

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 641 168**

51 Int. Cl.:

**A61K 31/519** (2006.01)

**A61K 31/455** (2006.01)

**A61P 35/00** (2006.01)

**A61K 45/06** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.06.2009 PCT/EP2009/004404**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.12.2009 WO09153043**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.06.2009 E 09765623 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.08.2017 EP 2296663**

54 Título: **Combinaciones que comprenden metotrexato e inhibidores de la DHODH**

30 Prioridad:

**20.06.2008 EP 08382022**

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

**08.11.2017**

73 Titular/es:

**ALMIRALL, S.A. (100.0%)  
Ronda General Mitre 151  
08022 Barcelona, ES**

72 Inventor/es:

**GODESSART MARINA, NURIA y  
PIZCUETA LALANZA, MARIA, PILAR**

74 Agente/Representante:

**PONS ARIÑO, Ángel**

ES 2 641 168 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Combinaciones que comprenden metotrexato e inhibidores de la DHODH

5 La presente invención se refiere a nuevas combinaciones de metotrexato con inhibidores de la dihidroorotato deshidrogenasa (DHODH). Estas combinaciones son útiles en el tratamiento, prevención o supresión de enfermedades y trastornos que se sabe que son susceptibles de mejoría con metotrexato y/o por inhibición de la dihidroorotato deshidrogenasa, tales como las enfermedades autoinmunitarias, las enfermedades inmunitarias e inflamatorias, los trastornos óseos destructivos, las enfermedades neoplásicas malignas, los trastornos relacionados con la angiogénesis, las enfermedades víricas y las enfermedades infecciosas.

### Antecedentes de la invención

15 El metotrexato (MTX) es un antimetabolito e inmunomodulador que afecta a muchas de las vías intracelulares del metabolismo de las purinas. Es eficaz reduciendo los signos y síntomas de la artritis reumatoide (AR), así como retrasando o frenando el daño radiográfico. Debido a su eficacia, facilidad de administración y coste relativamente bajo, el MTX se ha convertido en la terapia oral de primera línea en la mayoría de los pacientes con AR. En los pacientes que tienen una respuesta incompleta a MTX, se añade a éste otro FAME (fármaco antirreumático modificador de la enfermedad). Así, la terapia de combinación con MTX cada vez es más frecuente en la práctica clínica.

20 La leflunomida es un ejemplo de esta clase de FAME. Fue aprobado en setiembre de 1998 para su uso en la AR. Se ha demostrado que reduce los signos y síntomas de la enfermedad, que inhibe el daño estructural (demostrado radiográficamente por las erosiones y el estrechamiento del espacio articular) y que mejora la función física. La teriflunomida es el metabolito activo de la leflunomida.

30 Se cree que el metotrexato actúa principalmente sobre las vías del metabolismo celular de las purinas, mientras que la leflunomida afecta a las vías de las pirimidinas. Dada la diversidad de vías intracelulares afectadas por ambos fármacos, la combinación de leflunomida y metotrexato tiene el potencial de una sinergia bioquímica. En efecto, se ha dado a conocer que la combinación de ambos agentes condujo a una mejoría clínica considerable (véanse, por ejemplo, Weinblatt ME et al. "Pharmacokinetics, safety, and efficacy of combination treatment with methotrexate and leflunomide in patients with active rheumatoid arthritis". Arthritis Rheum 1999; 42 (7): 1322-8 y Kremer JM et al. "Concomitant Leflunomide therapy in patients with active rheumatoid arthritis despite stable doses of methotrexate". Ann. Intern. Med., 2002; 137, 726-733).

35 Desgraciadamente, tanto el metotrexato como la leflunomida tienen importantes efectos adversos, en particular, hepatotoxicidad. El metotrexato puede causar daño hepático mortal tal como fibrosis o cirrosis tras un uso prolongado. Frecuentemente se observa elevación de los niveles de enzimas hepáticas durante el tratamiento con metotrexato. Por tanto, es esencial un seguimiento cuidadoso y regular de los pacientes que toman MTX, en particular cuando el MTX se combina con otros FAME.

45 Los efectos adversos descritos más habitualmente para la leflunomida incluyen diarrea, dispepsia, erupción, caída del cabello, hipertensión y elevación de los niveles de las enzimas hepáticas. La hepatotoxicidad potencial es de especial relevancia y deben efectuarse análisis clínicos con regularidad, incluyendo análisis de sangre de la función hepática, en los pacientes que están tomando esta medicación. No se recomienda leflunomida para su uso en pacientes con signos de infección por el virus de la hepatitis B o C una disfunción hepática significativa.

50 Los ensayos clínicos han descrito que el número de pacientes que experimentan una elevación de los marcadores hepáticos (medidos como niveles de transaminasas) es notablemente más alto en el grupo de leflunomida + MTX que en el grupo de MTX en solitario. La información sobre el producto para leflunomida advierte contra la combinación con metotrexato basándose en que dicha terapia de combinación puede conducir a hepatotoxicidad aditiva o incluso sinérgica.

