, la capacidad del COMPUESTO A para tratar el lupus y también reducir la actividad de los osteoclastos podría revertir la pérdida ósea asociada a lupus y de hecho puede ayudar a la reparación de daños en las articulaciones causados por la enfermedad.

### **Células de Plasma**

Los ratones NZM tratados con el COMPUESTO A mostraron una reducción en las células plasmáticas del bazo, en ambas dosis de 100 mg/kg y 55 mg/kg en comparación con el vehículo (52,9% y 57,6% de disminución,  $p < 0,05$ ), y la reducción proporcionada por el COMPUESTO A fue similar a los animales de control sin lupus (58,4% de disminución;  $p < 0,05$ ) (Fig. 35). Los ratones NZM tratados con el COMPUESTO A mostraron una disminución en la expresión del ciclico hidrolasa ribosa ADP, CD38, en ambas dosis de 100 mg/kg y 55 mg/kg al nivel de los ratones de control sin lupus (74,2% y 66,6% de disminución;  $p < 0,05$ ) (Fig. 37). Aunque tanto la dexametasona y la ciclofosfamida también redujeron los niveles de las células plasmáticas del bazo, la disminución no fue significativa (Fig. 35). Los ratones NZM tratados con el COMPUESTO A mostraron una reducción de niveles de ASC específicos de la cromatina, a la par con la ciclofosfamida (97,4% de disminución de 55 mg/kg y 100% de disminución de 100 mg/kg frente a 100 % de disminución de CTX;  $p < 0,05$ ) (Fig. 36).

Estos datos son importantes porque las células de plasma son responsables de la generación de autoanticuerpos, y se cree que las células plasmáticas longevas son una de las raíces de propagación de la continuación de la patogénesis del lupus en seres humanos (Neubert, Meister et al. 2008). Las células de plasma longevas (LL-PC) se encuentran principalmente en la médula ósea (BM), pero también se pueden encontrar en el bazo en sitios de inflamación, y son conocidas por ser resistentes a la ciclofosfamida, una terapia aceptada para el tratamiento de la nefritis lúpica (Alperovich, Rama et al. 2007; Houssiau y Ginzler 2008; Lacotte, Dumortier et al. 2010). La capacidad del COMPUESTO A para reducir los niveles de células de plasma longevas es importante porque estas células son difíciles de matar, son por lo general quimio- y radio- resistentes, pueden sobrevivir durante muchas décadas dentro de la arquitectura de la médula ósea, y producir la mayoría de autoanticuerpos durante el lupus. También es importante tener en cuenta que las proporciones de células plasmáticas del bazo no descienden por debajo de la de los ratones de control sin lupus, sino más bien a un nivel comparable, lo que sugiere que el bloqueo de JAK2 con el COMPUESTO A restaura las proporciones normales de las frecuencias de células plasmáticas a la de un ratón de control emparejado de edad normal.

### **Resumen**

El ratón en cambios de ratón individual y el resumen de todos los resultados histopatológicos se puede encontrar en la **Tabla 3**. Como muestra la **Tabla 3**, la supervivencia se correlaciona bien con los cambios marcados en la puntuación renal, los niveles de anti-ADN ANA de doble cadena, y la proteinuria. Estos resultados demuestran claramente la capacidad del COMPUESTO A para tratar el lupus mediante la protección de los animales de la

progresión de la enfermedad, e incluso revertir el curso de la enfermedad lupus.

**Tabla 3. Resultados NZM integrales**

<b>A: Anti-dsDNA IgG,                      B: Celularidad Glomerular,                      C: Necrosis Glomerular,</b> <b>D: Esclerosis Glomerular,                      E: Infiltración Intersticial                      F: Atrofia Tubular,</b> <b>G: Fibrosis Intersticial,                      H: Vasculitis,                      I: Proteinuria</b>											
<b>Grupo</b>	<b>Ratón</b>	<b>Edad (d)</b>	<b>A</b>	<b>B</b>	<b>C</b>	<b>D</b>	<b>E</b>	<b>F</b>	<b>G</b>	<b>H</b>	<b>I</b>
<b>Control Parental</b>	NZW/ LacJ-1	310	54.1	-	-	-	-	-	-	-	1.51
	NZW/ LacJ-2	310	125.0	-	-	-	-	-	-	-	1.61

5

<b>Grupo</b>	<b>Ratón</b>	<b>Edad (d)</b>	<b>A</b>	<b>B</b>	<b>C</b>	<b>D</b>	<b>E</b>	<b>F</b>	<b>G</b>	<b>H</b>	<b>I</b>
	NZW/ LacJ-3	310	27.8	-	-	-	-	-	-	-	1.76
	NZW/ LacJ-4	310	65.9	-	-	-	-	-	-	-	1.00
<b>MEAN 6SD</b>		<b>310 60.0</b>	<b>68.2 641.0</b>	-	-	-	-	-	-	-	<b>1.47 60.32</b>
<b>Vehículo</b>	9A1	212	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	3.58
	9A2	240	51.4	++	+	-	-	-	-	+	8.64
	9A3	310	32.0	++	+	+++	+++	+++	+++	+	1.64
	9A4	268	ND	+++	+	+	-	++	+	-	13.44
	9A5	310	16.7	+	-	-	-	-	-	+	0.85
	9B1	310	95.2	ND	2.04						

ES 2 582 465 T3

	9B2	240	27.0	++	+	++	+	++	++	++	<b>8.63</b>
	9B3	310	253.2	+	+	-	+	+	-	+	<b>1.17</b>
	9B4	227	ND	+++	++	+++	+++	+++	+++	++	<b>12.67</b>
	9B5	227	57.0	+++	++	++	++	+	+	+	<b>7.48</b>
	9C1	310	214.8	+++	+	+++	+++	+++	+++	++	<b>1.30</b>
<b>MEAN 6SD</b>		<b>269.5</b> <b>641.0</b>	<b>93.4</b> <b>690.5</b>								<b>5.58</b> <b>64.7</b>
<b>Grupo</b>	<b>Ratón</b>	<b>Edad</b> <b>(d)</b>	<b>A</b>	<b>B</b>	<b>C</b>	<b>D</b>	<b>E</b>	<b>F</b>	<b>G</b>	<b>H</b>	<b>I</b>
<b>CMPD A 100</b>											
<b>mpk bid</b>	3A1	310	13.4	-	-	-	-	-	-	-	0.48
	3A2	310	18.2	-	+	-	+	+	+	-	0.55
	3A3	310	9.6	-	-	-	-	-	-	-	0.70
	3A4	268	13.8	-	-	-	-	-	-	-	0.53
	3A5	268	11.5	-	-	-	-	-	-	-	0.44
	3B1	310	6.6	+	+	-	-	+	-	+	0.11
	3B2	310	20.5	+	++	++	-	+	+	+	0.00
	3B3	310	5.1	+	-	-	-	-	-	+	0.00
	3B4	310	26.5	+	-	-	+	-	-	+	0.00
	3B5	212	19.2	ND	<b>10.39</b>						
<b>MEAN 6SD</b>		<b>291.8</b> <b>633.0</b>	<b>14.4</b> <b>66.6**</b>								<b>1.32</b> <b>63.1**</b>
<b>CMPD A 55</b>											
<b>mpk bid</b>	4A1	310	20.6	+	-	-	-	+	-	-	0.41
	4A2	212	39.4	ND	0.41						
	4A3	310	9.4	+	+	-	-	-	-	-	0.50
	4A4	310	12.6	+	+	-	-	-	-	-	0.74
	4A5	310	12.7	-	-	-	-	-	-	-	0.48
	4B1	310	7.5	-	-	-	-	-	-	-	0.52
	4B2	310	15.2	-	-	-	-	-	-	-	1.11

ES 2 582 465 T3

	4B3	310	16.7	-	-	-	-	-	-	-	-	0.37
	4B4	310	19.3	-	-	-	-	-	-	-	+	0.61
	4B5	310	10.8	-	-	-	-	-	-	-	-	0.48
		<b>300.2</b>	<b>16.4</b>									<b>0.56</b>
<b>MEAN 6SD</b>		<b>630.9</b>	<b>69.0**</b>									<b>60.22***</b>
<b>CTX 50 mpk</b>												
<b>1x wk</b>	7A1	227	13.4	++	++	+++	+	++++	+++	+		<b>11.09</b>
	7A2	310	6.9	+	-	-	-	-	-	-	-	0.86
	7A3	310	22.2	+	+	++	-	+	-	-	-	<b>1.44</b>

Grupo	Ratón	Edad		A	B	C	D	E	F	G	H	I
		(d)										
	7A4	310	13.2	++	+	++	+++	++	+	-	-	0.76
	7A5	310	40.3	+	-	++	-	-	+	-	-	<b>1.30</b>
	7B1	310	9.6	+	++	+	-	-	-	-	+	0.71
	7B2	212	65.1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	8.84
	7B3	310	52.4	+	+	-	-	+	-	-	-	0.96
	7B4	240	24.3	-	-	-	+	+	-	-	-	0.58
	7B5	310	61.9	-	-	-	-	-	-	-	+	<b>1.50</b>
<b>MEAN 6SD</b>		<b>284.9</b>	<b>30.9</b>									<b>2.8 63.8</b>
<b>Dex 1.5 mpk</b>												
<b>3x wk</b>	8A1	291	27.2	++	++	+++	++	+++	+++	+		<b>8.43</b>
	8A2	212	18.9									<b>10.19</b>
	8A3	291	20.0	++	++	+++	++	+++	++	+		<b>11.02</b>
	8A4	240	79.5	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	<b>8.47</b>
	8A5	268	167.5	+	+	-	-	-	-	-	-	0.35
	8B1	240	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	<b>10.19</b>
	8B2	212	27.8	++	++	+++	++	+++	++	+		<b>7.16</b>
	8B3	310	16.2	+	+	++	-	-	-	+		0.55
	8B4	310	10.9	+++	+++	++	+++	+++	++	+++		<b>12.36</b>
	8B5	240	17.1	+++	+++	++++	+++	+++	+++	+++		<b>9.89</b>
		<b>261.4</b>	<b>42.7</b>									<b>7.86</b>

MEAN 6SD		637.6	651.0							64.1
----------	--	-------	-------	--	--	--	--	--	--	------

\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  vs. Vehículo, dos-colas Mann-Whitney *t*-test  
*Proteinura* "0.00" = BQL,  $x > 1$  mg/mL en **negrita**

Calificación = '-' sin enfermedad (1), '+' leve (2), '++' moderado (3), '+++' alto (4), '++++' enfermedad grave (5)

5

### Ejemplo 3. El COMPUESTO A reduce la frecuencia patógena en la médula ósea de células plasmáticas de larga vida, resistentes a radio/quimioterapia, que promueven el lupus.

Los ratones NZM propensos al lupus de quince semanas de edad fueron administrados de 100, 55, o 30 mg/kg del COMPUESTO A por vía oral, b.i.d., estándar de referencia de cuidado del agente de ciclofosfamida a 50 mg/kg, una vez a la semana, i.p. en solución salina, o vehículo (PEG400), por vía oral, b.i.d., por un total de dos semanas. Veinticuatro horas antes del final del estudio se inyectó i.p. a cada ratón con 2 mg de análogo de timidina, bromodesoxiuridina (BrdU). BrdU (Cat # 550891) y un kit de tinción de anti- BrdU-FITC (Cat # 559619) se obtuvieron de BD Biosciences (Franklin Lakes, NJ). Veinticuatro horas después de la inyección BrdU en el bazo y la médula ósea se procesaron individualmente para aislar los leucocitos en la tinción del flujo. Las células se tiñeron con superficie anti-CD19-Cyc, anti-CD38PE y anti-CD138-APC (todos obtenidos de eBioscience en San Diego, CA), así como anti-BrdU-FITC (del kit de BrdU). El análisis incluyó la compuerta en poblaciones vivas SSC/FSC, CD19-negativas, CD38-positivo y la compuerta de CD138-positivo, BrdU-negativos (no el ciclismo, las células plasmáticas de larga vida, región R2) o BrdU-positivas (ciclismo, a corto células plasmáticas vivido, región R1) como se muestra en la **Fig. 42**. Todas las muestras se analizaron usando un citómetro de flujo Accuri C6. Se utilizó un medio completo (R10) para todos los experimentos que implicaron el cultivo de ex vivo de esplenocitos para todos los experimentos ELISPOT. Una técnica completo consistía en RPMI 1640 (Cellgro, Manassas, VA), más 1% de Pen-Strep (Cellgro, Manassas, VA), 1% de L-Gln (Cellgro, Manassas, VA), 1 % NEAA (Cellgro , Manassas, VA),  $\beta$ -ME (Cellgro, Manassas, VA), más un 10% de SFB (Cellgro, Manassas, VA).

Las figuras representan las células plasmáticas de vida corta del bazo (**Fig. 38**), aisladas de la médula ósea células de plasma de corta duración (**Fig. 39**), células plasmáticas de larga vida del bazo (**Fig. 40**), y células plasmáticas aisladas de larga vida de la médula ósea (**Fig. 41**). Además se muestran gráficos de puntos representativos que proporcionan ejemplos de compuertas y células plasmáticas de vida corta, R1 y células plasmáticas de larga vida, R2, puertas (**Fig. 42**). Los gráficos muestran mean $\pm$ SEM, una prueba estadística que incluyó dos colas, el Mann-Whitney test-t, \* $p < 0,05$  fue considerado significativo. Todos los eventos que se muestran fueron originalmente regulados por el tamaño de las células vivas, las gráficas muestran CD19-negativas, CD38/CD138-doble de poblaciones positivas que habían incorporado BrdU, ya sea (ciclismo, por lo tanto células plasmáticas de corta duración, véase región R1) o no se incorporó BrdU (no ciclismo, por lo tanto células plasmáticas de larga vida, véase región R2).

El COMPUESTO A redujo las células plasmáticas de larga vida, por lo general radio y quimio-resistentes, en ratones NZM propensos al lupus. Como se muestra en las **Figs. 38-42** tanto en ciclo (de corta duración, la región R1) y no en el ciclo (R2, región de larga vida) de las células CD138+ en el plasma disminuyen después del tratamiento con el COMPUESTO A. La dosis de 100 mg/kg del COMPUESTO A impactado en las células plasmáticas tanto de corta como de larga vida en la médula ósea (**Figs. 39 y 41**). Las tres dosis impactadas en el tiempo en que vivían las células plasmáticas en el bazo (**Fig. 40**). Una selección de células plasmáticas de larga vida es importante porque estas células son difíciles de matar, son por lo general quimio y radio-resistentes, pueden sobrevivir durante muchas décadas dentro de la arquitectura de la médula ósea y producen la mayoría de los autoanticuerpos en el LES.

#### REALIZACIONES PREFERIDAS

Las realizaciones preferidas de la presente invención incluyen:

Realización 1: El COMPUESTO A para uso en el tratamiento del lupus en un sujeto.

Realización 2: El compuesto para uso de la realización 1, en el que el COMPUESTO A fue administrado por vía oral.

Realización 3: El compuesto para el uso de cualquiera de las realizaciones 1 a 2, en el que el COMPUESTO A se administró en una dosis de aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 1000 mg/kg.

Realización 4: El compuesto para el uso de cualquiera de las realizaciones 1 a 2, en el que el

## ES 2 582 465 T3

COMPUESTO A se administra en una dosis de aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 500 mg/kg.

Realización 5: El compuesto para el uso de cualquiera de las realizaciones 1 a 2, en el que el COMPUESTO A se administró en una dosis de aproximadamente 10 mg/kg a aproximadamente 200 mg/kg.

Realización 6: El compuesto para el uso de cualquiera de las realizaciones 1 a 2, en el que el COMPUESTO A se administró en una dosis de aproximadamente 25 mg/kg a aproximadamente 150 mg/kg.

Realización 7: El compuesto para el uso de cualquiera de las realizaciones 1 a 2, en el que el COMPUESTO A se administró en una dosis de aproximadamente 50 mg/kg a aproximadamente 100 mg/kg.

Realización 8: El compuesto para el uso de cualquiera de las realizaciones 1 a 2, en el que el COMPUESTO A se administró en una dosis de aproximadamente 55 mg/kg a aproximadamente 100 mg/kg.

Realización 9: El compuesto para el uso de cualquiera de las realizaciones 1 a 2, en el que el Compuesto A se administró en una dosis de aproximadamente 1 mg/kg.

Realización 10: El compuesto para el uso de cualquiera de las realizaciones 1 a 2, en el que el COMPUESTO A se administró en una dosis de aproximadamente 5 mg/kg.

Realización 11: El compuesto para el uso de cualquiera de las realizaciones 1 a 2, en el que el COMPUESTO A se administró en una dosis de aproximadamente 10 mg/kg.

Realización 12: El compuesto para el uso de cualquiera de las realizaciones 1 a 2, en el que el COMPUESTO A se administró en una dosis de aproximadamente 50 mg/kg.

Realización 13: El compuesto para el uso de cualquiera de las realizaciones 1 a 2, en el que el COMPUESTO A se administró en una dosis de aproximadamente 100 mg/kg.

Realización 14: El compuesto para el uso de cualquiera de las realizaciones 1 a 2, en el que el COMPUESTO A se administró en una dosis de aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 1 g.

Realización 15: El compuesto para el uso de cualquiera de las realizaciones 1 a 2, en el que el COMPUESTO A se administró en una dosis de aproximadamente 0,5 mg a aproximadamente 500 mg.

Realización 16: El compuesto para el uso de cualquiera de las realizaciones 1 a 2, en el que el COMPUESTO A se administró en una dosis de aproximadamente 1mg a aproximadamente 100 mg.

Realización 17: El compuesto para el uso de cualquiera de las realizaciones 1 a 2, en el que el COMPUESTO A se administró en una dosis de aproximadamente 5 mg a aproximadamente 50 mg.

Realización 18: El compuesto para el uso de cualquiera de las realizaciones 1 a 2, en el que el COMPUESTO A se administró en una dosis de aproximadamente 5 mg a aproximadamente 30 mg.

Realización 19: El compuesto para el uso de cualquiera de las realizaciones 1 a 2, en el que el COMPUESTO A se administró en una dosis de aproximadamente 5 mg a aproximadamente 20 mg.

Realización 20: El compuesto para el uso de cualquiera de las realizaciones 1 a 2, en el que el COMPUESTO A se administró en una dosis de aproximadamente 1 mg.

Realización 21: El compuesto para el uso de cualquiera de las realizaciones 1 a 2, en el que el COMPUESTO A se administró en una dosis de aproximadamente 5 mg.

Realización 22: El compuesto para el uso de cualquiera de las realizaciones 1 a 2, en el que el COMPUESTO A se administró en una dosis de aproximadamente 10 mg.

Realización 23: El compuesto para el uso de cualquiera de las realizaciones 1 a 2, en el que el COMPUESTO A se administró en una dosis de aproximadamente 20 mg.

Realización 24: El compuesto para el uso de cualquiera de las realizaciones 1 a 2, en el que el COMPUESTO A se administró en una dosis de aproximadamente 30 mg.

Realización 25: El compuesto para el uso de cualquiera de las realizaciones 1 a 2, en el que el COMPUESTO A se administró en una dosis de aproximadamente 40 mg.

Realización 26: El compuesto para el uso de cualquiera de las realizaciones 1 a 2, en el que el

## ES 2 582 465 T3

COMPUESTO A se administró en una dosis de aproximadamente 50 mg.

Realización 27: El compuesto para el uso de cualquiera de las realizaciones 1 a 2, en el que el COMPUESTO A se administró en una dosis de aproximadamente 100 mg.

Realización 28: El compuesto para el uso de cualquiera de las realizaciones 1 a 2, en el que el COMPUESTO A se administró en una dosis de aproximadamente 200 mg.

