

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 659 205**

51 Int. Cl.:

A61K 31/495 (2006.01)

A61P 37/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.03.2012 PCT/US2012/028538**

87 Fecha y número de publicación internacional: **20.09.2012 WO12125475**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.03.2012 E 12710411 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.11.2017 EP 2683383**

54 Título: **Uso de 3-(5-amino-2-metil-4-oxoquinazolin-3(4H)-il)piperidin-2,6-diona en el tratamiento de enfermedades inflamatorias y relacionadas con el sistema inmune**

30 Prioridad:

11.03.2011 US 201161451995 P

28.04.2011 US 201161480272 P

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

14.03.2018

73 Titular/es:

CELGENE CORPORATION (100.0%)

86 Morris Avenue

Summit, NJ 07901, US

72 Inventor/es:

GANDHI, ANITA y

SCHAFFER, PETER, H.

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 659 205 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

Uso de 3-(5-amino-2-metil-4-oxoquinazolin-3(4H)-il)piperidin-2,6-diona en el tratamiento de enfermedades inflamatorias y relacionadas con el sistema inmune

Solicitudes relacionadas por referencia

- 5 Esta solicitud reivindica el beneficio de la Solicitud de Patente Provisional U.S. N° 61/451.995, presentada el 11 de Marzo, 2011, y la Solicitud de Patente Provisional U.S. N° 61/480.272, presentada el 28 de Abril, 2011.

Listado de secuencias

- 10 La presente solicitud se presenta con una lista de secuencias entregada con el nombre de archivo 12827-263-228_SeqListing.txt, de 6.571 bites de tamaño, que se creó el 8 de Marzo, 2012. Este listado de secuencias se incorpora en la presente memoria por referencia en su totalidad.

Campo

- 15 En la presente memoria se proporcionan métodos para tratar, prevenir, y/o manejar enfermedades asociadas con la actividad linfocítica, incluyendo la actividad de células B y/o células T, por ejemplo, enfermedades relacionadas con el sistema inmune o enfermedades inflamatorias, que comprenden administrar el Compuesto I o una sal, solvato, hidrato, estereoisómero, tautómero, mezcla racémica, co-cristal, clatrato, o polimorfo del mismo, aceptable farmacéuticamente, donde el Compuesto I es 3-(5-amino-2-metil-4-oxoquinazolin-3(4H)-il)piperidina-2,6-diona. También se proporcionan en la presente memoria composiciones farmacéuticas y regímenes de dosificación para tal tratamiento, prevención y/o manejo.

Antecedentes

- 20 Las enfermedades inflamatorias y las relacionadas con el sistema inmune moduladas por la actividad linfocítica, incluyendo la actividad de células B y/o células T, tal como el lupus, esclerodermia, síndrome de Sjögren, vasculitis inducida por ANCA, síndrome anti-fosfolípido y miastenia gravis, continúan siendo importantes problemas médicos.

- 25 El lupus o lupus eritematoso es un grupo de trastornos autoinmunes que pueden causar inflamación crónica en varias partes del cuerpo, especialmente en la piel, articulaciones, sangre, y riñones. El sistema inmune normalmente hace que las proteínas denominadas anticuerpos protejan al cuerpo contra virus, bacterias, y otros materiales extraños (es decir, antígenos). En un trastorno autoinmune tal como el lupus, el sistema inmune pierde su capacidad para diferenciar entre los antígenos y sus propias células y tejidos y puede hacer que los anticuerpos se dirijan contra sus propias células y tejidos para formar complejos inmunes. Estos complejos inmunes pueden acumularse en los tejidos y causar inflamación, daño a los tejidos y/o dolor. Los tres tipos de lupus más comunes incluyen el lupus eritematoso sistémico (SLE), el lupus eritematoso cutáneo (CLE) y el lupus inducido por fármacos. Se pueden encontrar descripciones más detalladas del lupus o lupus eritematoso en Wallace, 2000, *The Lupus Book: A Guide for Patients and Their Families*, Prensa de la Universidad de Oxford, Edición Revisada y Expandida, que se incorpora por referencia en la presente memoria en su totalidad.
- 30

- 35 La esclerodermia es una enfermedad rara con una incidencia estable de aproximadamente 19 casos por millón de personas. La causa exacta de la esclerodermia no se conoce.