55 El mecanismo responsable de la hepatotoxicidad de la leflunomida, y en particular de su metabolito activo, teriflunomida, es desconocido, pero se ha atribuido a su actividad como inhibidor de la dihidroorotato deshidrogenasa (DHODH). Así, la toxicidad hepática se ha identificado como un efecto adverso directamente derivado del mecanismo de acción de los inhibidores de la DHODH, que ha impedido el desarrollo de esta clase de compuestos.

### 60 Descripción de la invención

Ahora se ha descubierto que, al contrario de la creencia general, la inhibición de la DHODH no es responsable del daño hepático producido por la leflunomida y que los inhibidores de la DHODH son particularmente adecuados para su combinación con metotrexato.

65 Se sabe que la inhibición de la DHODH produce efectos inmunosupresores y antiproliferativos. Por lo tanto, los

inhibidores de la DHODH podrían usarse como inmunosupresores y como antiproliferativos en el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias, inflamatorias y proliferativas, como la AR.

5 La invención se basa en el sorprendente hallazgo de que la inhibición de la DHODH no está vinculada a la hepatotoxicidad y, consecuentemente, los inhibidores de la DHODH que están desprovistos de potencial hepatotóxico representan una contribución importante al tratamiento de estas enfermedades, gracias a su ventajosa capacidad de combinación con MTX, el fármaco de primera línea más ampliamente utilizado en el tratamiento de la AR.

10 Los inventores han desarrollado un modelo *in vivo* de evaluación de la hepatotoxicidad en ratones, en el cual los compuestos de ensayo se administran por vía intraperitoneal para maximizar la exposición del hígado. En este modelo, la teriflunomida, el metabolito activo de leflunomida, ha mostrado una elevación espectacular en los niveles de transaminasas y bilirrubina en plasma, mientras que los inhibidores de la DHODH no muestran elevación de ninguno de los marcadores hepáticos en el plasma en el mismo modelo, a la vez que mantienen su eficacia en la artritis.

15 Por lo tanto, la presente invención se refiere a un producto de combinación que comprende (a) metotrexato y (b) y un inhibidor de la DHODH que es ácido 2-(3'-etoxi-3,5-difluorobifenil-4-ilamino)nicotínico, ácido (3,5-difluoro-3'-metoxibifenil-4-ilamino)nicotínico, ácido 2-(3'-ciclopropoxi-3,5-difluorobifenil-4-ilamino)nicotínico o ácido 2-(3,5-difluoro-3'-metoxibifenil-4-ilamino)-5-metilnicotínico o una sal farmacéuticamente aceptable o N-óxido del mismo.

20 Tal como se usa en la presente memoria, la expresión sal farmacéuticamente aceptable incluye sales de un ácido o base farmacéuticamente aceptable. Ácidos farmacéuticamente aceptables incluyen tanto ácidos inorgánicos, por ejemplo, ácidos clorhídrico, sulfúrico, fosfórico, difosfórico, bromhídrico, yodhídrico y nítrico, como ácidos orgánicos, por ejemplo, ácidos cítrico, fumárico, maleico, málico, mandélico, ascórbico, oxálico, succínico, tartárico, benzoico, acético, metanosulfónico, etanosulfónico, bencenosulfónico, ciclohexilsulfámico (ciclámico) o p-toluenosulfónico. Bases farmacéuticamente aceptables incluyen hidróxidos de metales alcalinos (por ejemplo sodio o potasio) y de metales alcalinotérreos (por ejemplo calcio o magnesio) y bases orgánicas, por ejemplo, alquilaminas, arilalquilaminas y aminas heterocíclicas.

25 Otras sales preferidas de acuerdo con la invención son compuestos de amonio cuaternario en los que un equivalente de un anión (X-) se asocia con la carga positiva del átomo de N. X- puede ser un anión de diversos ácidos minerales tales como por ejemplo cloruro, bromuro, yoduro, sulfato, nitrato, fosfato, o un anión de un ácido orgánico tal como por ejemplo acetato, maleato, fumarato, citrato, oxalato, succinato, tartrato, malato, mandelato, trifluoroacetato, metanosulfonato y p-toluenosulfonato. Preferiblemente, X- es un anión seleccionado de cloruro, bromuro, yoduro, sulfato, nitrato, acetato, maleato, oxalato, succinato o trifluoroacetato. Más preferiblemente, X- es cloruro, bromuro, yoduro, trifluoroacetato o metanosulfonato.

30 Tal como se usa en la presente memoria, se forma un N-óxido a partir de las aminas o iminas básicas terciarias presentes en la molécula, usando un agente oxidante adecuado.