Realización 29: El compuesto para el uso de cualquiera de las realizaciones 1 a 28, en el que el sujeto experimenta una disminución en linfomegalía durante el tratamiento.

Realización 30: El compuesto para el uso de cualquiera de las realizaciones 1 a 29, en el que el sujeto experimenta una disminución de la esplenomegalia durante el tratamiento.

Realización 31: El compuesto para el uso de cualquiera de las realizaciones 1 a 30, en el que el sujeto experimenta una disminución en los recuentos de leucocitos del bazo durante el tratamiento.

Realización 32: El compuesto para el uso de cualquiera de las realizaciones 1 a 31, en el que el sujeto experimenta una disminución en el suero IL-12 durante el tratamiento.

Realización 33: El compuesto para el uso de cualquiera de las realizaciones 1 a 32, en el que el sujeto experimenta un aumento en suero C3 durante el tratamiento.

Realización 34: El compuesto para el uso de cualquiera de las realizaciones 1 a 33, en el que el sujeto experimenta una disminución en la celularidad glomerular del riñón durante el tratamiento.

Realización 35: El compuesto para el uso de cualquiera de las realizaciones 1 a 34, en el que el sujeto experimenta una disminución de la infiltración intersticial renal durante el tratamiento.

Realización 36: El compuesto para el uso de cualquiera de las realizaciones 1 a 35, en el que el sujeto experimenta una disminución de pSTAT3 en el riñón durante el tratamiento.

Realización 37: El compuesto para el uso de cualquiera de las realizaciones 1 a 36, en el que el sujeto experimenta una disminución de las células plasmáticas del bazo durante el tratamiento.

Realización 38: El compuesto para el uso de cualquiera de las realizaciones 1 a 37, en el que el sujeto experimenta una disminución de los anticuerpos antinucleares séricos durante el tratamiento.

Realización 39: El compuesto para el uso de cualquiera de las realizaciones 1 a 38, en el que el sujeto experimenta una disminución de anticuerpos antinucleares anti-dsDNA séricos durante el tratamiento.

Realización 40: El compuesto para el uso de cualquiera de las realizaciones 1 a 39, en el que el sujeto experimenta una disminución de IFN $\alpha$  en suero durante el tratamiento.

Realización 41: El compuesto para el uso de cualquiera de las realizaciones 1 a 40, en el que el sujeto experimenta una disminución de la proteinuria durante el tratamiento.

Realización 42: El compuesto para el uso de cualquiera de las realizaciones 1 a 41, en el que el sujeto experimenta una disminución de infiltraciones pulmonares durante el tratamiento.

Realización 43: El compuesto para el uso de cualquiera de las realizaciones 1 a 42, en el que el sujeto experimenta una disminución de IL-17A en suero durante el tratamiento.

Realización 44: El compuesto para el uso de cualquiera de las realizaciones 1 a 43, en el que el sujeto experimenta una disminución de IL-6 en suero durante el tratamiento.

Realización 45: El compuesto para el uso de cualquiera de las realizaciones 1 a 44, en el que el sujeto experimenta una disminución en suero CCL3/MIP-1 $\alpha$  durante el tratamiento.

Realización 46: El compuesto para el uso de cualquiera de las realizaciones 1 a 45, en el que el sujeto experimenta una disminución en suero CXCL10/IP-10 durante el tratamiento.

Realización 47: El compuesto para el uso de cualquiera de las realizaciones 1 a 46, en el que el sujeto experimenta una disminución de CXCL9/MIG en suero durante el tratamiento.

Realización 48: El compuesto para el uso de cualquiera de las realizaciones 1 a 47, en el que el sujeto

experimenta una disminución de IL-4 en suero durante el tratamiento.

Realización 49: El compuesto para el uso de cualquiera de las realizaciones 1 a 48, en el que el sujeto experimenta una disminución de IL-13 en suero durante el tratamiento.

Realización 50: El compuesto para el uso de cualquiera de las realizaciones 1 a 49, en el que el sujeto experimenta una disminución de TNF $\alpha$  en suero durante el tratamiento.

Realización 51: El compuesto para el uso de cualquiera de las realizaciones 1 a 50, en el que el sujeto experimenta una disminución de KC/IL-8 en suero durante el tratamiento.

Realización 52: El compuesto para el uso de cualquiera de las realizaciones 1 a 51, en el que el sujeto experimenta una disminución de CTx en suero durante el tratamiento.

Realización 53: El compuesto para el uso de cualquiera de las realizaciones 1 a 52, en el que el sujeto es un humano.

Realización 54: El compuesto para el uso de cualquiera de las realizaciones 1 a 53, en el que el COMPUESTO A se administró una vez al día.

Realización 55: El compuesto para el uso de cualquiera de las realizaciones 1 a 53, en el que el COMPUESTO A se administró dos veces al día.

Realización 56: El compuesto para el uso de cualquiera de las realizaciones 1 a 53, en el que el COMPUESTO A se administró tres veces al día.

Realización 57: El compuesto para el uso de cualquiera de las realizaciones 1 a 53, en el que el COMPUESTO A se administró cuatro veces al día.

## REFERENCIAS

- Alperovich, G., I. Rama, et al. (2007). "New immunosuppressor strategies in the treatment of murine lupus nephritis." *Lupus* 16(1): 18-24.
- Aringer, M. and J. S. Smolen (2004). "Tumour necrosis factor and other proinflammatory cytokines in systemic lupus erythematosus: a rationale for therapeutic intervention." *Lupus* 13(5): 344-7.
- Bertsias, G. and D. T. Boumpas (2008). "Update on the management of lupus nephritis: let the treatment fit the patient." *Nat Clin Pract Rheumatol* 4(9): 464-72.
- Body, J. J., I. Diel, et al. (2004). "Profiling the safety and tolerability of bisphosphonates." *Semin Oncol* 31(5 Suppl 10): 73-8.
- Boumpas, D. T., R. Furie, et al. (2003). "A short course of BG9588 (anti-CD40 ligand antibody) improves serologic activity and decreases hematuria in patients with proliferative lupus glomerulonephritis." *Arthritis Rheum* 48(3): 719-27.
- Bouziid, K., A. Bahlous, et al. "C-telopeptides of type I collagen in postmenopausal women: an experience in a Tunisian clinical laboratory." *Tunis Med* 88(7): 467-9.
- Chevrier, S., C. Genton, et al. (2009). "CD93 is required for maintenance of antibody secretion and persistence of plasma cells in the bone marrow niche." *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(10): 3895-900.
- Chun, H. Y., J. W. Chung, et al. (2007). "Cytokine IL-6 and IL-10 as biomarkers in systemic lupus erythematosus." *J Clin Immunol* 27(5): 461-6.
- Coombs, J. H., B. J. Bloom, et al. (2010). "Improved pain, physical functioning and health status in patients with rheumatoid arthritis treated with CP-690,550, an orally active Janus kinase (JAK) inhibitor: results from a randomised, double-blind, placebo-controlled trial." *Ann Rheum Dis* 69(2): 413-6.
- Cunningham, J. (2007). "Pathogenesis and prevention of bone loss in patients who have kidney disease and receive long-term immunosuppression." *J Am Soc Nephrol* 18(1): 223-34.
- Egner, W. (2000). "The use of laboratory tests in the diagnosis of SLE." *J Clin Pathol* 53(6): 424-32.
- Espeli, M., S. Bokers, et al. "Local Renal Autoantibody Production in Lupus Nephritis." *J Am Soc Nephrol*.
- Fairhurst, A. M., A. E. Wandstrat, et al. (2006). "Systemic lupus erythematosus: multiple immunological phenotypes in a complex genetic disease." *Adv Immunol* 92: 1-69.
- Fu, Q., X. Chen, et al. (2008). "Association of elevated transcript levels of interferon-inducible chemokines with disease activity and organ damage in systemic lupus erythematosus patients." *Arthritis Res Ther* 10(5): R112.
- Houssiau, F. A. and E. M. Ginzler (2008). "Current treatment of lupus nephritis." *Lupus* 17(5): 426-30.
- Kamen, D. L. and J. D. Alele "Skeletal manifestations of systemic autoimmune diseases." *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 17(6): 540-5.
- Kiss, E., G. Lakos, et al. (2009). "Anti-nucleosome antibody, a reliable indicator for lupus nephritis." *Autoimmunity* 42(5): 393-8.
- Lacotte, S., H. Dumortier, et al. (2010). "Identification of new pathogenic players in lupus: autoantibody-secreting cells are present in nephritic kidneys of (NZBxNZW)F1 mice." *J Immunol* 184(7): 3937-45.

Meister, S., U. Schubert, et al. (2007). "Extensive immunoglobulin production sensitizes myeloma cells for proteasome inhibition." *Cancer Res* 67(4): 1783-92.

Morel, L. "Genetics of SLE: evidence from mouse models." *Nat Rev Rheumatol* 6(6): 348-57.

5 Morimoto, S., Y. Tokano, et al. (2001). "The increased interleukin-13 in patients with systemic lupus erythematosus: relations to other Th1-, Th2-related cytokines and clinical findings." *Autoimmunity* 34(1): 19-25.

Muller, S., J. Dieker, et al. (2008). "Pathogenic anti-nucleosome antibodies." *Lupus* 17(5): 431-6.

Neubert, K., S. Meister, et al. (2008). "The proteasome inhibitor bortezomib depletes plasma cells and protects mice with lupus-like disease from nephritis." *Nat Med* 14(7): 748-55.

10 Niewold, T. B., J. Hua, et al. (2007). "High serum IFN-alpha activity is a heritable risk factor for systemic lupus erythematosus." *Genes Immun* 8(6): 492-502.

Obeng, E. A., L. M. Carlson, et al. (2006). "Proteasome inhibitors induce a terminal unfolded protein response in multiple myeloma cells." *Blood* 107(12): 4907-16.

Sanz, I. and F. E. Lee (2010). "B cells as therapeutic targets in SLE." *Nat Rev Rheumatol* 6(6): 326-37.

15 Smith, D. L., X. Dong, et al. (2007). "A female preponderance for chemically induced lupus in SJL/J mice." *Clin Immunol* 122(1): 101-7.

Smith-Bouvier, D. L., A. A. Divekar, et al. (2008). "A role for sex chromosome complement in the female bias in autoimmune disease." *J Exp Med* 205(5): 1099-108.

Sozzani, S., D. Bosisio, et al. "Type I interferons in systemic autoimmunity." *Autoimmunity* 43(3): 196-203.

20 Tucci, M., L. Lombardi, et al. (2008). "Overexpression of interleukin-12 and T helper 1 predominance in lupus nephritis." *Clin Exp Immunol* 154(2): 247-54.

25

30

35

40

45

50

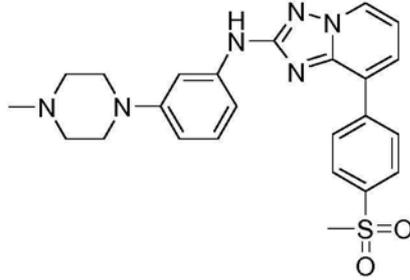
55

60

65

**Reivindicaciones**

5 1. Un compuesto que tiene la fórmula



o una sal del mismo en el uso del tratamiento de lupus en un sujeto en necesidad del mismo.

- 20 2. El compuesto en el uso del tratamiento de lupus según la reivindicación 1, en el que el sujeto es un humano.
3. El compuesto en el uso del tratamiento de lupus según la reivindicación 1, en el que el compuesto se administra por vía oral.
- 25 4. El compuesto en el uso del tratamiento de lupus según la reivindicación 1, en el que el compuesto se administra una vez al día.
- 30 5. El compuesto en el uso del tratamiento de lupus según la reivindicación 1, en el que el compuesto se administra dos veces al día.
6. El compuesto en el uso del tratamiento de lupus según la reivindicación 1, en el que el compuesto se administra en una dosis en un intervalo de aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 100 mg/kg.
- 35 7. El compuesto en el uso del tratamiento de lupus según la reivindicación 1, en el que el compuesto se administra en una dosis de aproximadamente 50 mg/kg a aproximadamente 100 mg/kg.
8. El compuesto en el uso del tratamiento de lupus según la reivindicación 1, en el que el compuesto se administra en una dosis de aproximadamente 50 mg/kg.
- 40 9. El compuesto en el uso del tratamiento de lupus según la reivindicación 1, en el que el compuesto se administra en una dosis de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 1 g.
- 45 10. El compuesto en el uso del tratamiento de lupus según la reivindicación 1, en el que el compuesto se administra en una dosis de aproximadamente 5 mg a aproximadamente 100 mg.
11. El compuesto en el uso del tratamiento de lupus según la reivindicación 1, en el que el compuesto se administra en una dosis de aproximadamente 5 mg a aproximadamente 30 mg.
- 50 12. El compuesto en el uso del tratamiento de lupus de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 en el que el sujeto experimenta una disminución de la IL-12 en suero, riñón pSTAT3, células plasmáticas del bazo, los anticuerpos antinucleares séricos, IFN $\alpha$  en suero o proteinuria durante su tratamiento.

55

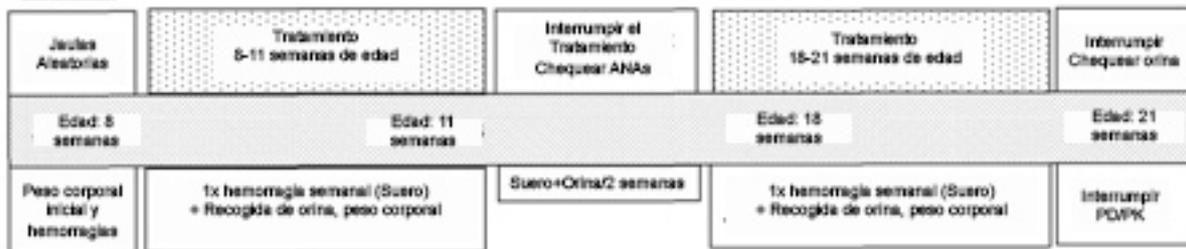
60

65

**Fig. 1**

**COMPONENTE A en modelode lupus MRL/lpr**

8 semanas de edad



**Grupos**

- 1.MRL/lpr + COMPUESTO A - alto (12)
- 2.MRL/lpr + COMPUESTO A - med (12)
- 3.MRL/lpr + COMPUESTO A - bajo (12)
4. MRL/lpr + DEX (12)
5. MRL/lpr + Vehiculo (12)

**Tratamientos**

1. COMPUESTO A = 100mg/kg, b.i.d., p.o.
2. COMPUESTO A = 55mg/kg, b.i.d., p.o.
3. COMPUESTO A = 30mg/kg, b.i.d., p.o.
4. DEX= Dexamethasone 0 1.5mg/kg/2d (M,W,F), i.p.
5. Vehiculo = PEG400, bid, p.o.

**Lecturas:**

- DURANTE: anticuerpos ANA (Sm, dsDNA, Cromatina)
- DURANTE: Proteina de Orina - Ensayos y ramas
- FIN: citoquinas en suero (Luminex)
- FIN: PK - Sangre/Bazo/Riñon;PD - Bazo/Riñon
- FIN: Bazo T+B celulas Elispots (T: Sm, Cromatina), (B: dsDNA, Sm, Cromatina)
- FIN: Bazo FACS (clulas plasmaticas, celulas B)
- FIN: Patologia del riñon - fija y congelada