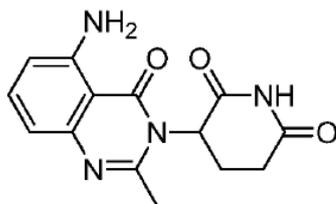
- 40 Las anomalías implican la autoinmunidad y la alteración celular endotelial y de la función del fibroblasto. La esclerodermia sistémica generalmente comienza con el engrosamiento cutáneo, normalmente de los dedos, acompañado por el fenómeno de Raynaud. A la enfermedad de Raynaud normalmente le preceden otras manifestaciones de la esclerodermia sistémica. Al inicio de la enfermedad la piel afectada puede estar inflamada y blanda. La localización habitual de los mayores engrosamientos y endurecimientos cutáneos son la cara, manos y dedos. Se presenta frecuentemente esclerodactilia. En la exploración a veces son palpables problemas de fricción de los tendones y pueden ser dolorosos. Cuanto más avanza la enfermedad, pueden aparecer úlceras digitales y auto-amputación. La dismotilidad gastrointestinal es una característica, a menudo manifestada mediante acidez, o mediante diarrea con malabsorción o pseudo-obstrucción. La nueva aparición de hipertensión o insuficiencia renal son manifestaciones del daño vascular asociado. También es posible un fallo cardíaco o una arritmia debido a fibrosis cardíaca. (Hachulla E, Launay D, *Diagnosis and classification of systemic sclerosis*, Clin Rev Allergy Immunol 2010; 40(2):78-83).
- 45

- 50 Las principales manifestaciones de la esclerodermia, y en particular de la esclerodermia sistémica, son la inadecuada síntesis y deposición excesiva de colágeno, disfunción endotelial, espasmo, colapso y destrucción por fibrosis. En términos de diagnóstico, un parámetro clínico importante es el engrosamiento cutáneo próxima a las articulaciones metacarpofalángeas. El fenómeno de Raynaud es un componente frecuente, casi universal, de la esclerodermia. Se diagnostica por cambios de color en la piel ante la exposición al frío. La isquemia y el engrosamiento cutáneo son síntomas de la enfermedad de Raynaud.

Sigue existiendo una necesidad de fármacos profilácticos o terapéuticos que se puedan usar para tratar o prevenir enfermedades inflamatorias y relacionadas con el sistema inmune, incluyendo el lupus, esclerodermia, síndrome de Sjögren, vasculitis inducida por ANCA, síndrome anti-fosfolipídico y la miastenia gravis.

Compendio

- 5 En la presente memoria se proporcionan métodos para tratar, manejar, mejorar y/o prevenir enfermedades, trastornos y/o afecciones asociadas con enfermedades inflamatorias y relacionadas con el sistema inmune que comprenden la administración de una cantidad eficaz de un compuesto de fórmula I



Compuesto I,

- 10 o una sal, solvato, hidrato, estereoisómero, tautómero, mezcla racémica, co-cristal, clatrato, o polimorfo del mismo, aceptable farmacéuticamente.

En una realización, el compuesto es 3-(5-amino-2-metil-4-oxoquinazolin-3(4H)-il)piperidina-2,6-diona.

En determinadas realizaciones, la enfermedad se selecciona del lupus, esclerodermia, síndrome de Sjögren, vasculitis inducida por ANCA, síndrome anti-fosfolipídico y la miastenia gravis.

- 15 En una realización, en la presente memoria se proporcionan métodos de modulación, por ejemplo, reducción, de la actividad linfocítica, incluyendo la actividad de células B y/o células T, que comprenden poner en contacto células B y/o células T con una cantidad eficaz del Compuesto I.