35 Preferiblemente los principios activos (a) y (b) forman parte de una sola composición farmacéutica.

40 Además, se proporciona una combinación como se ha descrito anteriormente que comprende además (c) otro compuesto seleccionado de:

- 45
- (i) Anticuerpos monoclonales anti-TNF-alfa tales como infliximab, certolizumab pegol, golimumab, adalimumab y AME-527 de Applied Molecular Evolution;
  - (ii) Antagonistas de TNF-alfa tales como etanercept, lenercept, onercept y pegsunercept;
  - 50 (iii) Inhibidores de la calcineurina (PP-2B)/Inhibidores de la expresión de INS tales como ciclosporina A, tacrolimus e ISA-247 de Isotechnika;
  - (iv) Antagonistas del receptor de IL-1 tales como anakinra y AMG-719 de Amgen;
  - (v) Anticuerpos monoclonales anti-CD20 tales como rituximab, ofatumumab, ocrelizumab y TRU-015 de Trubion Pharmaceuticals;
  - 55 (vi) Inhibidores de p38 tales como AMG-548 (de Amgen), ARRY-797 (de Array Biopharma), edisilato de clormetiazol, doramapimod, PS-540446 (de BMS), SB-203580, SB-242235, SB-235699, SB-281832, SB-681323, SB-856553 (todos de GlaxoSmithKline), KC-706 (de Kemia), LEO-1606, LEO-15520 (todos de Leo), SC-80036, SD-06 (todos de Pfizer), RWJ-67657 (de R. W. Johnson), RO-3201195, RO-4402257 (todos de Roche), AVE-9940 (de Aventis), SCIO-323, SCIO-469 (todos de Scios), TA-5493 (de Tanabe Seiyaku), y VX-745 y VX-702 (todos de Vertex);
  - 60 (vii) Inhibidores de la activación de NF-kappaB (NFKB) tales como sulfasalazina e iguratimod;
  - (viii) Otro inhibidor de la dihidrofolato reductasa (DHFR) tal como aminopterina y CH-1504 de Chelsea;
  - (ix) Inhibidores de la quinasa Janus (JAK), tales como CP-690, 550 de Pfizer e INCB-18424, de Incyte;
  - (x) Inhibidor de MEK, tal como ARRY-162 de Array;
  - 65 (xi) Agonistas de los receptores de 1-fosfato de esfingosina, tales como fingolimod (Novartis);
  - (xii) Interferones que comprenden interferón beta 1a tal como Avonex de Biogen Idee, CinnoVex de CinnaGen y

Rebif de Merck Serono, e interferón beta 1b tal como Betaferon de Schering y Betaseron de Berlex.  
(xiii) Inmunomoduladores tales como BG-12 (derivado del ácido fumárico) de Biogen Idec/Fumapharm AG;  
(xiv) Inhibidores de la adenosina aminohidrolasa tales como cladribina de Merck Serono.

5 La presente invención proporciona además el uso de (a) metotrexato y (b) un inhibidor de la DHODH de la invención para la preparación de un medicamento para su uso simultáneo, separado o secuencial en el tratamiento de una afección patológica o enfermedad seleccionada de artritis reumatoide, artritis psoriásica, espondilitis anquilosante, esclerosis múltiple, granulomatosis de Wegener, lupus eritematoso sistémico, psoriasis y sarcoidosis.

10 Preferiblemente la afección patológica o enfermedad es artritis reumatoide, artritis psoriásica o psoriasis. Lo más preferiblemente es artritis reumatoide.

También se proporciona una combinación que comprende (a) interferones tales como interferón beta 1a o interferón beta 1b y (b) un inhibidor de la DHODH de la invención, preferiblemente un inhibidor de la DHODH de fórmula (I).

15 También se proporciona el uso de una combinación que comprende (a) Interferones tales como interferón beta 1a o interferón beta 1b, y (b) un inhibidor de la DHODH de la invención, preferiblemente un inhibidor de la DHODH de fórmula (I) para la preparación de un medicamento para su uso simultáneo, separado o secuencial en el tratamiento de la esclerosis múltiple.

20 También se proporciona un producto que comprende (a) metotrexato y (b) un inhibidor de la DHODH de la invención, como preparación combinada para su uso simultáneo, separado o secuencial en el tratamiento de un paciente humano o animal que padece o es susceptible de padecer una afección patológica o enfermedad de las definidas anteriormente. Opcionalmente, dicho producto puede comprender además un compuesto activo (c), como se ha definido anteriormente.

25 También se proporciona un kit que comprende (b) un inhibidor de la DHODH de la invención junto con instrucciones para su uso simultáneo, separado o secuencial en combinación con (a) metotrexato, para el tratamiento de un paciente humano o animal que padece o es susceptible de padecer una afección patológica o enfermedad de las definidas anteriormente. Opcionalmente, dicho kit puede comprender además un compuesto activo (c), como se ha definido anteriormente.