Fig. 2

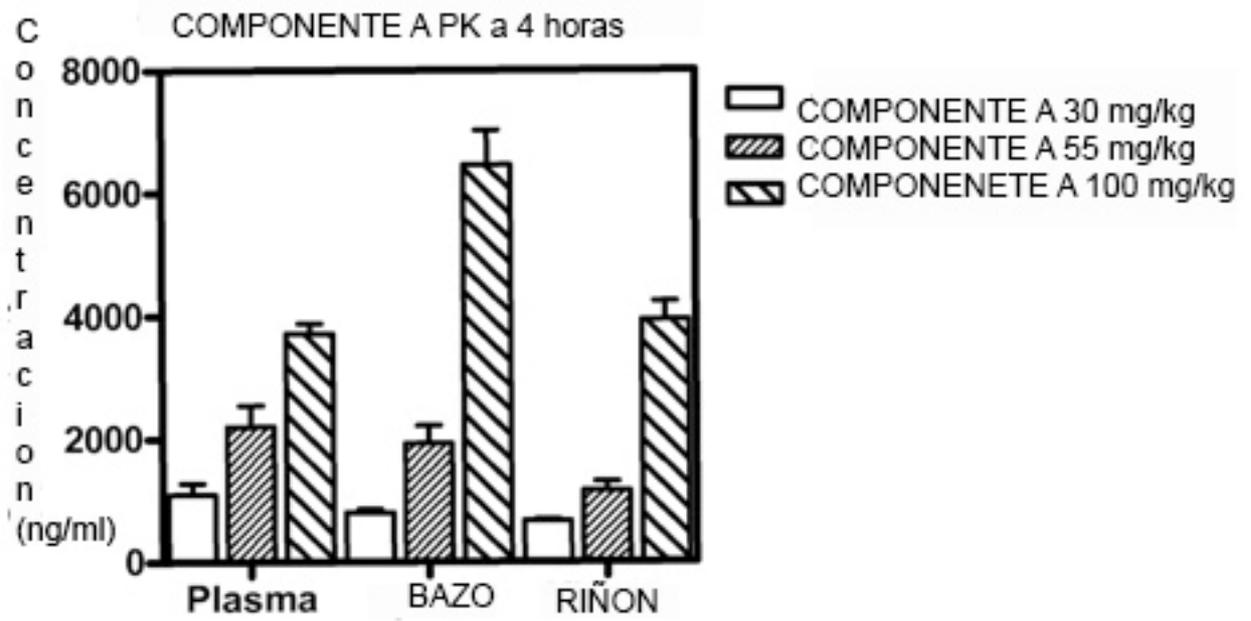


Fig. 3

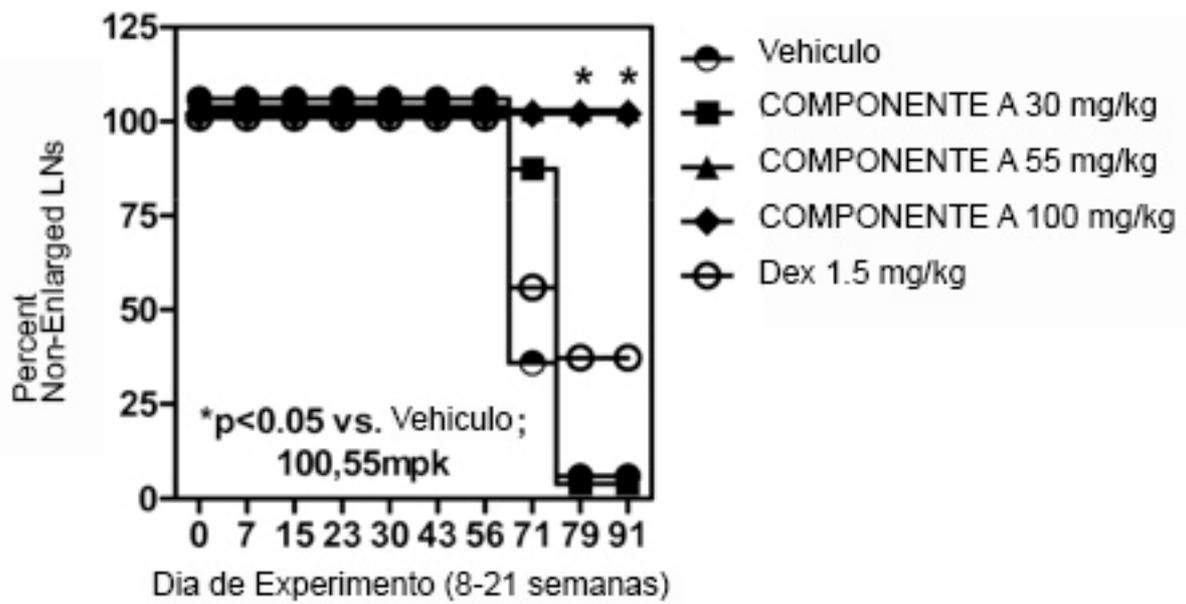


Fig. 4

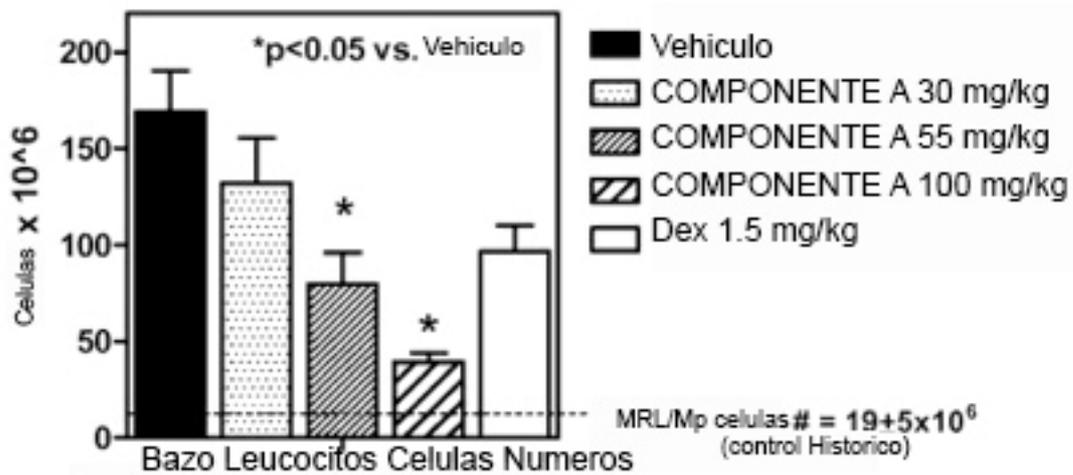
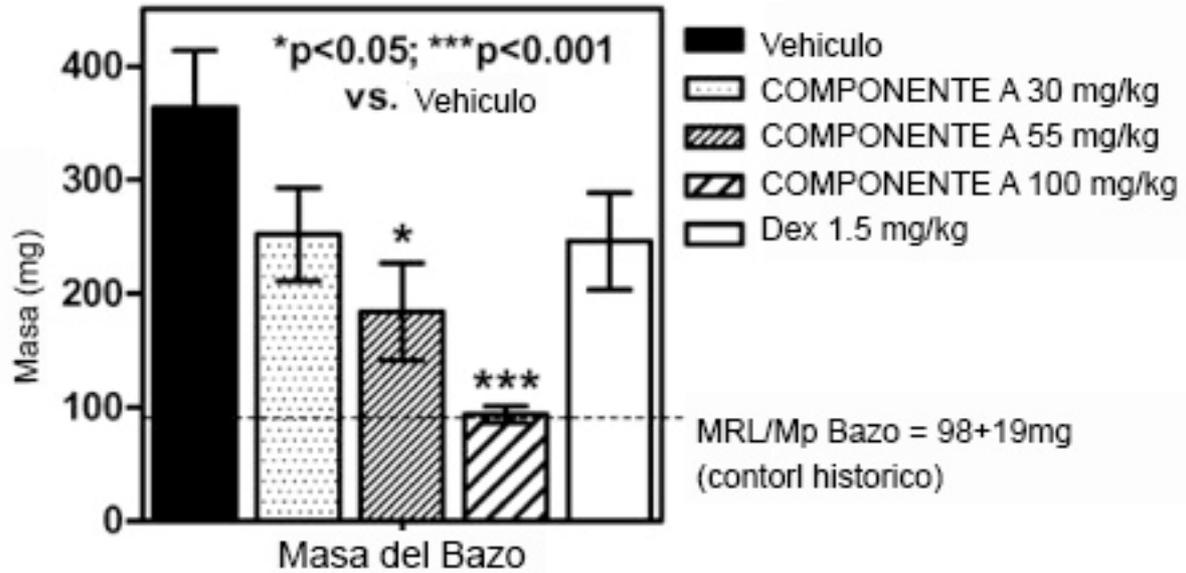


Fig. 5

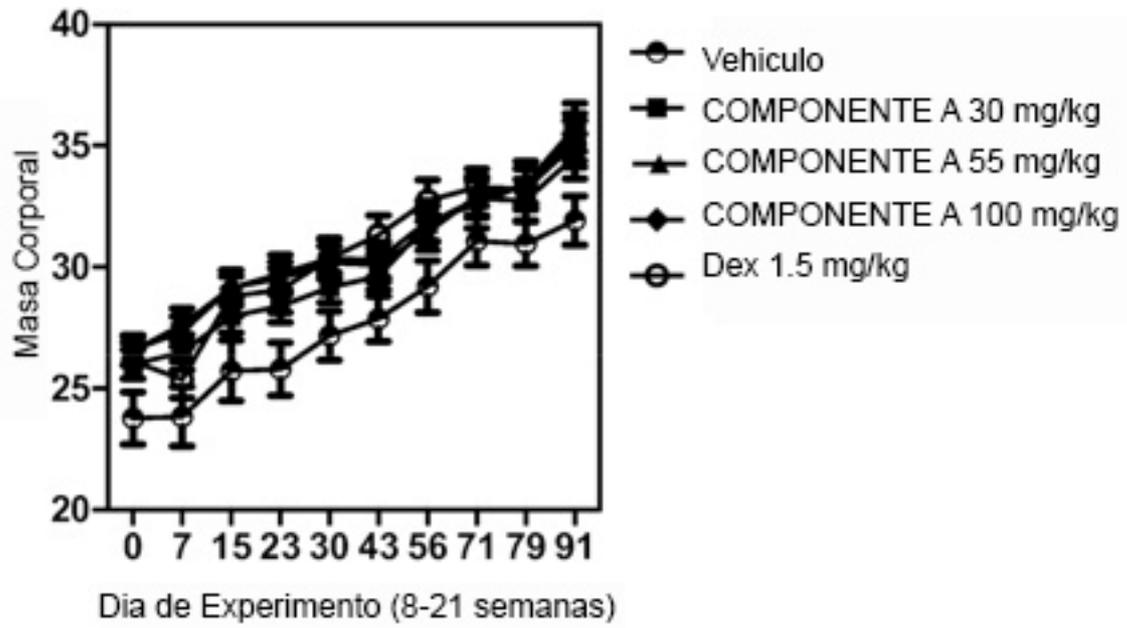


Fig. 6

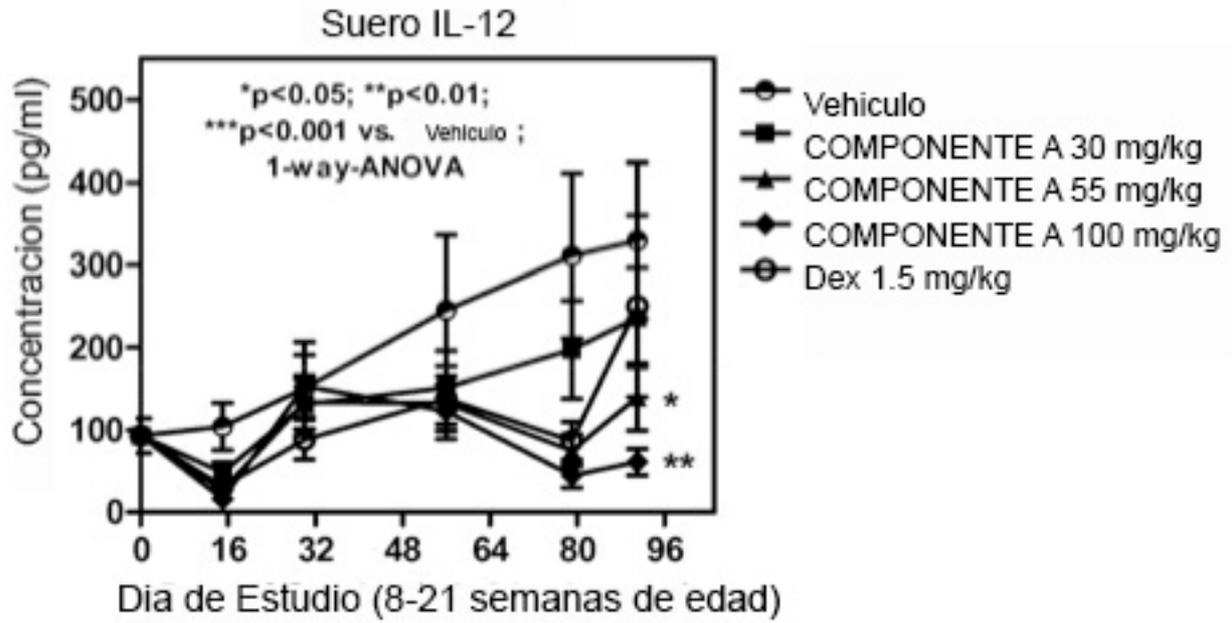
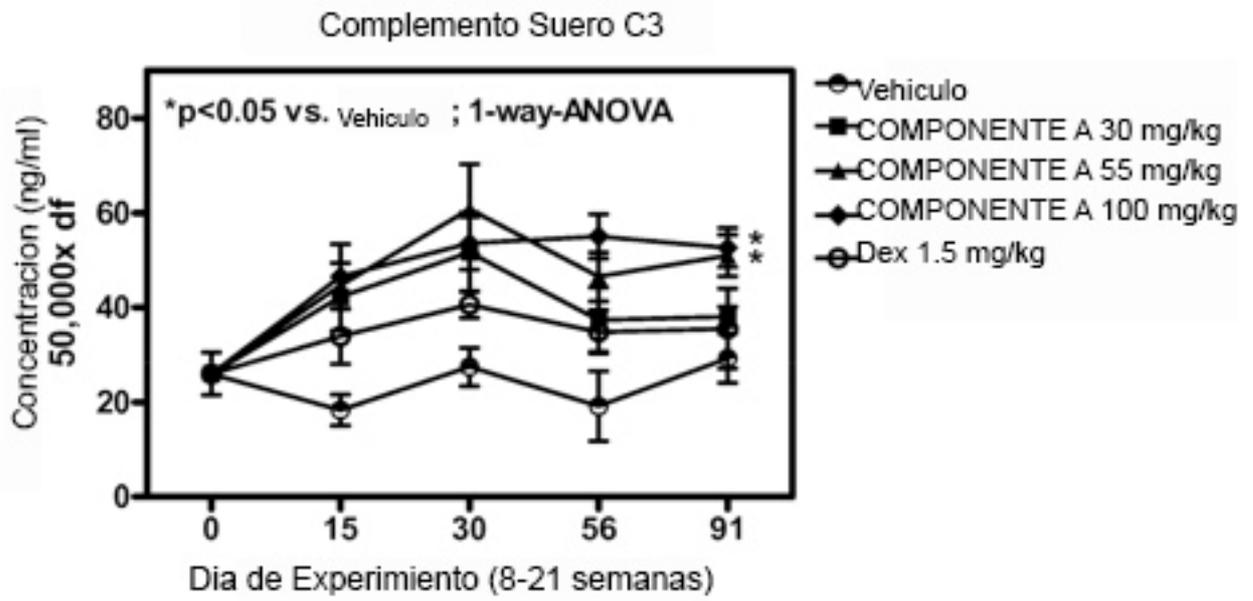