- 20 En la presente memoria se proporcionan también composiciones farmacéuticas, formas de dosificación unitarias, y kits adecuados para usar en el tratamiento, prevención, mejora y/o manejo de enfermedades, trastornos y/o afecciones asociadas a enfermedades inflamatorias y relacionadas con el sistema inmune, que comprenden el Compuesto I, opcionalmente en combinación con uno o más de otros agentes terapéuticos.

En determinadas realizaciones, el Compuesto I se administra en combinación con uno o más de otros agentes terapéuticos, es decir, agentes farmacéuticos que son moduladores de la actividad linfocítica, que incluyen la actividad de células B y/o la actividad de células T. Las combinaciones comprenden la administración simultánea, así como la secuencial.

25 Breve descripción de los dibujos

La FIG. 1 ilustra el efecto del 3-(5-amino-2-metil-4-oxoquinazolin-3(4H)-il)piperidina-2,6-diona sobre la producción de citoquina y quimioquina en células T humanas estimuladas por anti-CD3, expresado como la cantidad absoluta producida.

- 30 La FIG. 2 ilustra el efecto del 3-(5-amino-2-metil-4-oxoquinazolin-3(4H)-il)piperidina-2,6-diona sobre la producción de citoquina y quimioquina en células T humanas estimuladas por anti-CD3, expresado como porcentaje de control.

La FIG. 3 ilustra la inhibición de la producción de citoquina y de la producción de quimioquina en células mononucleares sanguíneas periféricas estimuladas por lipopolisacárido mediante 3-(5-amino-2-metil-4-oxoquinazolin-3(4H)-il)piperidina-2,6-diona.

- 35 La FIG.4 ilustra la mejora de la producción de citoquina y de la producción de quimioquina en las células mononucleares sanguíneas periféricas estimuladas por lipopolisacárido mediante 3-(5-amino-2-metil-4-oxoquinazolin-3(4H)-il)piperidina-2,6-diona.

La FIG. 5 ilustra la mejora de la producción de IFN-gamma (interferón gamma) por las células NK (Asesinas naturales) en respuesta a IgG y IL-2 inmovilizadas, expresada como cantidad absoluta producida, para 3-(5-amino-2-metil-4-oxoquinazolin-3(4H)-il)piperidina-2,6-diona.

- 40 La FIG. 6 ilustra la mejora de la producción de IFN-gamma por las células NK en respuesta a IgG y IL-2 inmovilizadas, expresada como porcentaje de la cantidad de IFN-gamma producida en presencia de 1 µm de pomalidomida, para 3-(5-amino-2-metil-4-oxoquinazolin-3(4H)-il)piperidina-2,6-diona.

La FIG. 7 ilustra el efecto del 3-(5-amino-2-metil-4-oxoquinazolin-3(4*H*)-il)piperidina-2,6-diona sobre las células NK mediadas por ADCC (citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpo, de sus siglas en inglés) frente a células de linfoma recubiertas con Rituximab.

5 La FIG. 8 ilustra microfotografías de una sección de piel teñida con hematoxilina y eosina que muestran engrosamiento dérmico de una lesión cutánea en el modelo de ratón de fibrosis cutánea inducida por bleomicina (prevención de la inflamación conducida por fibrosis).

La FIG. 9 ilustra microfotografías de una sección de piel teñida con hematoxilina y eosina que muestran engrosamiento dérmico de una lesión cutánea en el modelo de ratón de fibrosis cutánea inducida por bleomicina (regresión de la fibrosis establecida).

10 Descripción detallada

A menos que se defina de otra manera, todos los términos técnicos y científicos que se emplean en la presente memoria tienen el mismo significado que comúnmente se entiende por un experto en la técnica. Todas las patentes, solicitudes, publicaciones y otras publicaciones, se incorporan por referencia en su totalidad. En el caso de que en la presente memoria haya una pluralidad de definiciones para un término, prevalecerán los de esta sección a menos que se indique de otra manera.