30 También se proporciona un envase que comprende (b) un inhibidor de la DHODH de la invención y (a) metotrexato, para su uso simultáneo, separado o secuencial en el tratamiento de una afección patológica o enfermedad como se ha definido anteriormente. Opcionalmente, dicho envase puede comprender además un compuesto activo (c), como se ha definido anteriormente.

35 También se proporciona un uso de (b) un inhibidor de la DHODH de la invención para la preparación de un medicamento, para su uso en combinación con (a) metotrexato, para el tratamiento de una afección patológica o enfermedad como se ha definido anteriormente.

40 También se proporciona un uso de (a) metotrexato, para la preparación de un medicamento, para su uso en combinación con (b) un inhibidor de la DHODH de la invención, para el tratamiento de una afección patológica o enfermedad como se ha definido anteriormente.

45 También se proporciona un uso como se ha definido anteriormente en el que el metotrexato (a) es para administración según una pauta posológica que implica la administración de 0,015 a 3 mg/kg/semana de metotrexato y el inhibidor de la DHODH (b) es para administración según una pauta posológica que implica la administración de 0,03 a 30 mg/kg/día de un inhibidor de la DHODH.

50 Generalmente el medicamento es para su uso en el tratamiento de un paciente humano o animal que padece o es susceptible de padecer insuficiencia hepática o una afección que se agravaría a causa de la hepatotoxicidad. Más generalmente, el paciente humano o animal padece fibrosis hepática, hepatitis (generalmente hepatitis A a G), cirrosis (generalmente causada por alcoholismo) o cáncer de hígado.

55 En una realización de la presente invención, la combinación, producto, kit o partes del envase comprende (b) un inhibidor de la DHODH de la invención y (a) metotrexato, como únicos componentes activos.

60 El hecho de que los inhibidores de la DHODH de la invención tengan menos efectos secundarios hepáticos es un hallazgo de la invención. Por lo tanto, la presente invención también proporciona el uso de un inhibidor de la DHODH de la invención, como se ha definido anteriormente, en la fabricación de un medicamento para su uso en el tratamiento o en la prevención de una afección patológica o enfermedad, como se ha definido anteriormente, en un paciente humano o animal que padece o es susceptible de padecer insuficiencia hepática o un estado que se agravaría por hepatotoxicidad, como se ha definido anteriormente.

65 También se proporciona una combinación tal como se ha definido anteriormente para su uso en el tratamiento de

una afección patológica o enfermedad como se ha definido anteriormente.

También se proporciona un inhibidor de la DHODH como se ha definido anteriormente para su uso en el tratamiento de un paciente humano o animal que sufre o es susceptible de padecer una afección patológica o enfermedad como se ha definido anteriormente, en el que el paciente humano o animal sufre o es susceptible de padecer insuficiencia hepática o una afección que se agravaría por hepatotoxicidad, como se ha definido anteriormente.

Los compuestos activos en las combinaciones de la invención se pueden administrar por cualquier ruta adecuada, dependiendo de la naturaleza del trastorno que se trata, por ejemplo, por vía oral (como jarabes, comprimidos, cápsulas, pastillas para chupar, preparaciones de liberación controlada, preparaciones de disolución rápida, etc.); por vía tópica (como cremas, pomadas, lociones, pulverizadores nasales o aerosoles, etc.); por inyección (subcutánea, intradérmica, intramuscular, intravenosa, etc.) o por inhalación (como polvo seco, solución, dispersión, etc.).

Los compuestos activos en la combinación se pueden administrar juntos en la misma composición farmacéutica o en diferentes composiciones destinadas a la administración separada, simultánea, conjunta o secuencial por la misma ruta o por una ruta diferente.

Las combinaciones de la invención se pueden presentar convenientemente en una forma farmacéutica unitaria y se pueden preparar por cualquiera de los métodos bien conocidos en el sector farmacéutico.

Las combinaciones de la presente invención adecuadas para administración oral se pueden presentar como unidades discretas tales como cápsulas, sellos o comprimidos, conteniendo cada una de ellas una cantidad predeterminada del principio activo; como polvo o granulado; como solución o suspensión en un líquido acuoso o un líquido no acuoso; o como emulsión líquida de aceite en agua o emulsión líquida de agua en aceite. El principio activo también se puede presentar como bolo, electuario o pasta.

Una formulación en jarabe generalmente consistirá en una suspensión o solución del compuesto o sal en un vehículo líquido, por ejemplo, etanol, aceite de cacahuete, aceite de oliva, glicerina o agua con agentes saborizantes o colorantes.