Fig. 7



**Fig. 8**

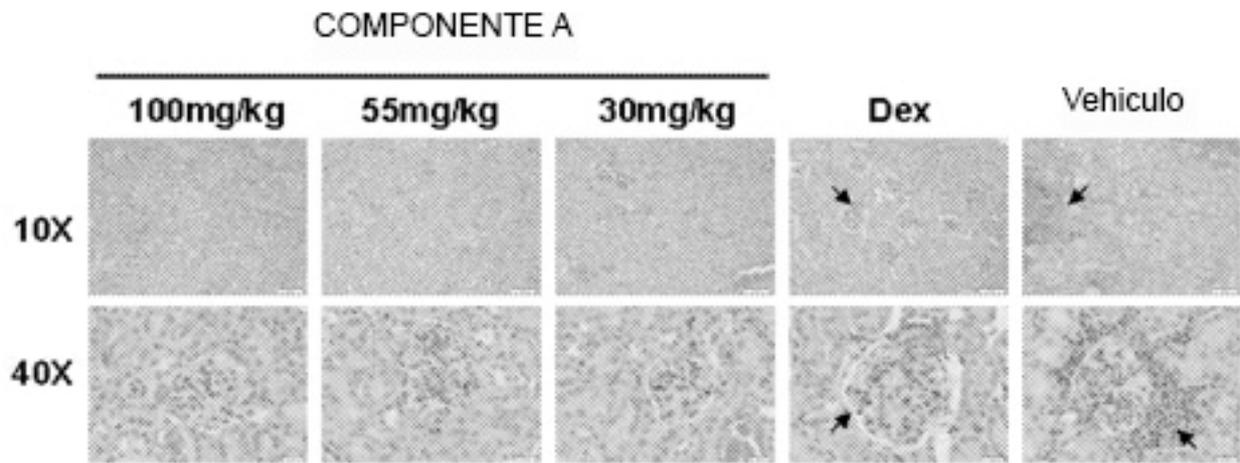


Fig. 9

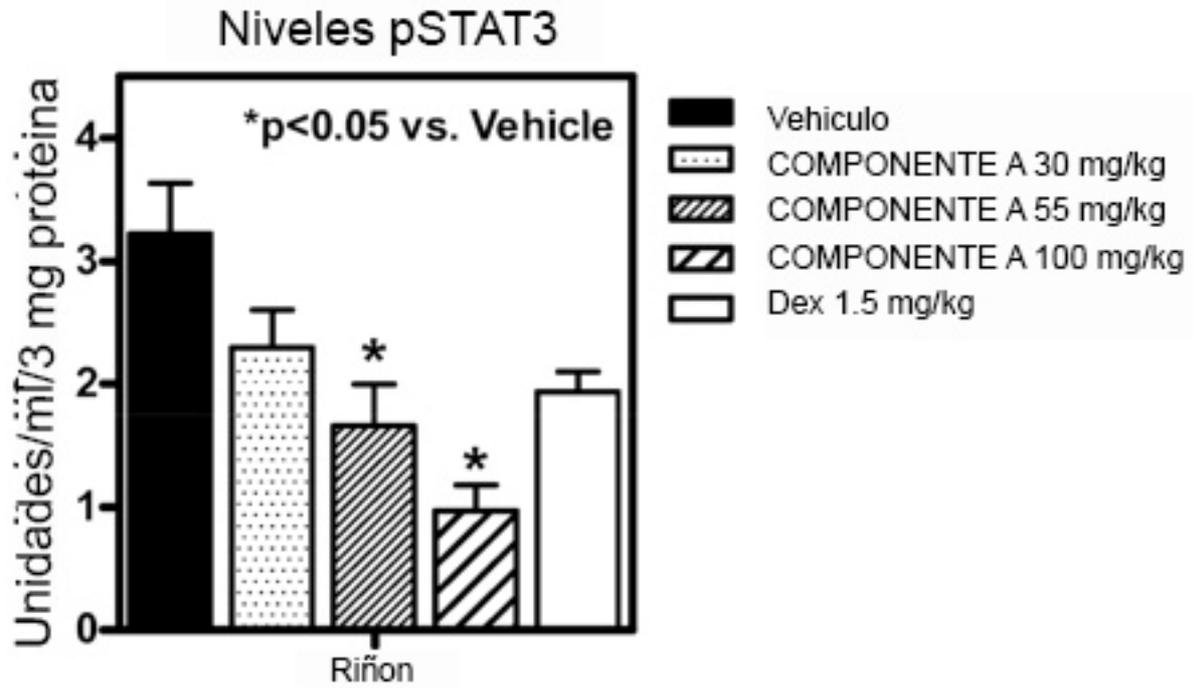


Fig. 10

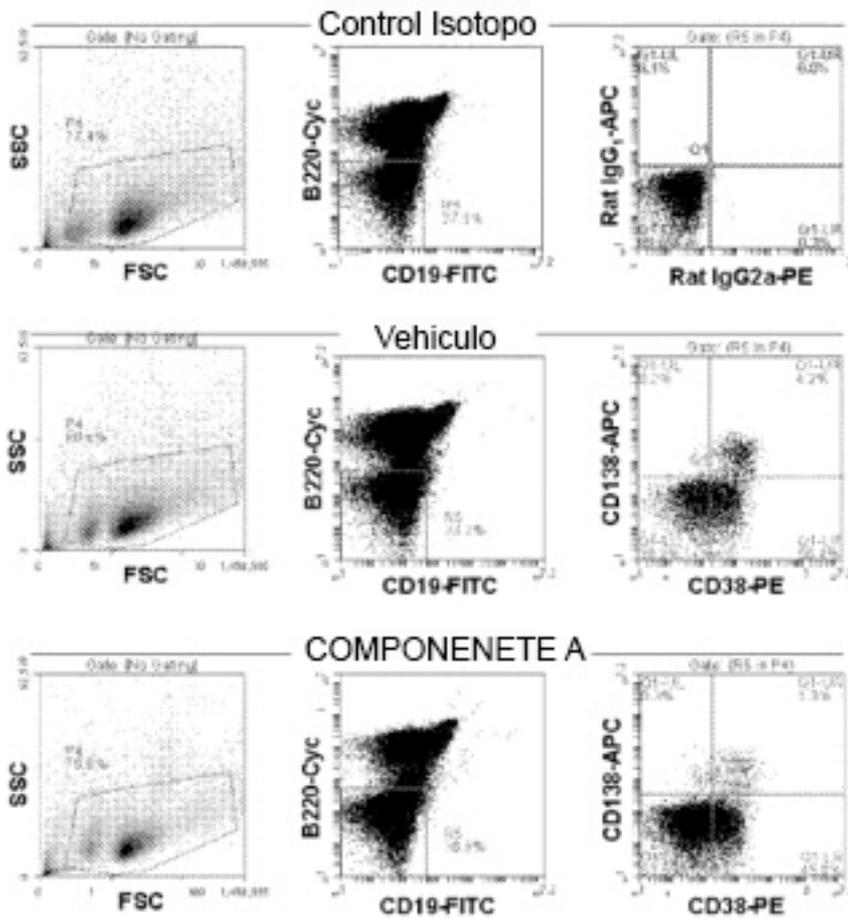
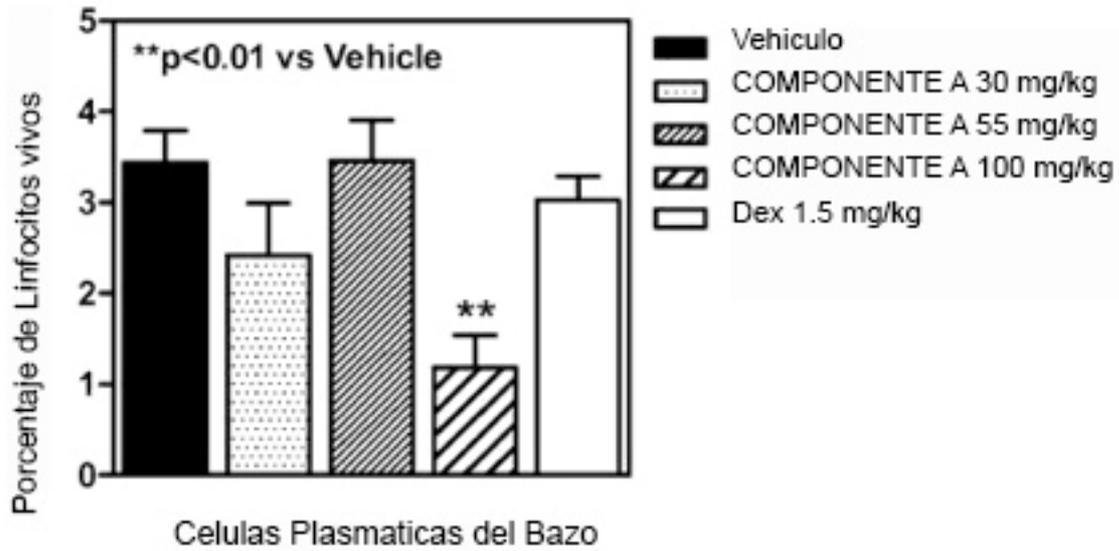
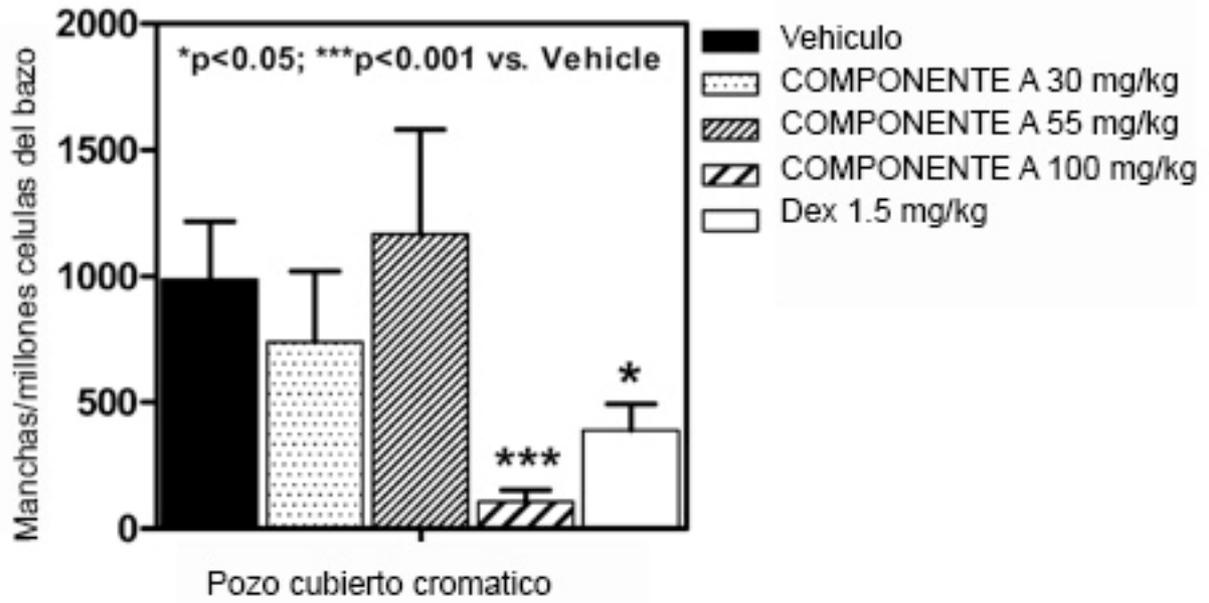
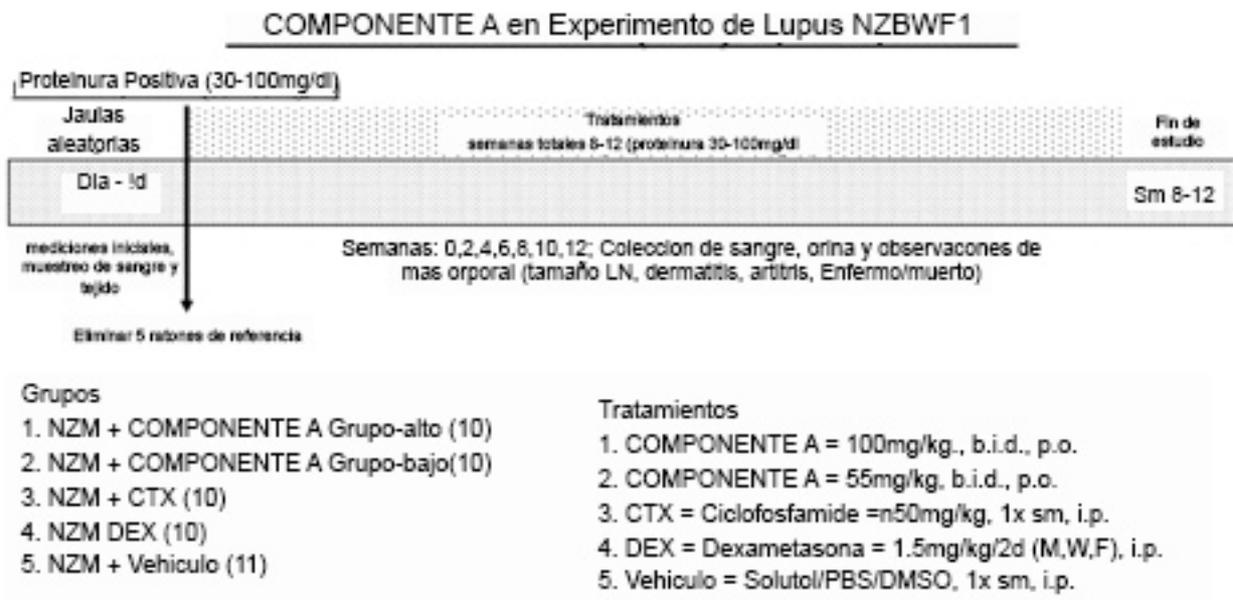


Fig. 11



**Fig. 12**



- Lecturas:**
- DURANTE: anticuerpos ANA (Sm, dsDNA, Cromatina), niveles C3 (ELISA)
  - Durante: Proteina de la orina - Ensayos y ratas, Biomarcador de Orina, TWEAK quininas, (ELISA)
  - FIN: Citoquina serica (20-plex Luminex), HMGB1 en suero (ELISA), CTx en suero (ELISA)
  - FIN: PD-Sazo/Rifon (pSTAT3)
  - FIN: Celulas B del bazo Elispta: dsDNA, Sm, CRomatina, IgG total
  - FIN: Celulas plasmaticas del bazo - FACS: CD19-B220-KD138+KDS8++
  - FIN: Patologia Rifon - fija y congelada

Fig. 13

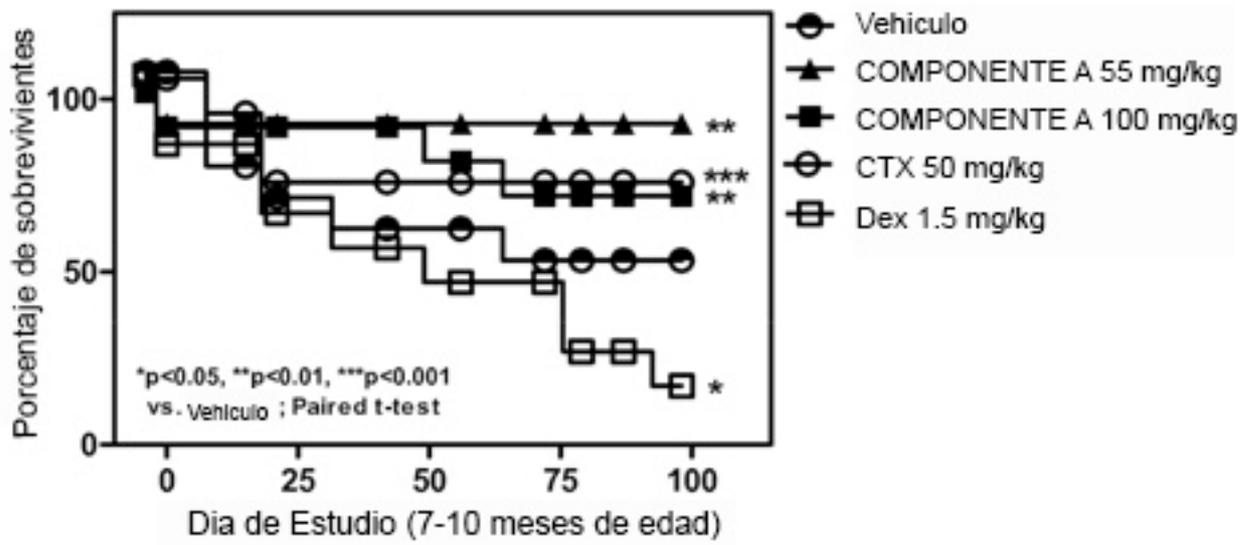
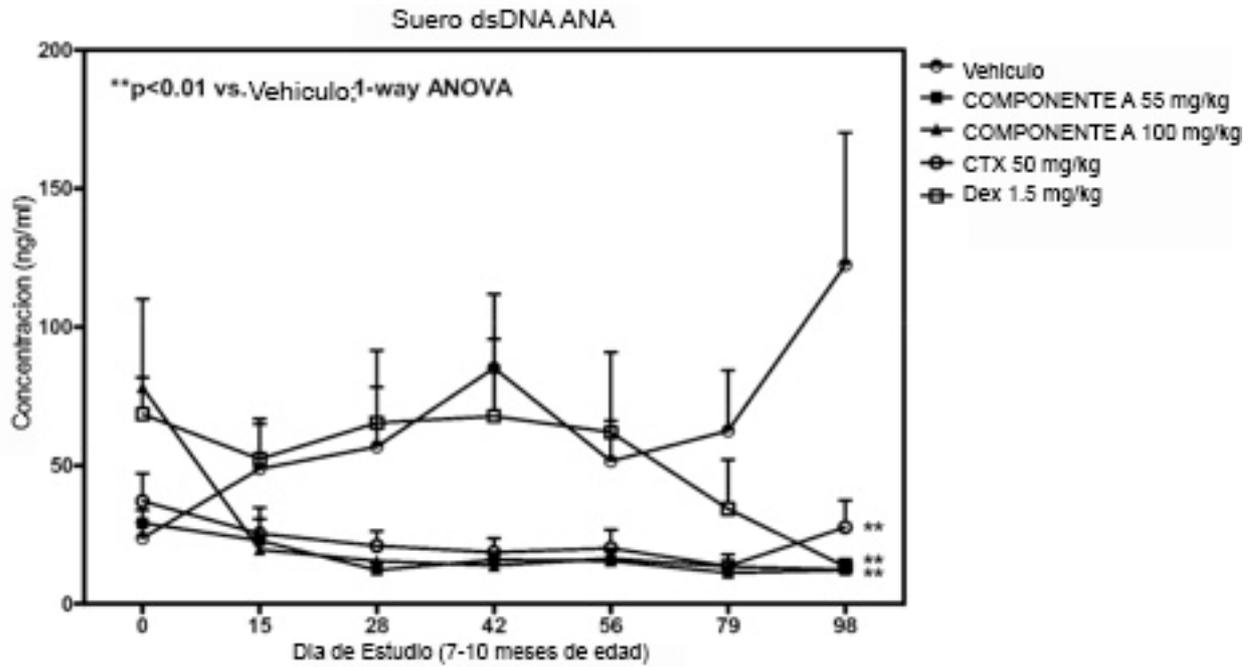