Cuando la combinación está en forma de un comprimido, se puede usar cualquier vehículo farmacéutico usado rutinariamente para preparar formulaciones sólidas. Ejemplos de tales vehículos incluyen estearato de magnesio, talco, gelatina, goma arábiga, ácido esteárico, almidón, lactosa y sacarosa.

Se puede fabricar un comprimido por prensado o moldeo, opcionalmente con uno o más componentes auxiliares. Los comprimidos se pueden preparar por prensado en una máquina adecuada del principio activo en una forma fluida tal como polvo o granulado, opcionalmente mezclado con un agente aglutinante, lubricante, diluyente inerte, lubricante, tensioactivo o dispersante. Los comprimidos moldeados se pueden hacer moldeando en una máquina adecuada una mezcla del compuesto en polvo humedecida con un diluyente líquido inerte. Opcionalmente los comprimidos pueden estar recubiertos o ranurados y se pueden formular de manera que proporcionen la liberación lenta o controlada del principio activo contenido en los mismos.

Cuando la combinación está en forma de cápsula, cualquier encapsulación rutinaria es adecuada, por ejemplo, usando los vehículos mencionados anteriormente en una cápsula de gelatina dura. Cuando la composición está en forma de una cápsula de gelatina blanda, se puede considerar cualquier vehículo farmacéutico usado rutinariamente para preparar dispersiones o suspensiones, por ejemplo, chicles acuosos, celulosas, silicatos o aceites y se incorporan en una cápsula de gelatina blanda.

La combinación puede estar en forma de una composición de polvo seco para liberación tópica al pulmón por inhalación. Las composiciones de polvo seco pueden presentarse, por ejemplo, en cápsulas y cartuchos de, por ejemplo, gelatina o en blísteres de, por ejemplo, una hoja de aluminio laminada para usar en un inhalador o insuflador. Las formulaciones contienen por lo general una mezcla de polvo para inhalación del compuesto de la invención y una base de polvo adecuada (sustancia vehículo) tal como lactosa o almidón. Se prefiere el uso de lactosa. Cada cápsula o cartucho puede contener generalmente entre 2  $\mu\text{g}$  y 150  $\mu\text{g}$  de cada principio terapéuticamente activo. En otra alternativa, el principio activo(s) se puede presentar sin excipientes.

El envasado de la formulación para inhalación se puede llevar a cabo usando dispositivos inhaladores adecuados, tales como el Novolizer® SD2FL o Genuair®, que se describen en las siguientes solicitudes de patentes: WO 97/000703, WO 03/000325 y WO 03/061742.

La combinación puede estar en forma de una composición para administración nasal. Las composiciones típicas para administración nasal incluyen las que se han mencionado antes para inhalación e incluyen adicionalmente composiciones no presurizadas en forma de una solución o suspensión en un vehículo inerte tal como agua, opcionalmente en combinación con excipientes convencionales tales como tampones, antimicrobianos, agentes modificadores de la tonicidad y agentes modificadores de la viscosidad que se pueden administrar por atomización

nasal.

Las formulaciones dérmicas y transdérmicas típicas comprenden un vehículo acuoso o no acuoso convencional, por ejemplo, una crema, pomada, loción o pasta o están en forma de apósito, parche o membrana.

5 Preferiblemente la combinación está en una forma farmacéutica unitaria, por ejemplo una pastilla, cápsula o dosis medida de aerosol, de manera que el paciente se puede administrar una dosis individual.

10 La cantidad de cada principio activo que se requiere para producir un efecto terapéutico variará lógicamente dependiendo del principio activo particular, la vía de administración, el paciente en tratamiento y el trastorno o enfermedad particular que se trata.

15 Generalmente todos los agentes activos de la combinación se administran al mismo tiempo o casi al mismo tiempo. En otra alternativa, uno o dos principios activos se pueden tomar por la mañana y el otro(s) posteriormente el mismo día. O, en otro escenario, uno o dos principios activos se podrían tomar dos veces al día y el otro(s) una vez al día, ya sea en el mismo momento de una de las administraciones que se hacen dos veces al día, o en otro momento. Preferiblemente, al menos dos y más preferiblemente todos los principios activos se tomarían juntos al mismo tiempo. Preferiblemente, al menos dos, y más preferiblemente todos los principios activos se administrarían como una mezcla.

20 Preferiblemente la combinación de fármacos de la invención es para administración según una pauta de dosificación que implica la administración de (i) 0,015 a 3 mg/kg/semana de metotrexato, más preferiblemente de 0,07 a 0,7 mg/kg/semana de metotrexato y lo más preferiblemente de 0,15 a 0,35 mg/kg/semana de metotrexato y (ii) de 0,03 a 30 mg/kg/día de inhibidor de la DHODH, más preferiblemente de 0,07 a 14 mg/día de inhibidor de la DHODH y lo más preferiblemente de 0,15 a 0,3 mg/kg/día de inhibidor de la DHODH.