Fig. 14



**Fig. 15**

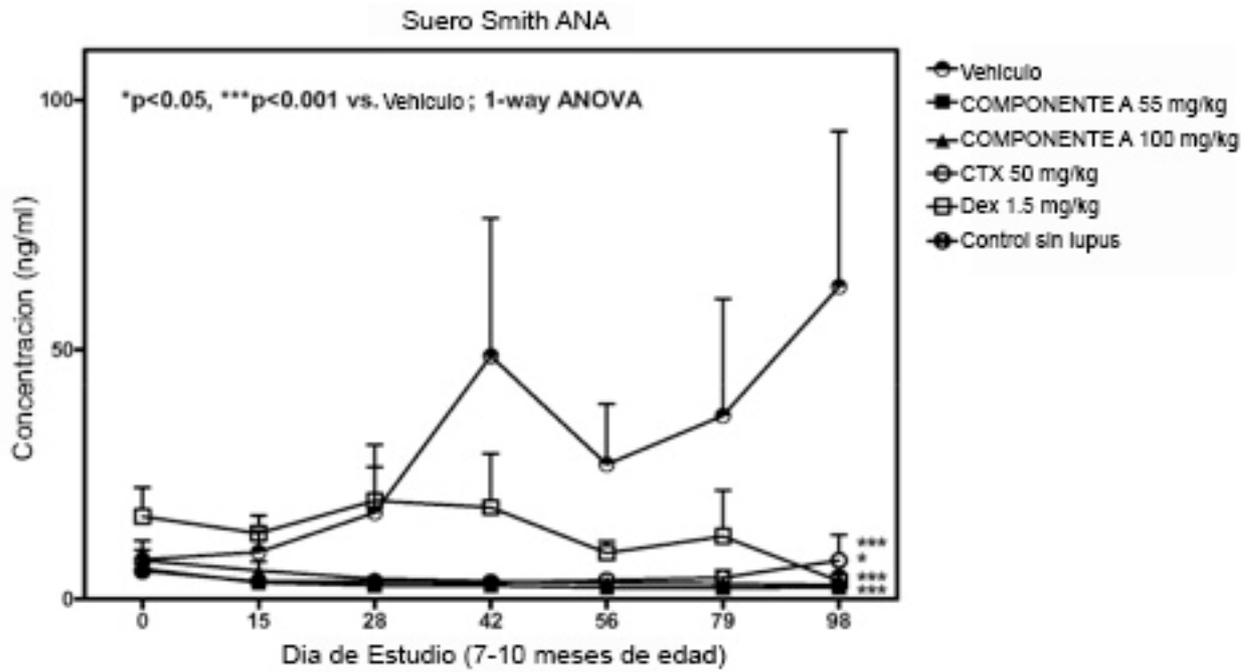


Fig. 16

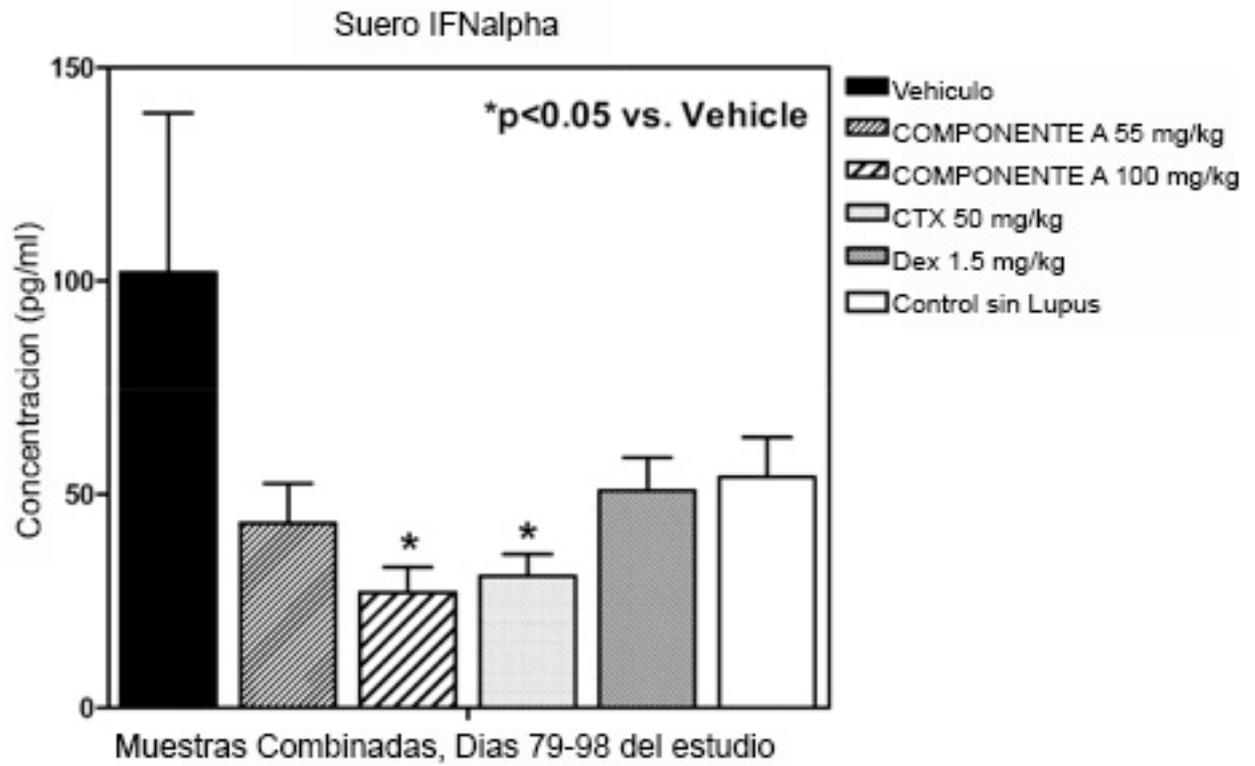


Fig. 17

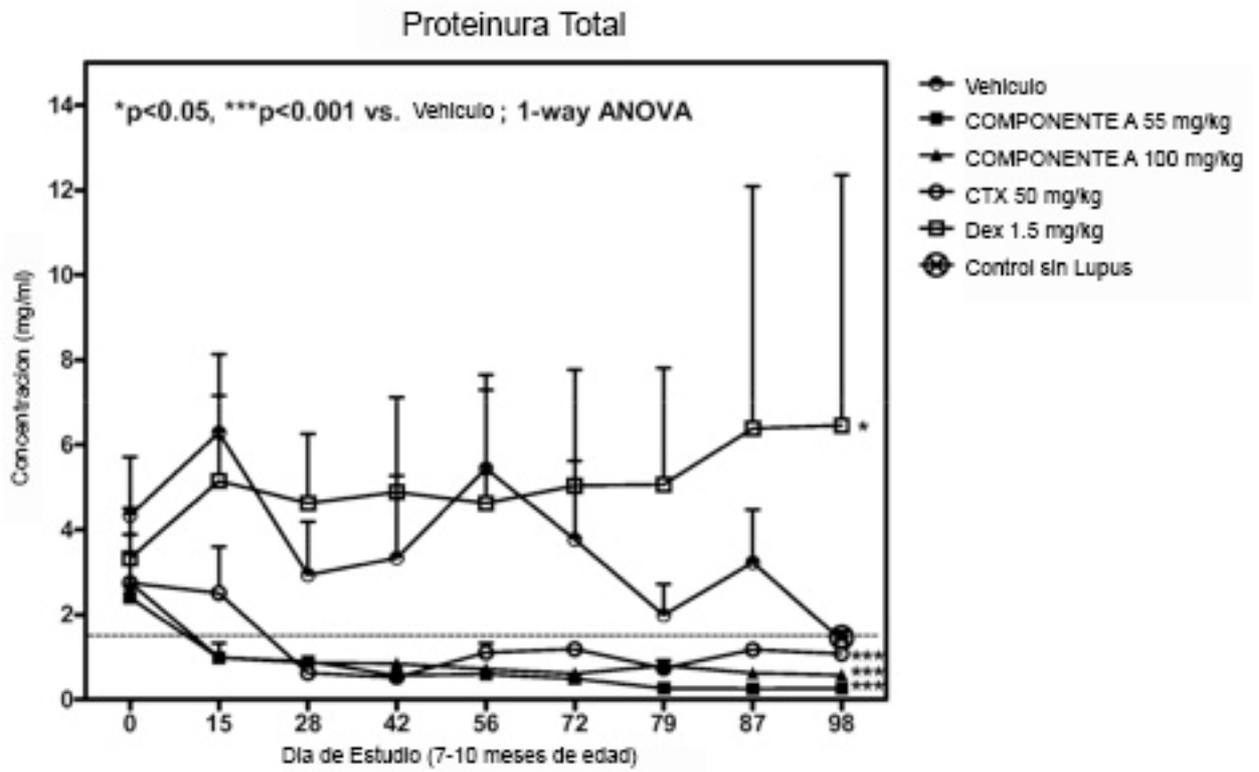


Fig. 18A

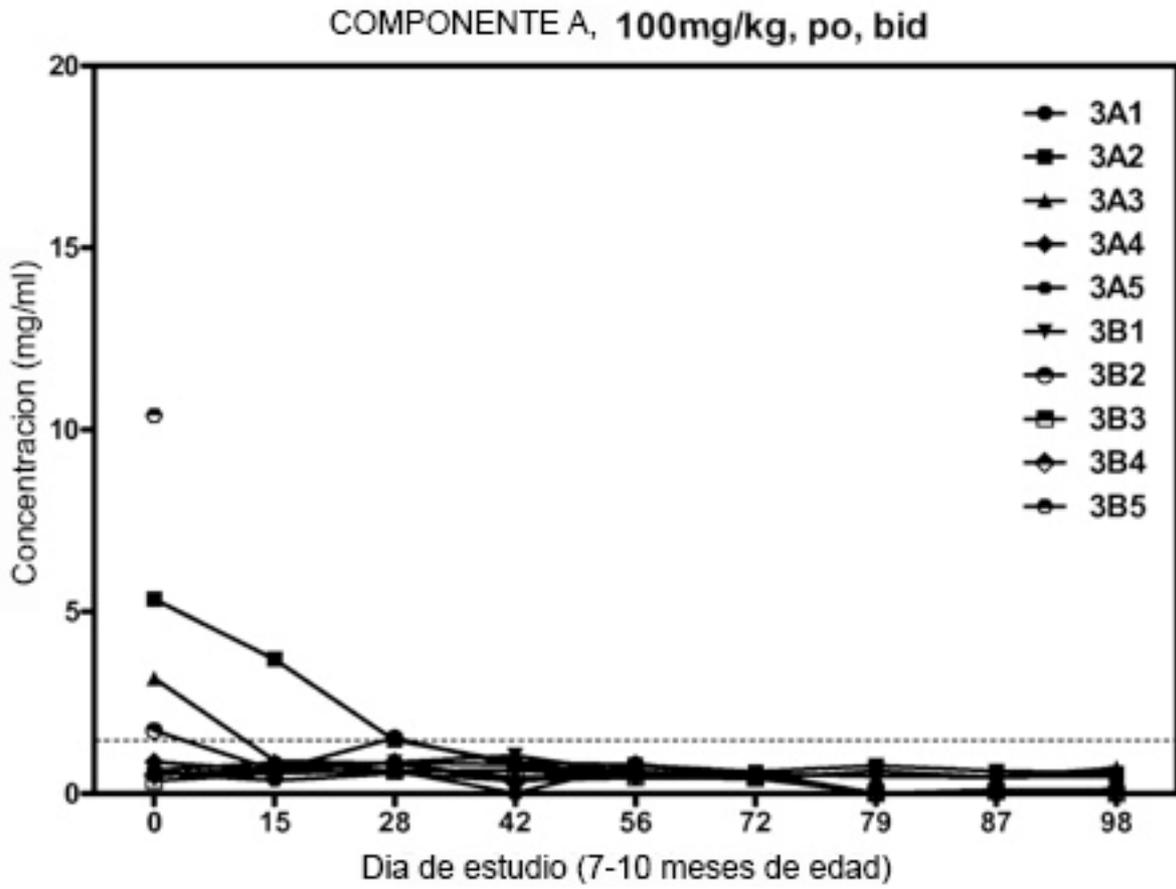


Fig. 18B

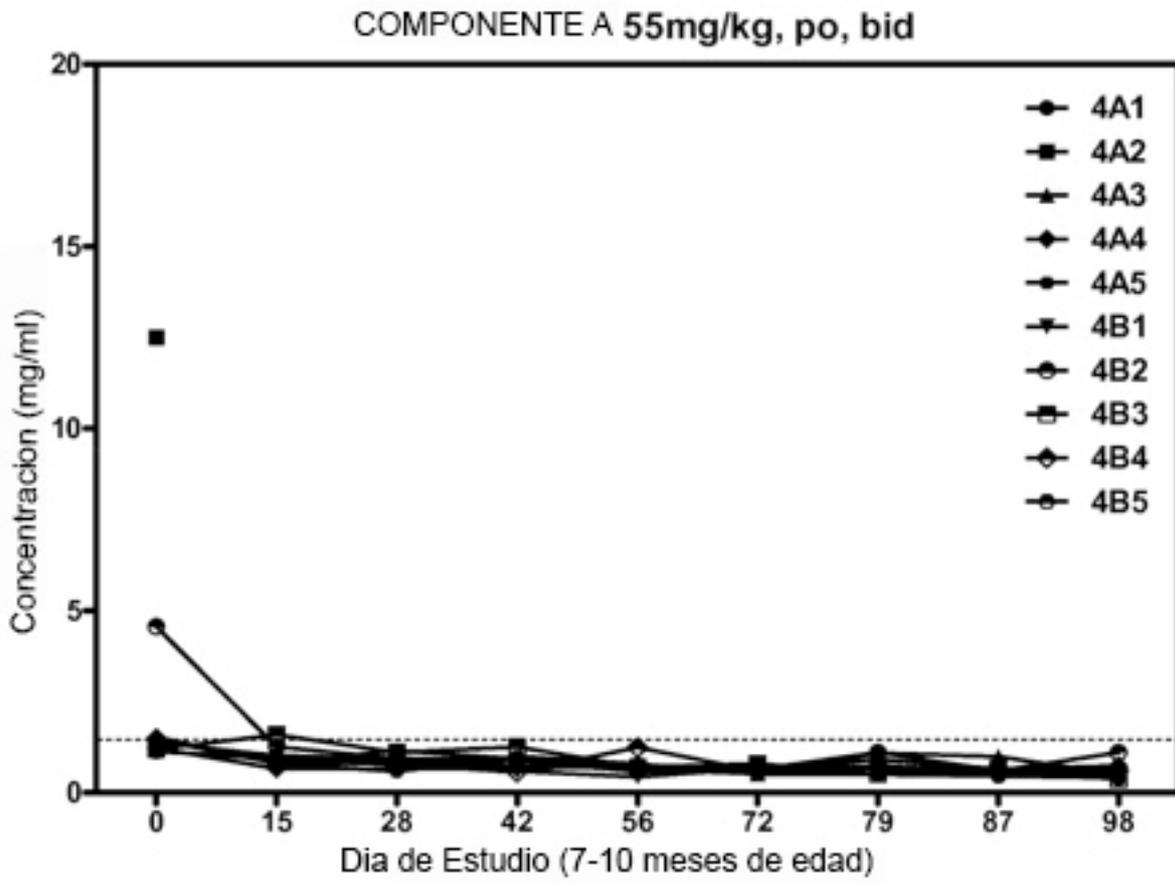


Fig. 18C

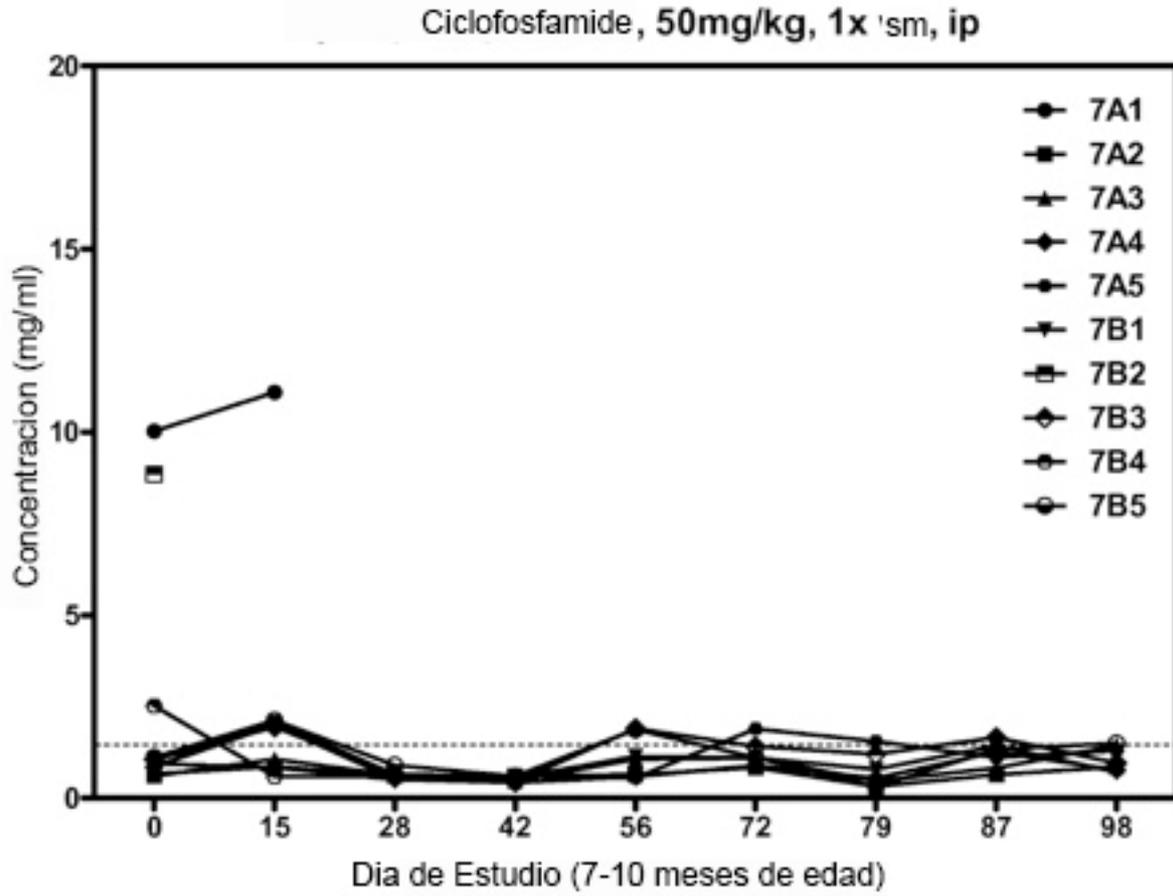


Fig. 18D

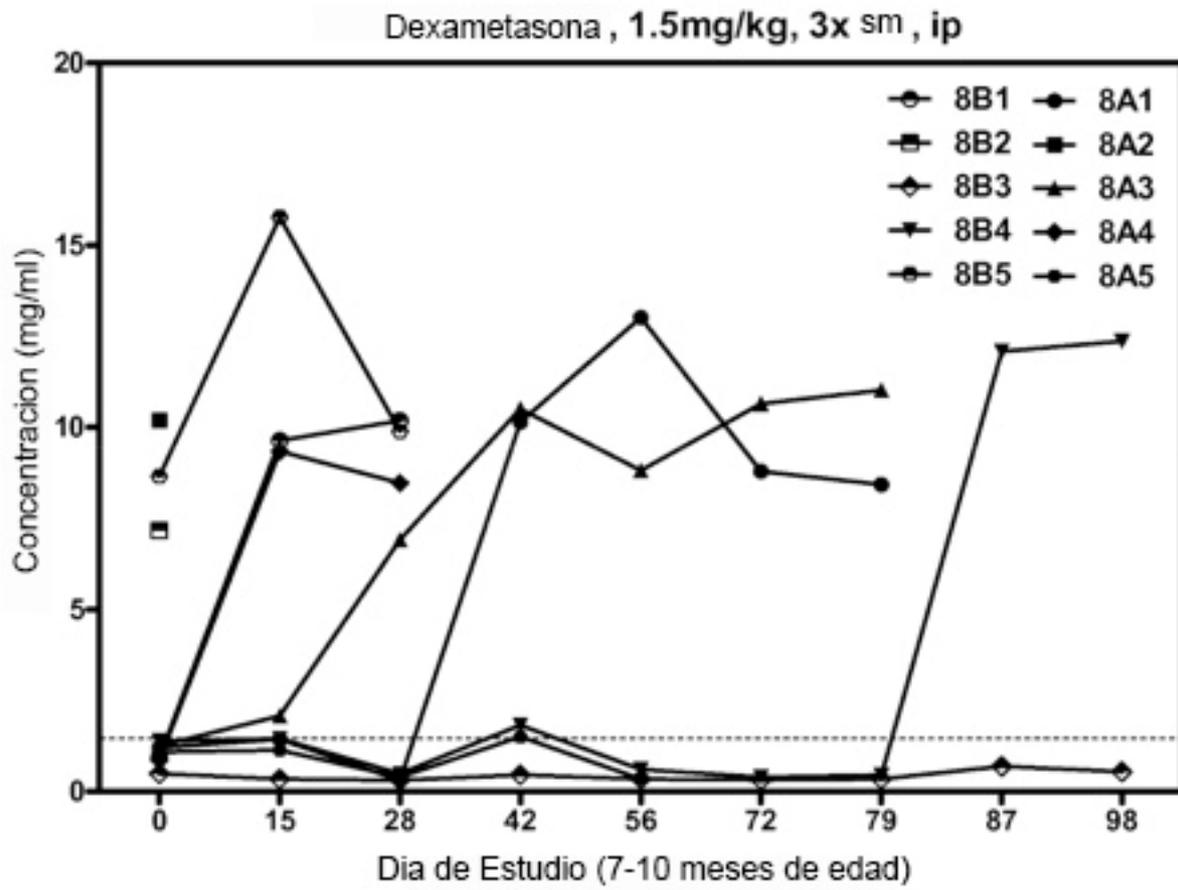
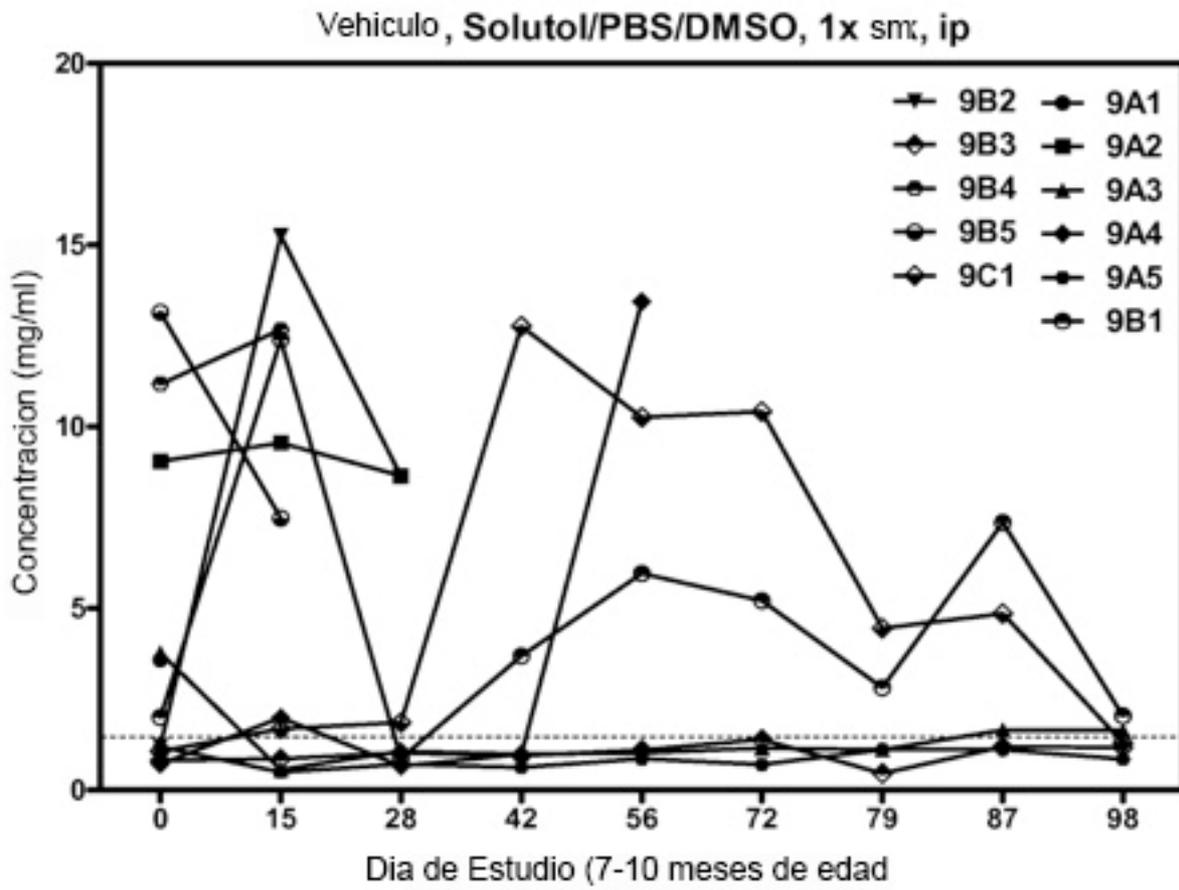


Fig. 18E



**Fig. 19**

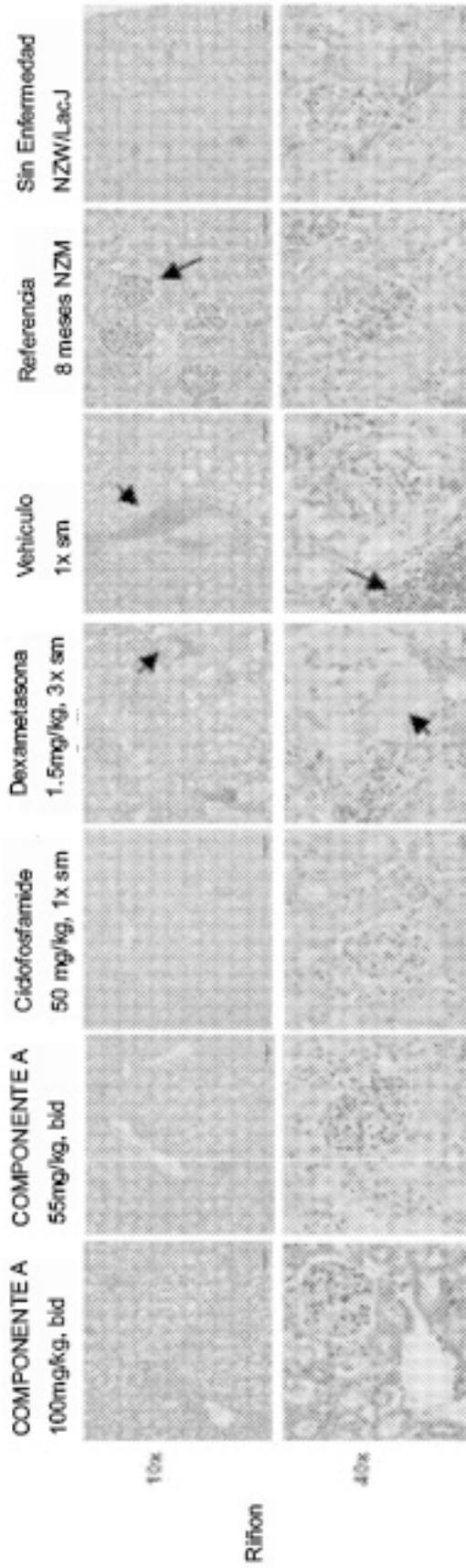


Fig. 20

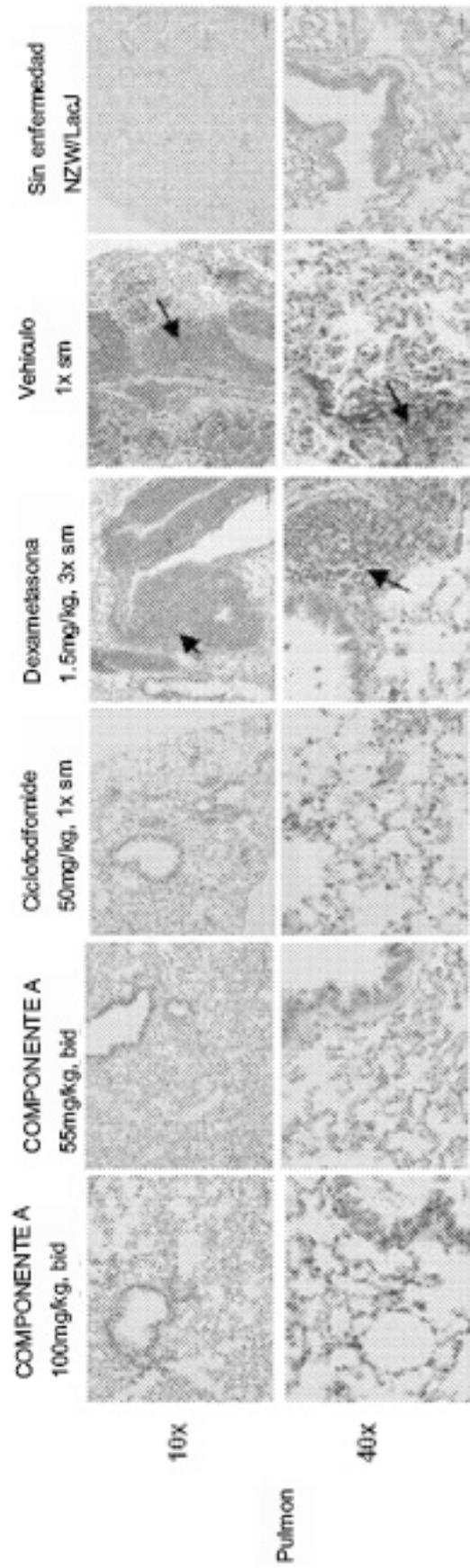


Fig. 21

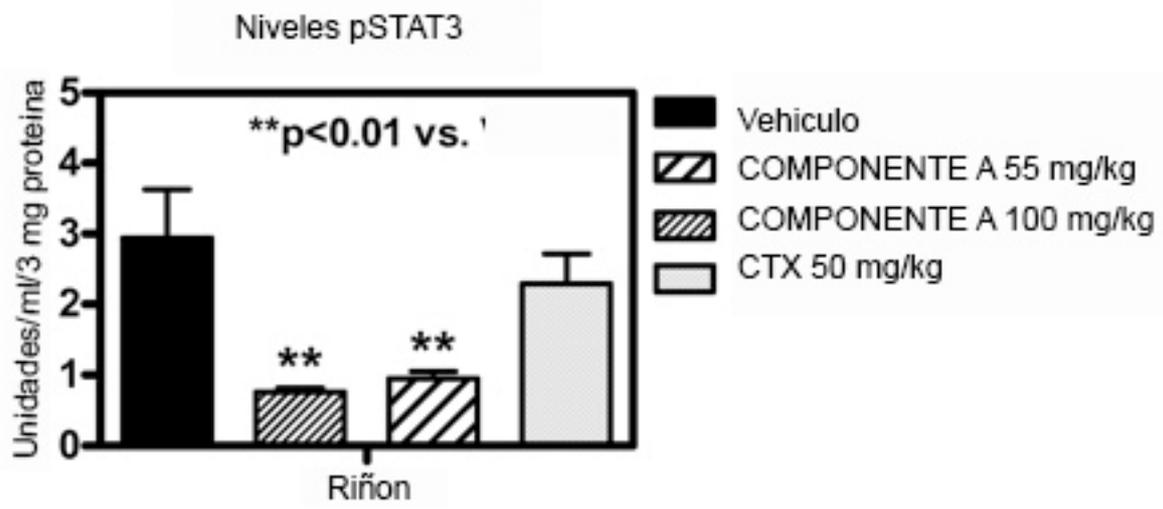
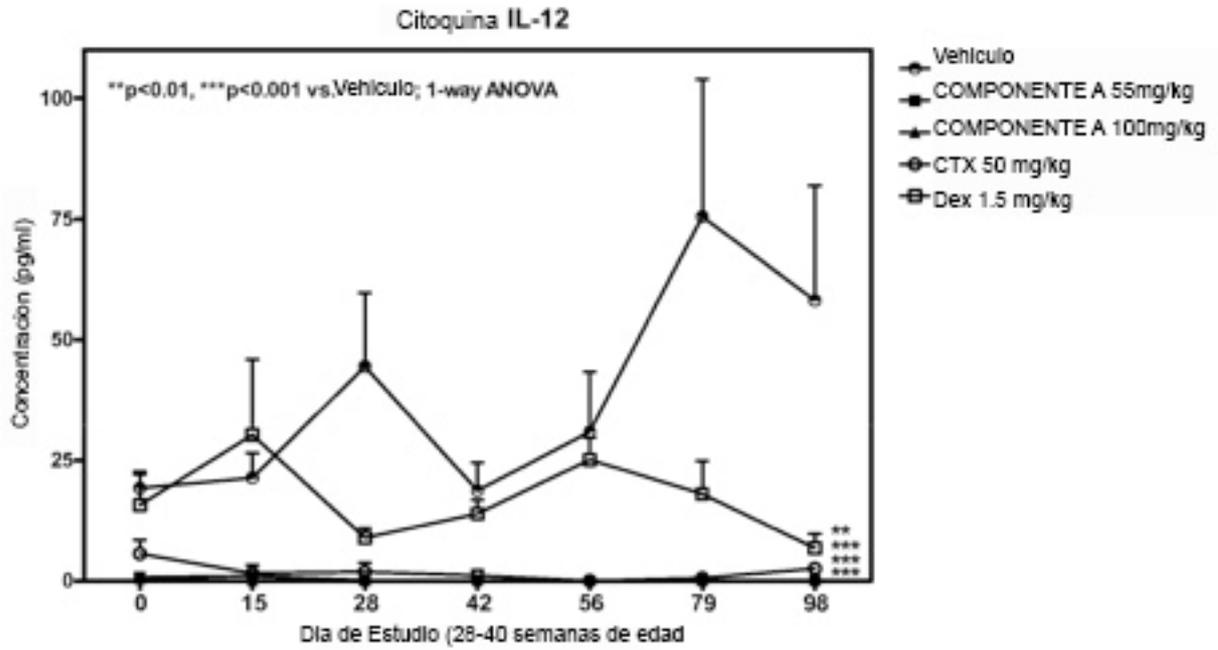
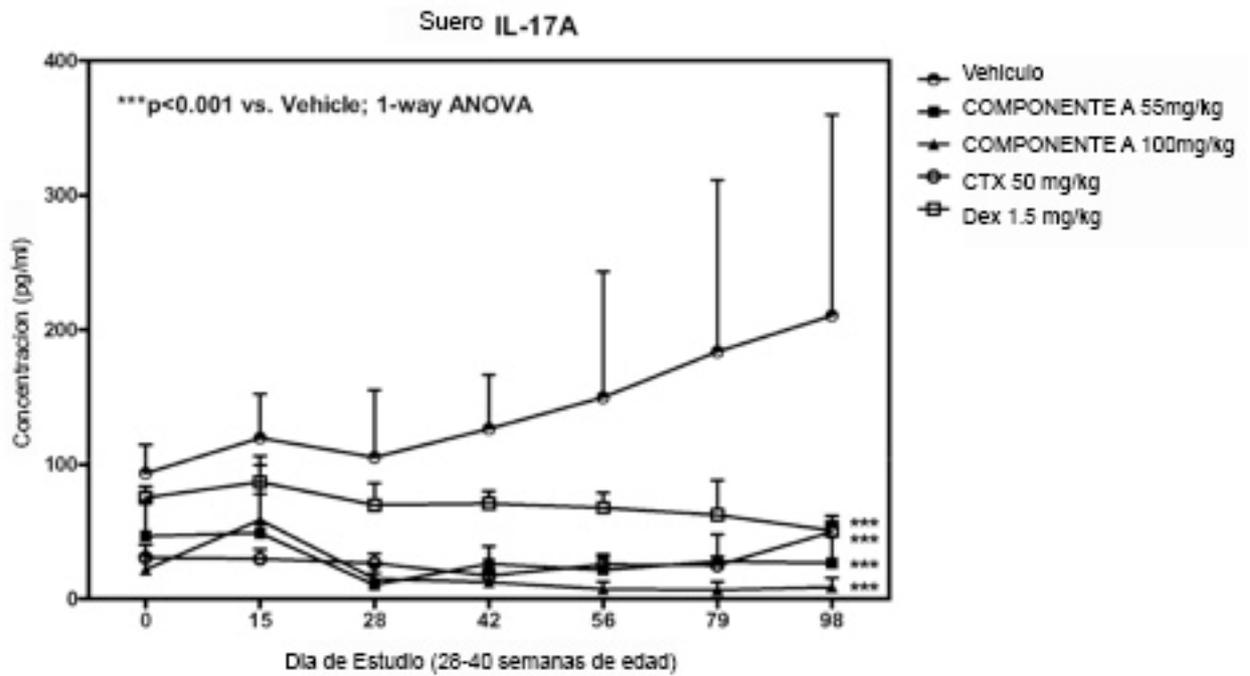


Fig. 22



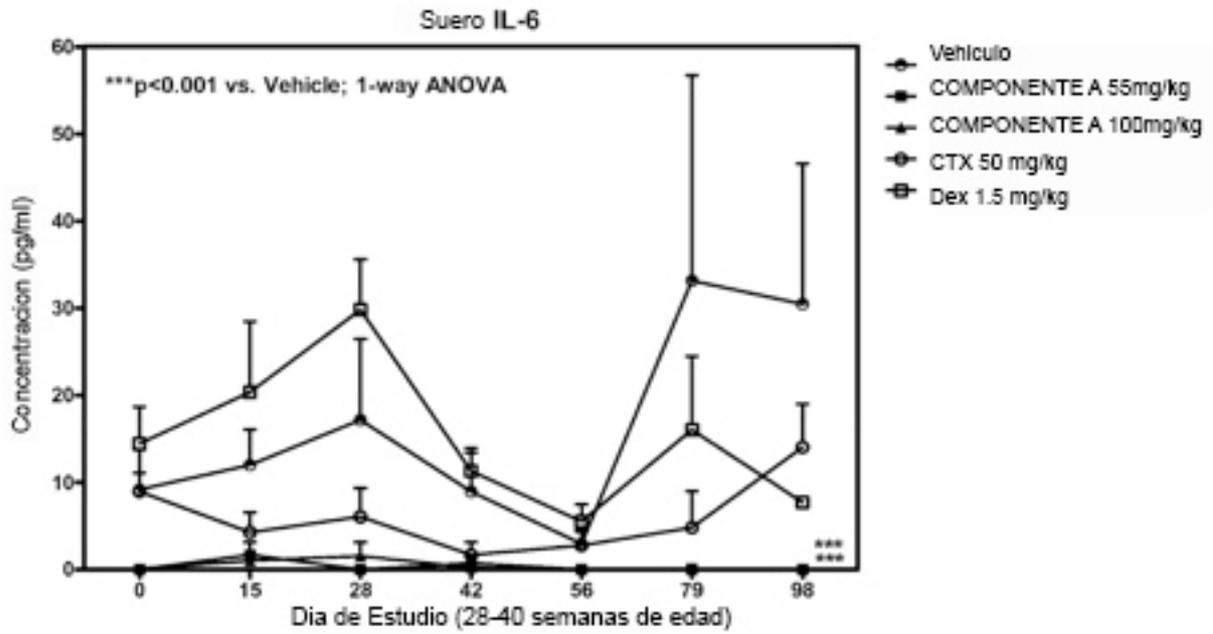
\*Los valores extremos en el grupo CTX excluidos del análisis y la representación gráfica como valores que excedieron 2.5x veces mas que la desviación estándar en el grupo

Fig. 23



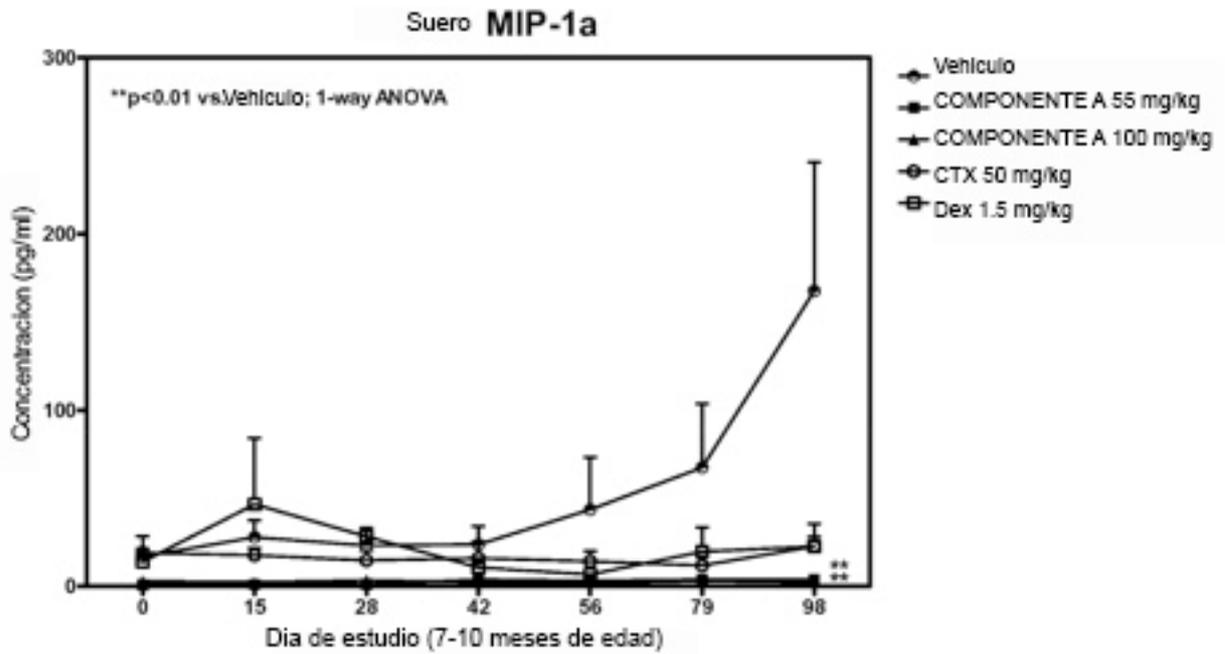
\*Los valores extremos en el grupo CTX excluidos del análisis y la representación gráfica como valores que excedieron 2.5x veces mas que la desviación estándar en el grupo

Fig. 24



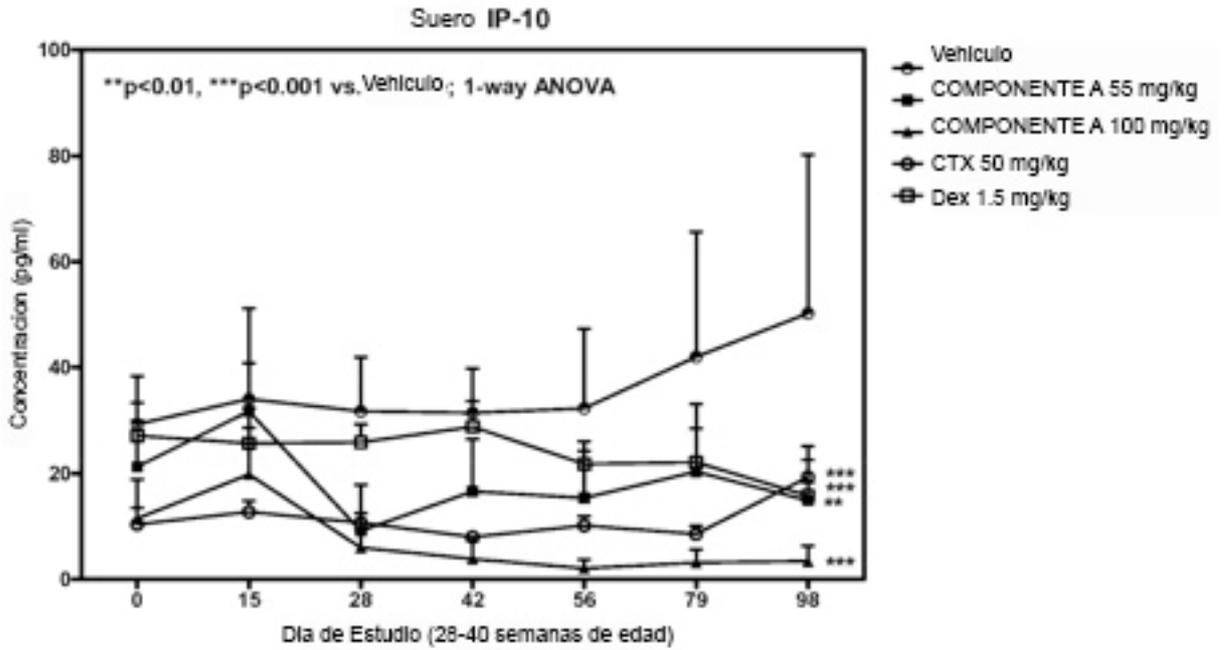
\*Los valores extremos en el grupo CTX excluidos del análisis y la representación gráfica como valores que excedieron 2.5x veces mas que la desviación estándar en el grupo

**Fig. 25**



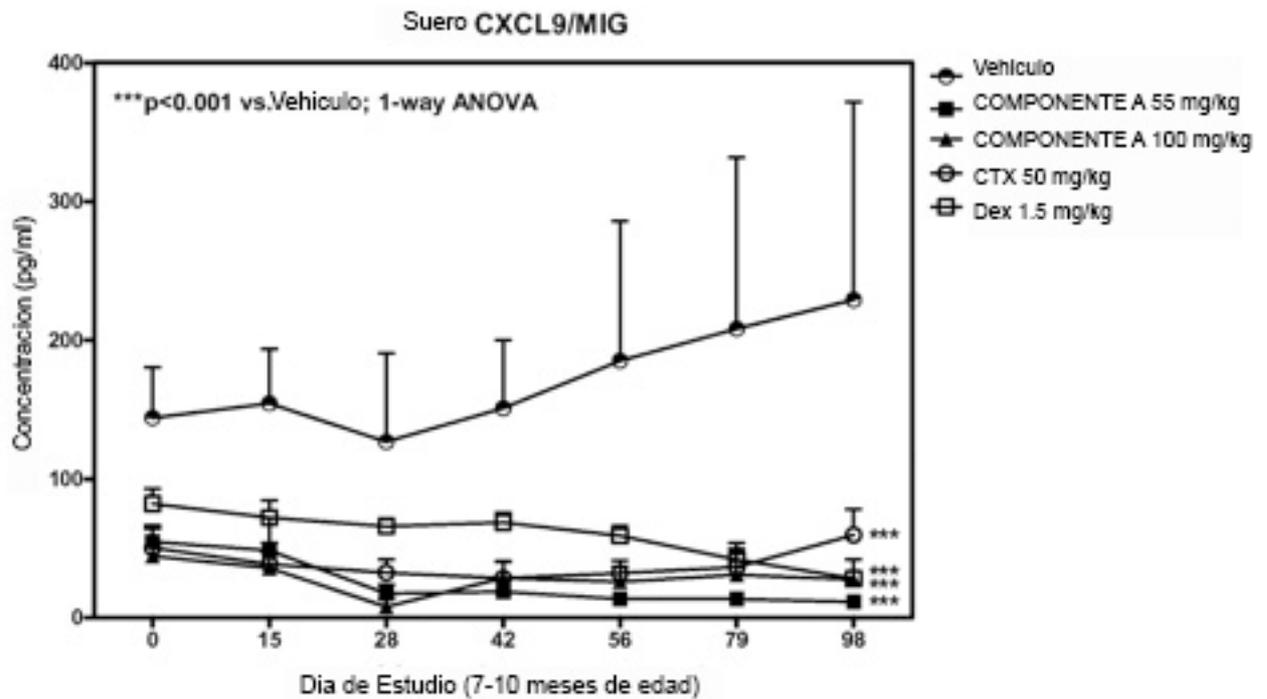
\*Los valores extremos en el grupo CTX excluidos del análisis y la representación gráfica como valores que excedieron 2.5x veces mas que la desviación estándar en el grupo