## Ejemplos

### Ejemplo 1 - Ensayo de inhibición de la actividad de la DHODH humana

30 Se estudiaron la actividad de la DHODH y su inhibición usando un ensayo de reducción de cromógeno con DCIP (2,6-diclorofenol-indofenol). La oxidación del sustrato (Dihidroorotato, L-DHO), así como la reducción del cosustrato (coenzima Q, CoQ) está acoplada a la reducción del cromógeno, por lo que la actividad enzimática da como resultado una pérdida de absorbancia del cromógeno a 600 nm.

35 Los extractos enzimáticos (8 µl, ~1,5 µg de proteína humana) se incubaron en placas de 96 pocillos. La mezcla de ensayo (200 µl) contenía CoQD 200 µM, L-DHO 100 µM, DCIP 120 µM en el tampón de ensayo (HEPES 100 mM pH 8,0, NaCl 150 mM, glicerol 10 %, Tritón X-100 0,05 %) y 2 µl de compuesto de ensayo. Los compuestos se disolvieron en DMSO a una concentración madre de 1 mM y se ensayaron a diferentes concentraciones que variaban de 10 µM a 1 pM para calcular una  $CI_{50}$  (concentración de inhibidor requerida para producir 50 % de inhibición).

45 La reacción se inició añadiendo la enzima y después se incubó durante 10 min a temperatura ambiente antes de medir la reducción de DCIP por recuento de una disminución de la absorbancia a 600 nm usando instrumentación estándar (Spectramax).

Todas las reacciones se llevaron a cabo por duplicado y, usando el programa informático ABase se dibujaron gráficas que determinaban los valores de  $CI_{50}$  para cada compuesto.

50 La Tabla 1 muestra las actividades en el ensayo de inhibición de la DHODH humana de algunos compuestos de la presente invención, donde se demuestra que estos compuestos son potentes inhibidores de la DHODH.

TABLA 1

Compuesto	$CI_{50}$ de la hDHODH (nM)
ácido 2-(3'-etoxi-3,5-difluorobifenil-4-ilamino)nicotínico	19
ácido 2-(3,5-difluoro-3'-metoxibifenil-4-ilamino)nicotínico	15
ácido 2-(3,5-difluoro-3'-metoxibifenil-4-ilamino)-5-metilnicotínico	12
ácido 2-(3'-ciclopropoxi-3,5-difluorobifenil-4-ilamino)nicotínico	17

### 55 Ejemplo 2 - Hepatotoxicidad reducida

Se realizaron ensayos de hepatotoxicidad aguda en ratones Swiss. Los animales recibieron una sola administración de, o bien vehículo, o 100 mg/kg de teriflunomida o un compuesto de la presente invención (compuestos de la lista indicada previamente) por vía intraperitoneal. Veinticuatro horas más tarde, se sacrificaron los animales y se

determinaron los niveles de marcadores hepáticos AST (aspartato aminotransferasa), ALT (alanina aminotransferasa) y BIL (bilirrubina total) en plasma.

Tabla 2: Niveles plasmáticos de marcadores hepáticos de ratones después de la administración de 100 mg/kg del compuesto, 100 mg/kg de teriflunomida o vehículo (UI: Unidades Internacionales).

Compuesto	ALT (IU/l)	AST (IU/l)	BIL (mg/dl)
ácido 2-(3'-etoxi-3,5-difluorobifenil-4-ilamino)nicotínico	60	92	0,05
ácido 2-(3,5-difluoro-3'-metoxibifenil-4-ilamino)nicotínico	73	95	0
ácido 2-(3'-ciclopropoxi-3,5-difluorobifenil-4-ilamino)nicotínico	66	91	0,14
Vehículo	55	78	0,05
Teriflunomida	423	542	0,5

Como se ve claramente en la Tabla 2, los ratones tratados con teriflunomida mostraron una elevación drástica de los tres marcadores hepáticos en comparación con los ratones tratados con vehículo, lo que indica claramente una elevada hepatotoxicidad, mientras que los inhibidores de la DHODH de acuerdo con la presente invención no causaron elevación significativa de ninguno de los parámetros medidos.

### EJEMPLO 3: Ensayo de eficacia del producto de combinación de la presente invención en artritis inducida por adyuvante.

Se ensayó el efecto de los compuestos inhibidores de la DHODH en combinación con metotrexato (0,05 mg/kg/día) en el modelo de artritis inducida por adyuvantes en la rata (AIA) usando animales con la enfermedad establecida (protocolo curativo). Brevemente, se inyectó adyuvante completo de Freund (CFA) en la almohadilla plantar de la pata trasera izquierda de ratas Wistar y 10 días más tarde se midió la inflamación de las dos patas traseras con un pletismómetro. Las ratas que presentaban un grado similar de inflamación en ambas patas se distribuyeron al azar en grupos de tratamiento (n = 7 por grupo). Los compuestos se administraron por vía oral una vez al día durante 10 días y los volúmenes de las patas se determinaron cada dos días hasta el día 21.

Tabla 3. Efectos del compuesto A (3mg/kg/día), metotrexato (0,05 mg/kg/día) y su combinación sobre la inhibición de la inflamación de las patas en ratas artríticas.

Los resultados se expresan como la media de la inhibición de la inflamación medida como el área bajo la curva (AUC) de los volúmenes de las patas derechas en el periodo comprendido entre los días 10 y 21 después de la inducción. Se calculó el porcentaje de inhibición para cada grupo respecto de los valores para las ratas tratadas con vehículo. Los resultados representan la media de dos experimentos independientes, cada uno con 5-6 animales por grupo.

Tratamiento	% de inhibición de la inflamación (AUC) Pata derecha
Compuesto A (3 mg/kg)	41
MTX (0,05 mg/kg)	37
Compuesto A (3 mg/kg) + MTX (0,05 mg/kg)	55

Los resultados de la Tabla 3 muestran que el compuesto A de la presente invención inhibe la inflamación causada mediante artritis experimental en ratas. Además, la coadministración de MTX y el compuesto A dio como resultado un aumento de la eficacia (34 %) en comparación con el compuesto A solo, lo que indica la viabilidad de administrar el compuesto en pacientes tratados con MTX.

Tabla 4: Efectos de la teriflunomida (3 mg/kg/día), metotrexato (0,05 mg/kg/día) y su combinación sobre la inhibición de la inflamación de las patas en ratas artríticas.

Los resultados se expresan como la media de la inhibición de la inflamación medida como el área bajo la curva (AUC) de los volúmenes de las patas derechas en el periodo comprendido entre los días 10 y 21 después de la inducción. Se calculó el porcentaje de inhibición para cada grupo respecto de los valores para las ratas tratadas con vehículo. Los resultados representan la media de un experimento con 6 animales.

Tratamiento	% AUC de inhibición en la pata derecha
Teriflunomida (3 mg/kg)	56
MTX (0,05 mg/kg)	24
Teriflunomida (3 mg/kg)+ MTX (0,05 mg/kg)	61

La coadministración de MTX y teriflunomida dio como resultado un aumento de la eficacia (9 %) en comparación con la teriflunomida solo.

- 5 De los resultados experimentales se puede concluir que los compuestos inhibidores de la DHODH de la presente invención muestran efecto antiartrítico por sí solos, así como en combinación con MTX, al igual que teriflunomida, pero también una clara disminución del potencial hepatotóxico, haciendo a la combinación de la presente invención, esto es (a) MTX y (b) un inhibidor de la DHODH de la invención, más atractiva desde el punto de vista de su perfil de seguridad.