Fig. 26



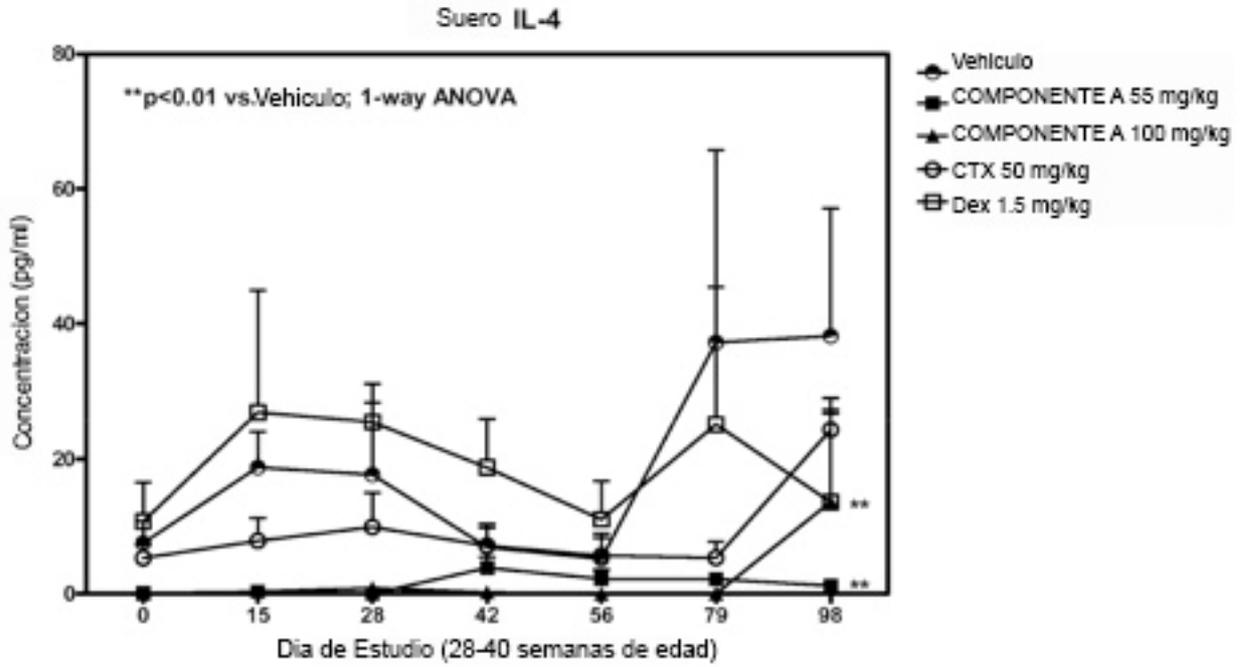
\*Los valores extremos en el grupo CTX excluidos del análisis y la representación gráfica como valores que excedieron 2.5x veces mas que la desviación estándar en el grupo

**Fig. 27**



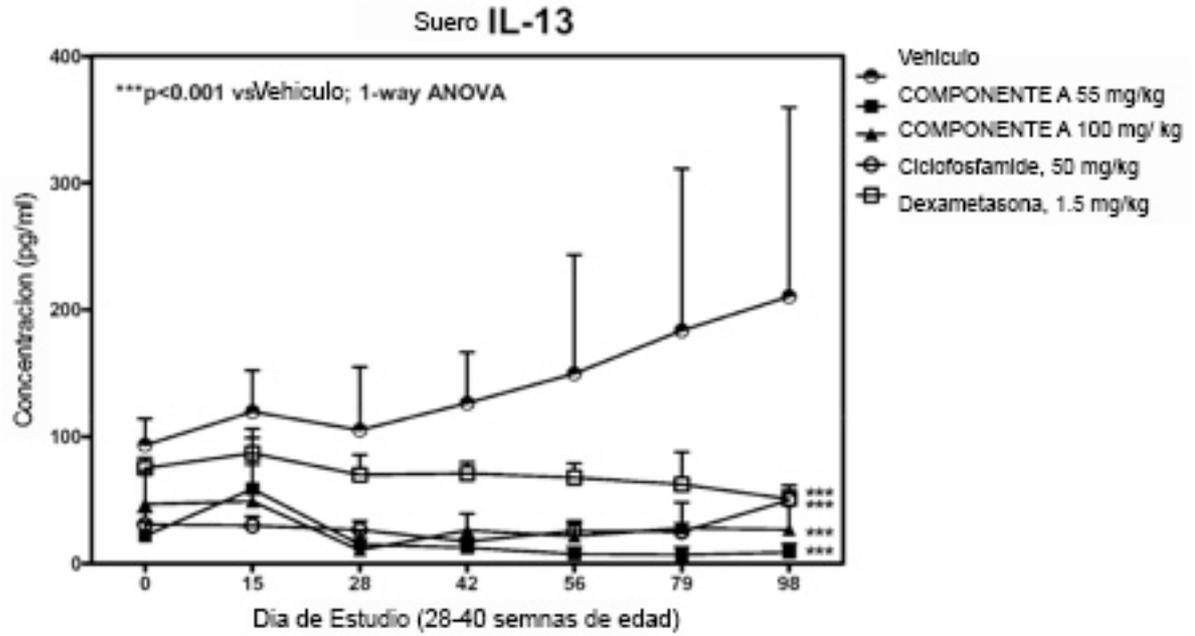
\*Los valores extremos en el grupo CTX excluidos del análisis y la representación gráfica como valores que excedieron 2.5x veces mas que la desviación estándar en el grupo

Fig. 28



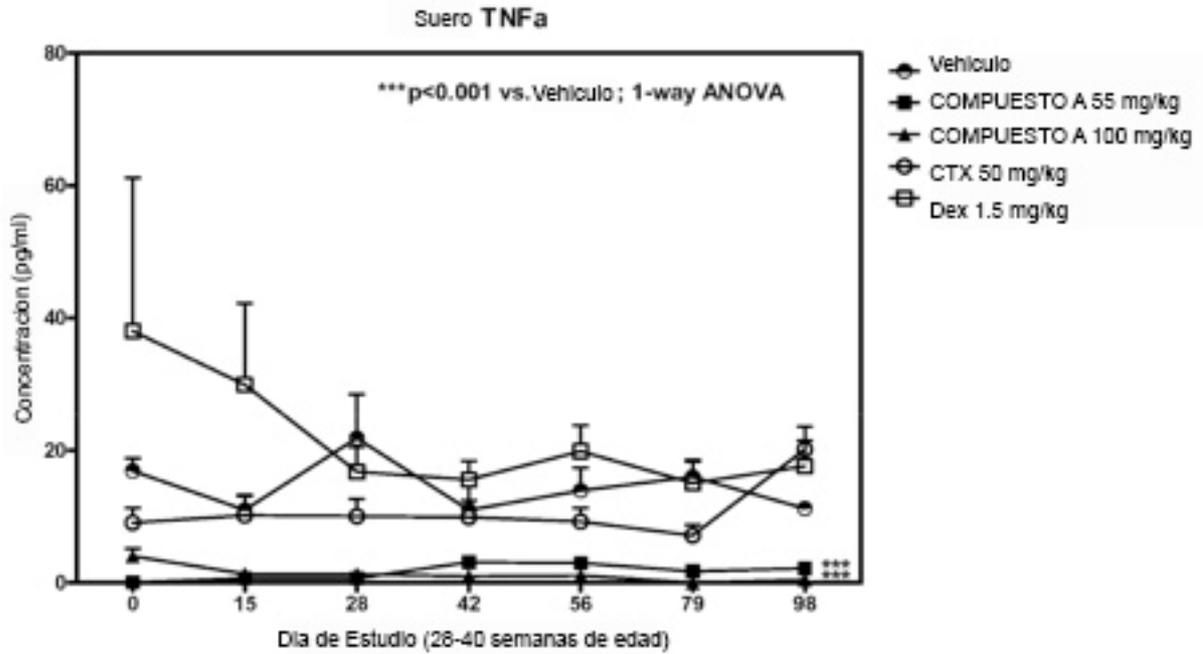
\*Los valores extremos en el grupo CTX excluidos del análisis y la representación gráfica como valores que excedieron 2.5x veces mas que la desviación estándar en el grupo

Fig. 29



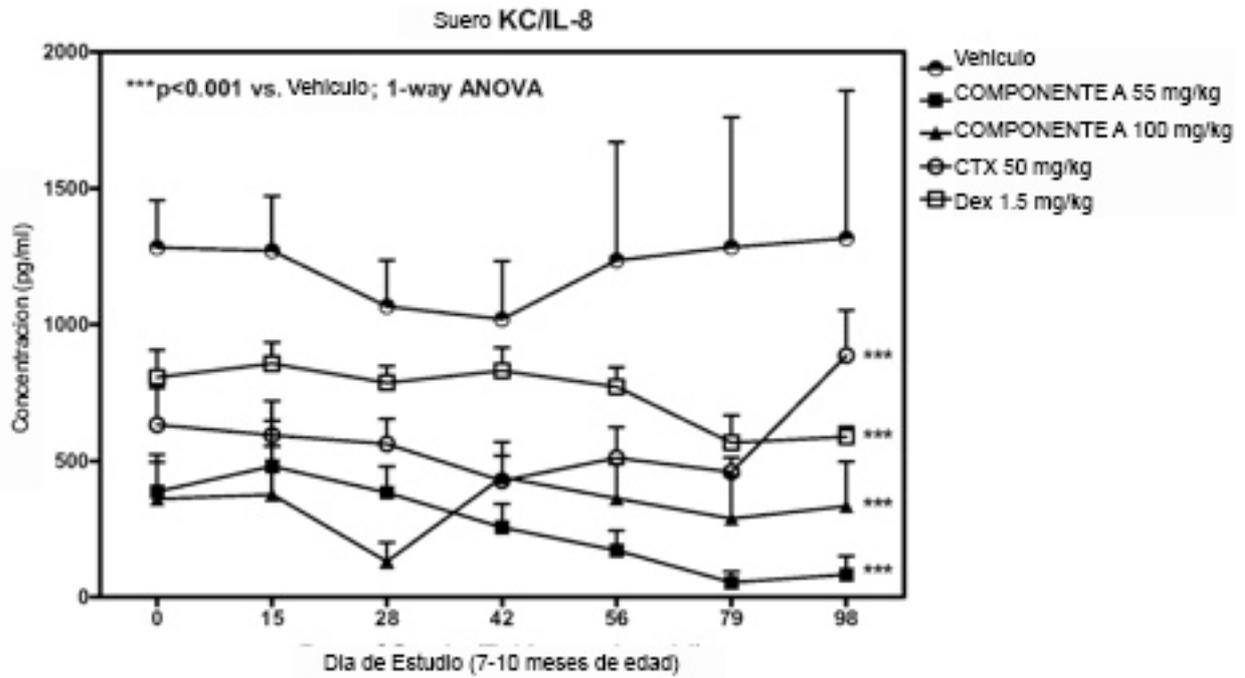
\*Los valores extremos en el grupo CTX excluidos del análisis y la representación gráfica como valores que excedieron 2.5x veces mas que la desviación estándar en el grupo

Fig. 30



\*Los valores extremos en el grupo CTX excluidos del análisis y la representación gráfica como valores que excedieron 2.5x veces mas que la desviación estándar en el grupo

Fig. 31



\*Los valores extremos en el grupo CTX excluidos del análisis y la representación gráfica como valores que excedieron 2.5x veces mas que la desviación estándar en el grupo

Fig. 32

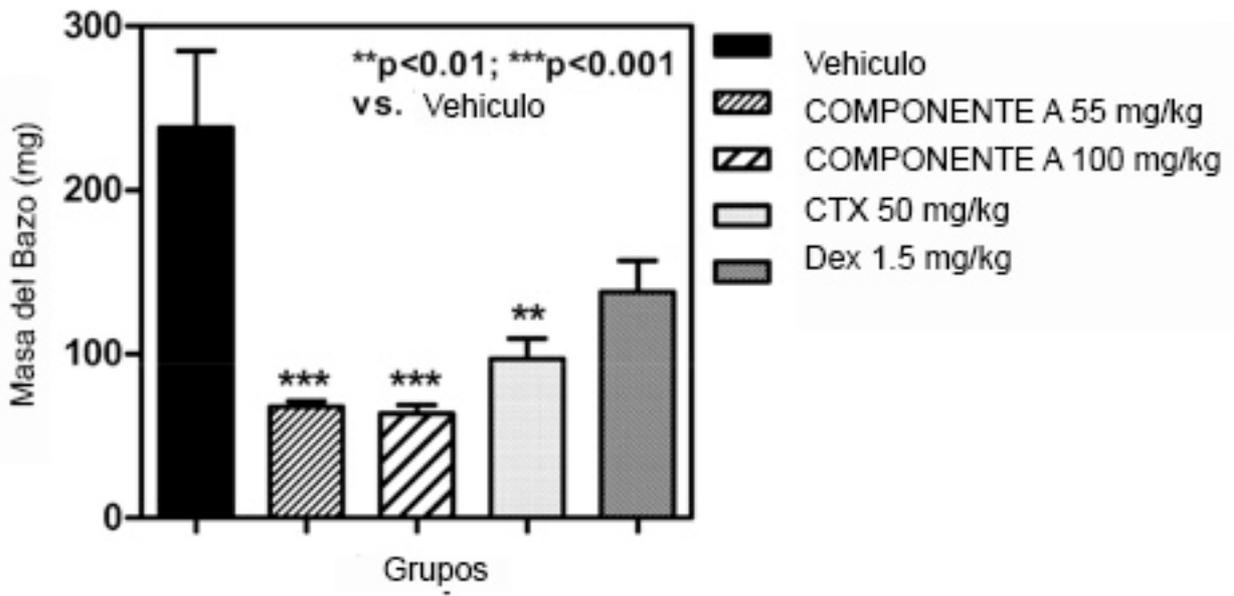


Fig. 33

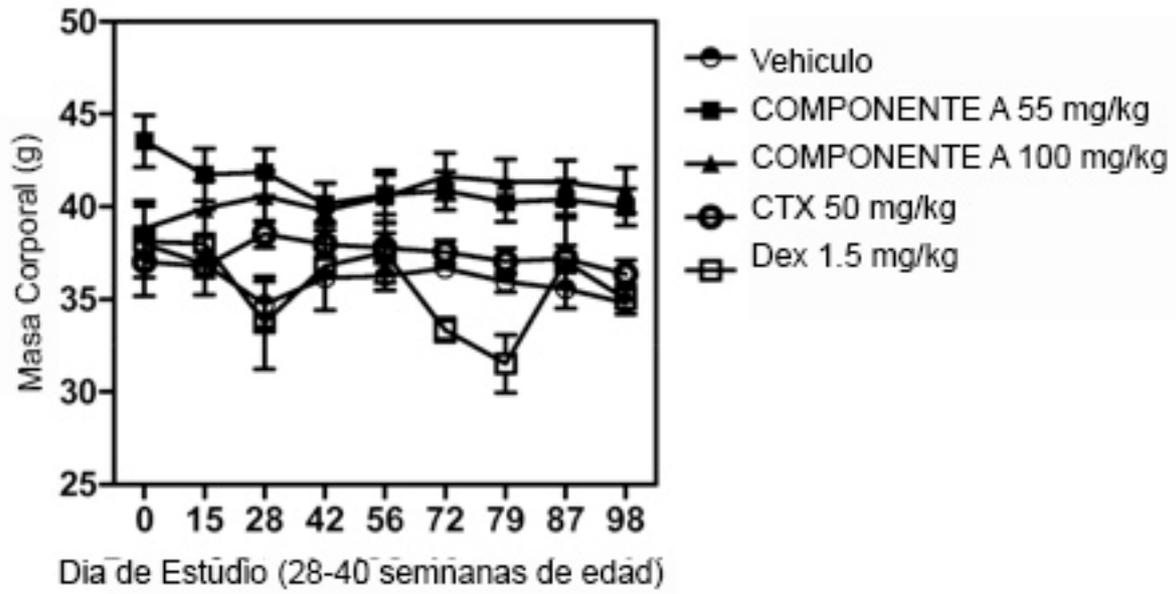
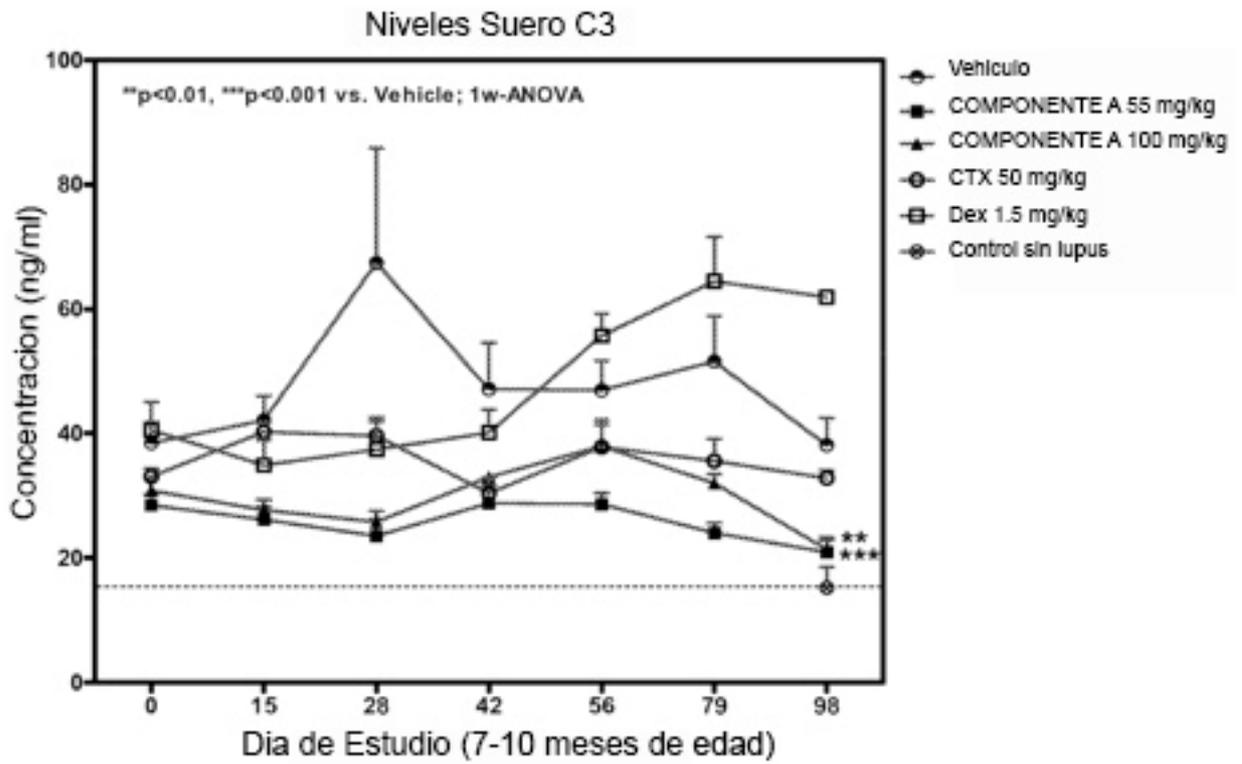


Fig. 34



**Fig. 35**

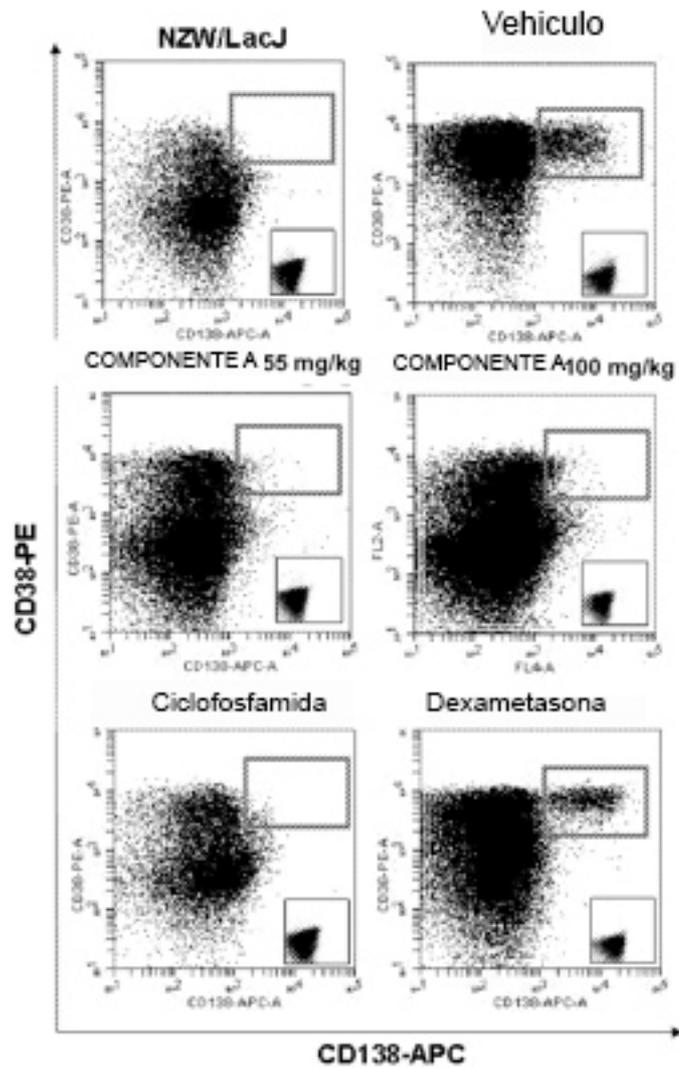
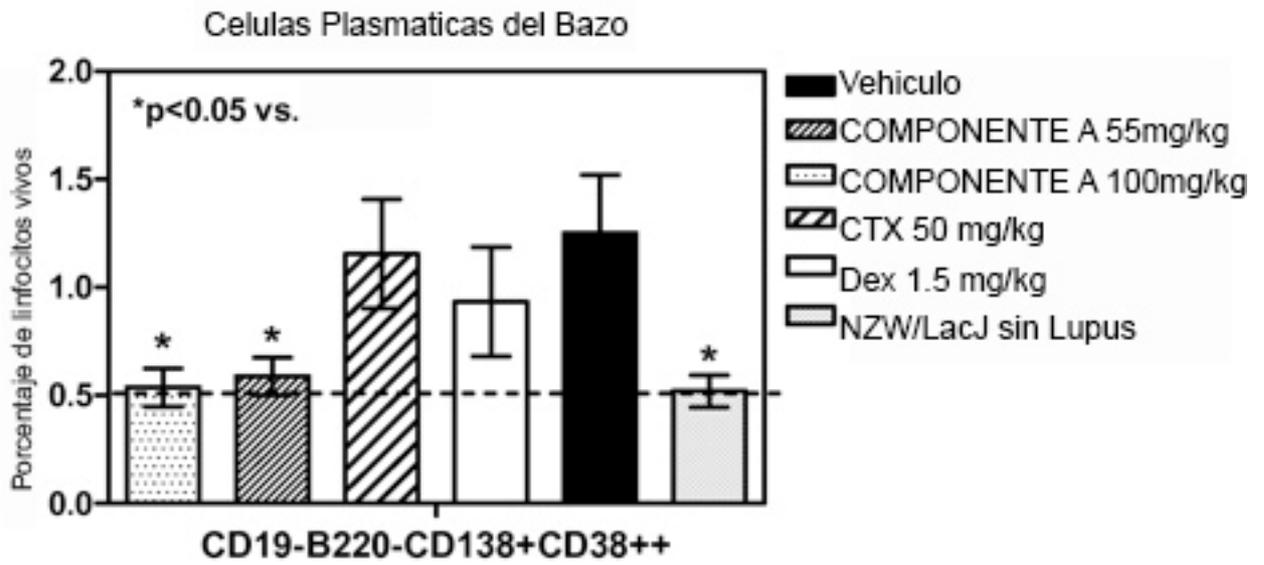


Fig. 36

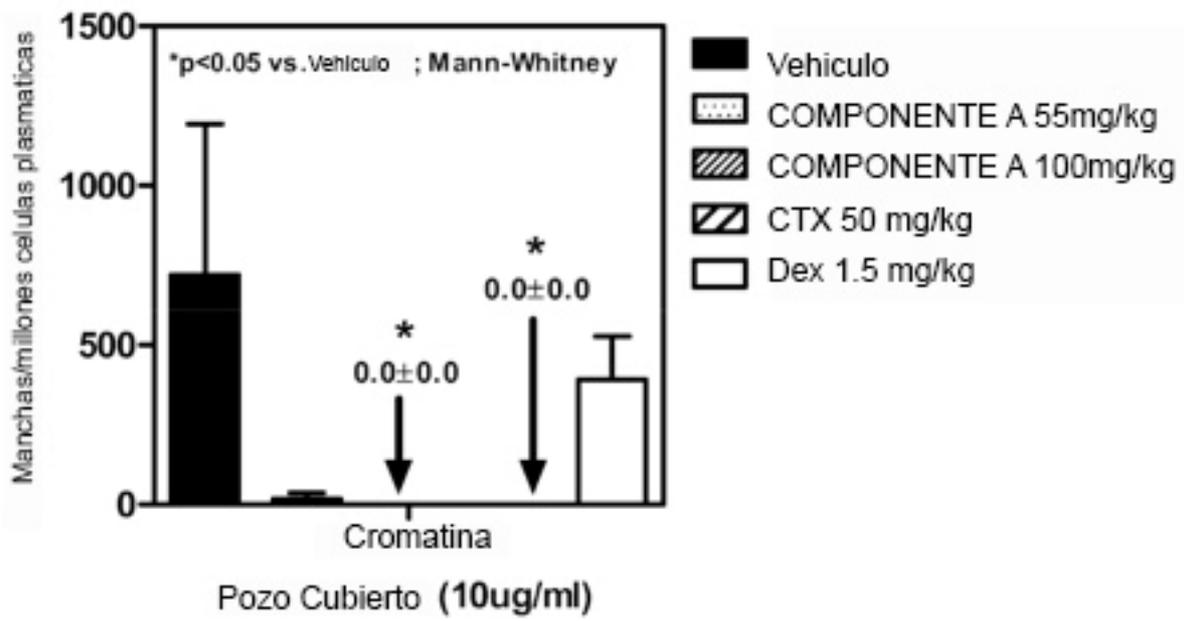


Fig. 37

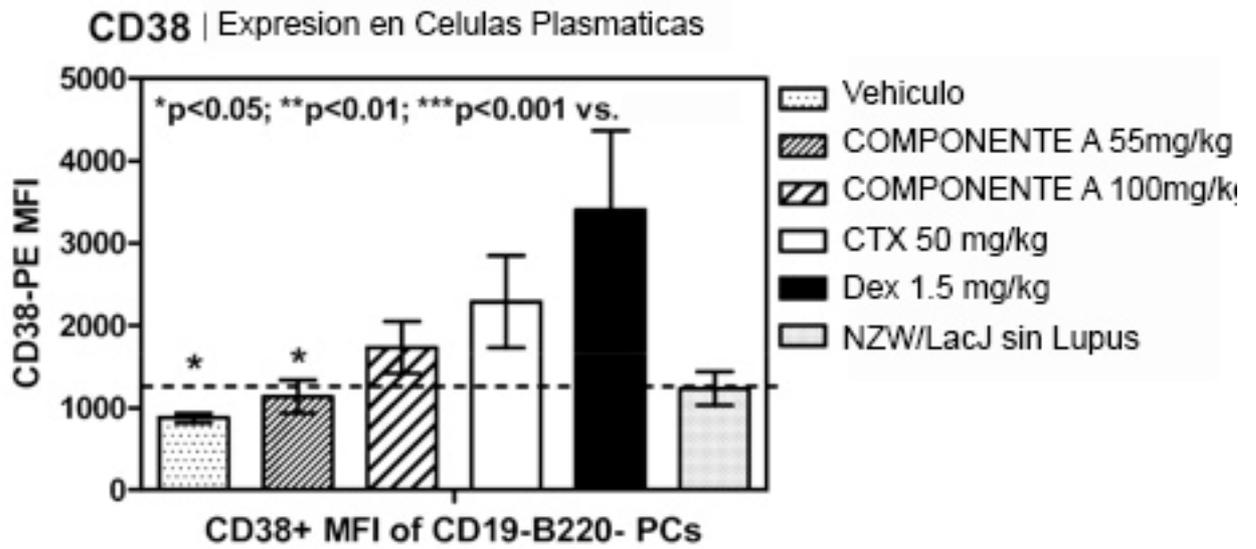


Fig. 38

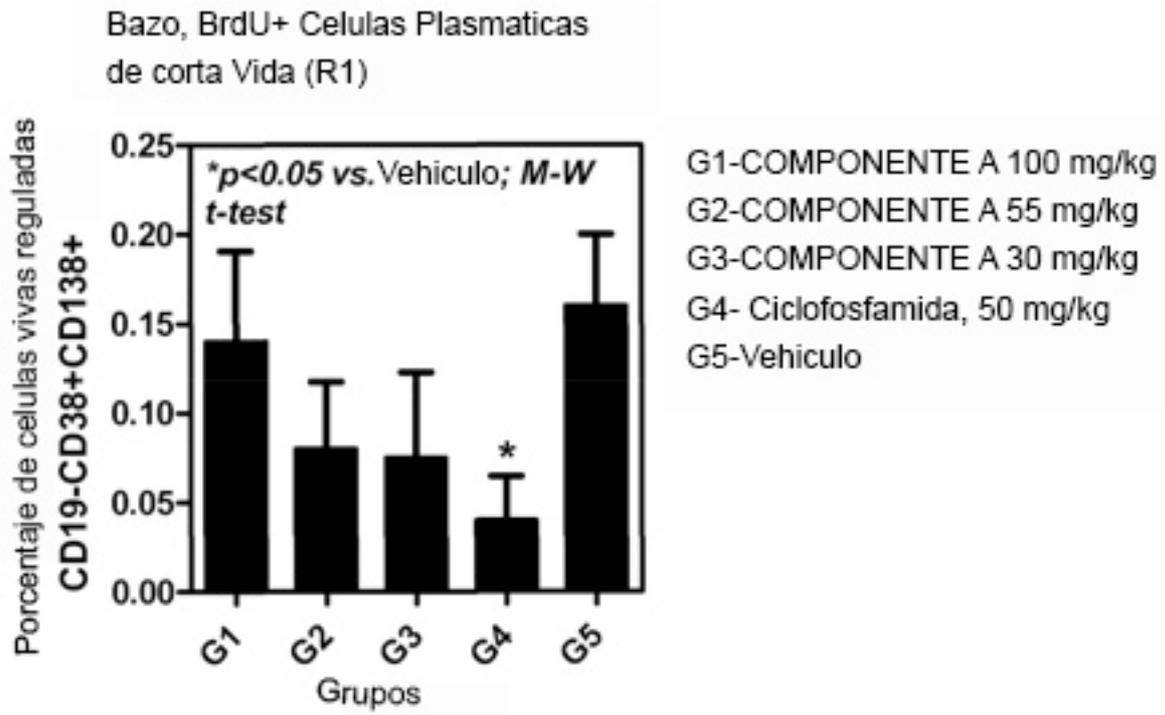
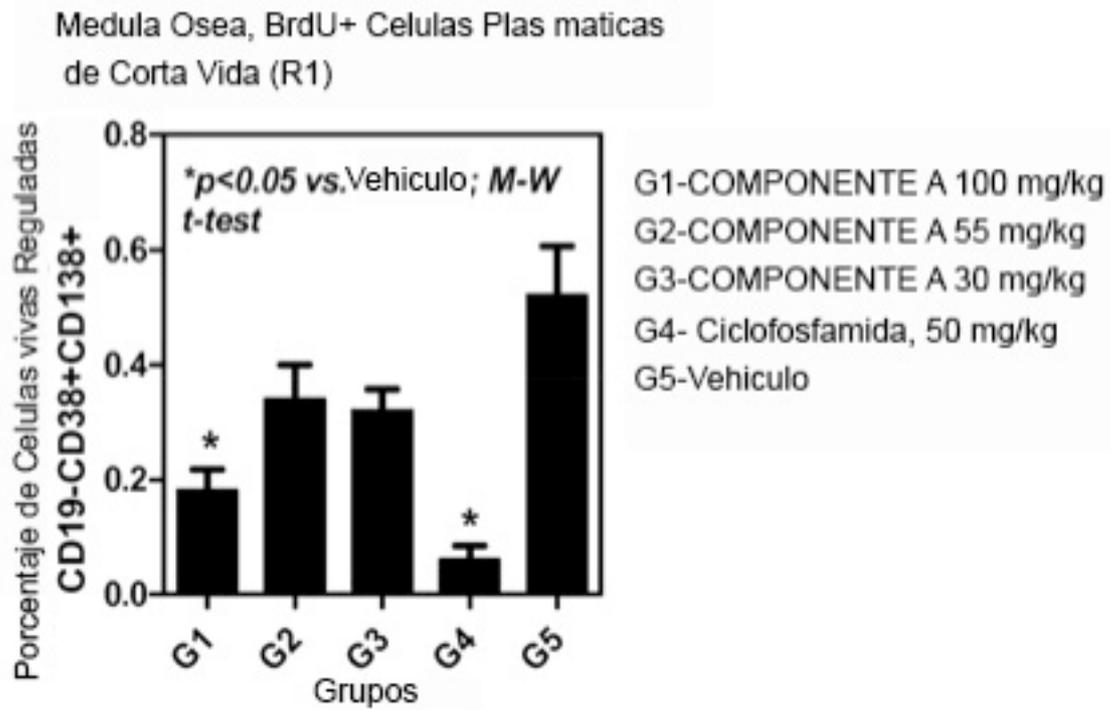


Fig. 39



**Fig. 40**

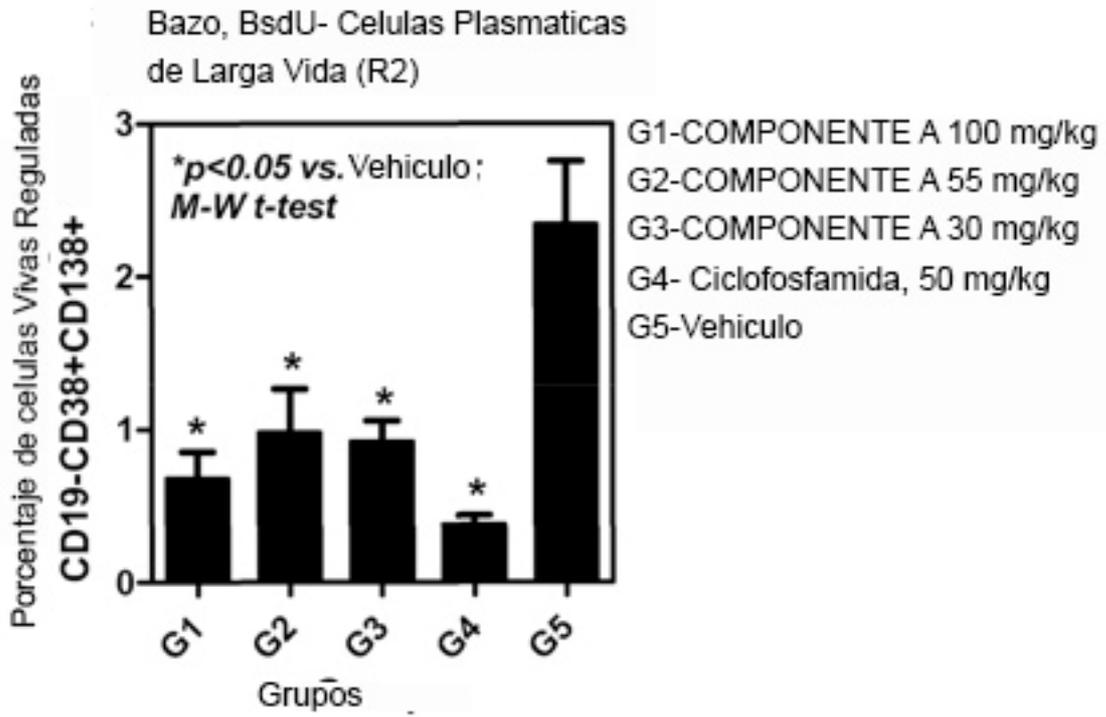
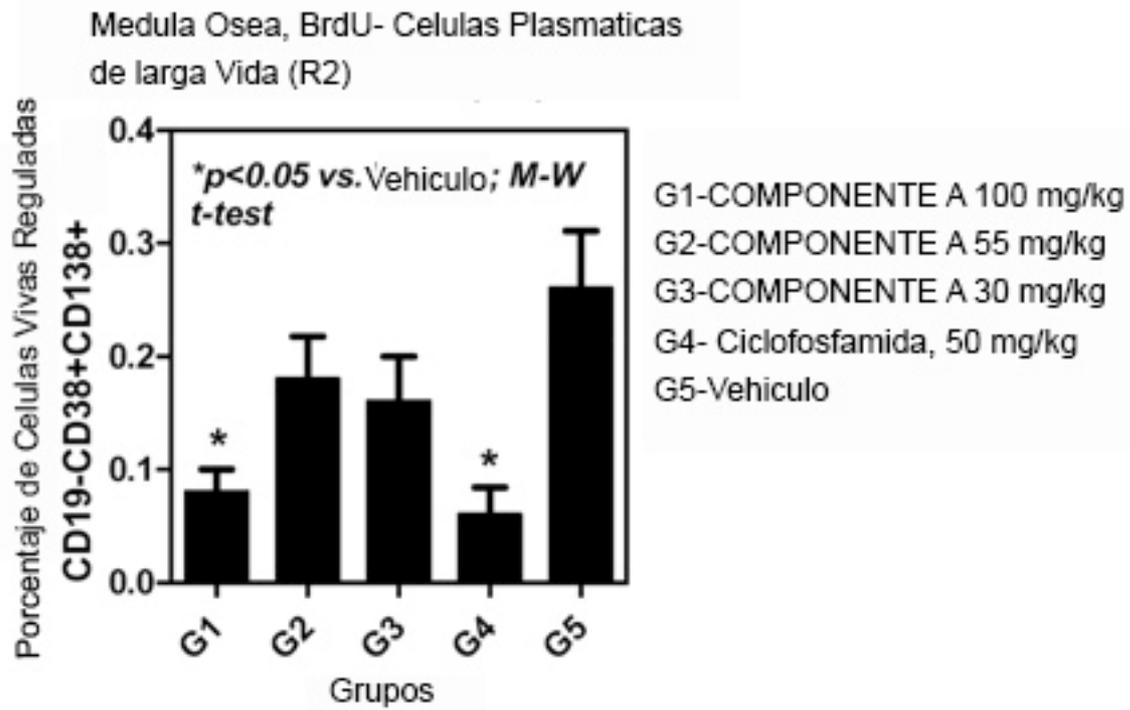


Fig. 41



**Fig. 42**