10

## REIVINDICACIONES

1. Una combinación que comprende (a) metotrexato y (b) un inhibidor de la DHODH que es ácido 2-(3'-etoxi-3,5-difluorobifenil-4-ilamino)nicotínico, ácido 2-(3,5-difluoro-3'-metoxibifenil-4-ilamino)nicotínico, ácido 2-(3,5-difluoro-3'-metoxibifenil-4-ilamino)-5-metilnicotínico o ácido 2-(3'-ciclopropoxi-3,5-difluorobifenil-4-ilamino)nicotínico o una sal farmacéuticamente aceptable o N-óxido del mismo.
2. Metotrexato y un inhibidor de la DHODH como se define en la reivindicación 1 para su uso simultáneo, separado o secuencial en el tratamiento de una afección patológica o enfermedad seleccionada de artritis reumatoide, artritis psoriásica, espondilitis anquilosante, esclerosis múltiple, granulomatosis de Wegener, lupus eritematoso sistémico, psoriasis y sarcoidosis.
3. Un producto que comprende (a) metotrexato y (b) un inhibidor de la DHODH como se define en la reivindicación 1, como una preparación combinada para su uso simultáneo, separado o secuencial en el tratamiento de un paciente humano o animal que sufre o es susceptible a una afección patológica o enfermedad como se define en la reivindicación 2.
4. Un kit de partes que comprende (b) un inhibidor de la DHODH como se define en la reivindicación 1 junto con instrucciones para su uso simultáneo, separado o secuencial en combinación con (a) metotrexato para el tratamiento de un paciente humano o animal que sufre o es susceptible a una afección patológica o enfermedad como se define en la reivindicación 2.
5. Un envase que comprende (b) un inhibidor de la DHODH como se define en la reivindicación 1 y (a) metotrexato, para su uso simultáneo, separado o secuencial en el tratamiento de una afección patológica o enfermedad como se define en la reivindicación 2.
6. Una combinación de acuerdo con la reivindicación 1, un producto para su uso de acuerdo con la reivindicación 3, un kit para su uso de acuerdo con la reivindicación 4 o un envase para su uso de acuerdo con la reivindicación 5, que comprende además (c) otro compuesto seleccionado de:
- (i) Anticuerpos monoclonales anti-TNF-alfa tales como infliximab, certolizumab pegol, golimumab, adalimumab y AME-527 de Applied Molecular Evolution;
  - (ii) Antagonistas de TNF-alfa tales como etanercept, lenercept, onercept y pegsunercept;
  - (iii) Inhibidores de la calcineurina (PP-2B)/Inhibidores de la expresión de INS tales como ciclosporina A, tacrolimus e ISA-247 de Isotechnika;
  - (iv) Antagonistas del receptor de IL-1 tales como anakinra y AMG-719 de Amgen;
  - (v) Anticuerpos monoclonales anti-CD20 tales como rituximab, ofatumumab, ocrelizumab y TRU-015 de Trubion Pharmaceuticals;
  - (vi) Inhibidores de p38 tales como AMG-548 (de Amgen), ARRY-797 (de Array Biopharma), edisilato de clormetiazol, doramapimod, PS-540446 (de BMS), SB-203580, SB-242235, SB-235699, SB-281832, SB-681323, SB-856553 (todos de GlaxoSmithKline), KC-706 (de Kemia), LEO-1606, LEO-15520 (todos de Leo), SC-80036, SD-06 (todos de Pfizer), RWJ-67657 (de R. W. Johnson), RO-3201195, RO-4402257 (todos de Roche), AVE-9940 (de Aventis), SCIO-323, SCIO-469 (todos de Scios), TA-5493 (de Tanabe Seiyaku), y VX-745 y VX-702 (todos de Vertex);
  - (vii) Inhibidores de la activación de NF-kappaB (NFKB) tales como sulfasalazina e iguratimod;
  - (viii) Otro inhibidor de la dihidrofolato reductasa (DHFR) tal como aminopterina y CH-1504 de Chelsea;
  - (ix) Inhibidores de la quinasa Janus (JAK), tales como CP-690, 550 de Pfizer e INCB-18424, de Incyte;
  - (x) Inhibidor de MEK, tal como ARRY-162 de Array; y
  - (xi) Agonistas de los receptores de 1-fosfato de esfingosina, tales como fingolimod (Novartis);
  - (xv) Interferones que comprenden interferón beta 1a tal como Avonex de Biogen Idee, CinnoVex de CinnaGen y Rebif de Merck Serono, e interferón beta 1b tal como Betaferon de Schering y Betaseron de Berlex.
  - (xvi) Inmunomoduladores tales como BG-12 (derivado del ácido fumárico) de Biogen Idec/Fumapharm AG;
  - (xvii) Inhibidores de la adenosina aminohidrolasa tales como cladribina de Merck Serono.
7. Un inhibidor de la DHODH como se define en la reivindicación 1 para su uso en combinación con metotrexato, para el tratamiento de una afección patológica o enfermedad como se define en la reivindicación 2.
8. Metotrexato para su uso en combinación con un inhibidor de la DHODH como se define en la reivindicación 1 para el tratamiento de una afección patológica o enfermedad como se define en la reivindicación 2.
9. Un inhibidor de la DHODH para su uso de acuerdo con la reivindicación 7 o metotrexato para su uso de acuerdo con la reivindicación 8, en el que el metotrexato (a) es para administración según una pauta posológica que implica la administración de 0,015 a 3 mg/kg/semana de metotrexato y el inhibidor de la DHODH (b) es para administración según una pauta posológica que implica la administración de 0,03 a 30 mg/kg/día de inhibidor de la DHODH.
10. Metotrexato y un inhibidor de la DHODH para su uso de acuerdo con la reivindicación 2, un inhibidor de la

DHODH para su uso de acuerdo con la reivindicación 7 o 9 o metotrexato para su uso de acuerdo con la reivindicación 8 o 9, en el que el uso es en el tratamiento de un paciente humano o animal que sufre o es susceptible a insuficiencia hepática o una afección que se agravaría por hepatotoxicidad y en la que dicha afección que se agravaría por hepatotoxicidad es fibrosis hepática, hepatitis, cirrosis o cáncer de hígado.

- 5
11. Una combinación de acuerdo con la reivindicación 1 para su uso en el tratamiento de una afección patológica o enfermedad como se define en la reivindicación 2.
- 10
12. Un inhibidor de la DHODH como se define en la reivindicación 1 para su uso en el tratamiento de un paciente humano o animal que sufre o es susceptible a una afección patológica o enfermedad como se define en la reivindicación 2, en el que el paciente humano o animal sufre o es susceptible a insuficiencia hepática o una afección que se agravaría por hepatotoxicidad como se define en la reivindicación 10.