15 Como se emplea en la presente memoria, y a menos que se indique de otra manera, los términos “tratar” y “tratamiento” se refieren a la mejora o reducción de la gravedad de una enfermedad o un síntoma asociado con la enfermedad o afección que está siendo tratada.

20 Como se emplea en la presente memoria, “prevenir”, “prevención” y otras formas de la palabra incluyen la inhibición del inicio o progresión de una enfermedad o trastorno o un síntoma particular de la enfermedad o trastorno. En algunas realizaciones, sujetos con historias familiares de cáncer son candidatos de regímenes preventivos. Normalmente, en el contexto del cáncer, el término “prevenir” se refiere a la administración del fármaco antes del inicio de los signos o síntomas de un cáncer, particularmente en sujetos con riesgo de cáncer.

25 Como se emplea en la presente memoria, y a menos que se indique de otra manera, el término “manejo” comprende prevenir la recurrencia de la enfermedad o trastorno en particular, en un sujeto que la ha padecido, prolongando el tiempo en el que en un sujeto, que ha padecido la enfermedad o trastorno, permanece en remisión, reduciendo las tasas de mortalidad de los sujetos, y/o manteniendo una reducción en la gravedad o eliminación de un síntoma asociado con la enfermedad o afección que se está manejando.

30 Como se emplea en la presente memoria “sujeto” significa un animal, normalmente un mamífero, incluyendo un ser humano. Como se emplea en la presente memoria, “paciente” significa un sujeto humano.

35 Como se emplea en la presente memoria, y a menos que se especifique de otra manera, los términos “cantidad eficaz terapéuticamente” y “cantidad eficaz” de un compuesto se refiere a una cantidad suficiente para proporcionar un beneficio terapéutico en el tratamiento, prevención y/o manejo de una enfermedad, para retrasar o minimizar uno o más síntomas asociados con la enfermedad o trastorno a tratar. Los términos “cantidad eficaz terapéuticamente” y “cantidad eficaz” puede comprender una cantidad que mejora la terapia en general, reduce o evita síntomas o causas de la enfermedad o el trastorno, o mejora la eficacia terapéutica de otro agente terapéutico.

40 Como se emplea en la presente memoria, y a menos que se especifique de otra manera, el término “cantidad eficaz profilácticamente” de un compuesto es una cantidad suficiente para prevenir una enfermedad o afección, o uno o más síntomas asociados con la enfermedad o afección, o prevenir su recurrencia. Una cantidad eficaz terapéuticamente de un compuesto significa una cantidad del agente terapéutico, en solitario o en combinación con otros agentes, que proporciona un beneficio profiláctico en la prevención de la enfermedad. El término “cantidad eficaz profilácticamente” puede comprender una cantidad que mejora la profilaxis en general o que mejora la eficacia profiláctica de otro agente profiláctico.

45 Como se emplea en la presente memoria, y a menos que se indique de otra manera, el término “sal aceptable farmacéuticamente” incluye, pero no se limita a, una sal de un grupo ácido que se puede presentar en los compuestos que se proporcionan en la presente memoria. Bajo determinadas condiciones ácidas, el compuesto puede formar una amplia variedad de sales con varios ácidos inorgánicos y orgánicos. Los ácidos que se pueden emplear para preparar sales aceptables farmacéuticamente de tales compuestos básicos, son los que forman sales que comprenden aniones aceptables farmacológicamente incluyendo, pero no se limitan a, acetato, bencenosulfato, benzoato, bicarbonato, bitartrato, bromuro, edetato cálcico, camsilato, carbonato, cloruro, bromuro, yoduro, citrato, dihidrocloruro, edetato, edisilato, estolato, esilato, fumarato, gluceptato, gluconato, glutamato, glicolilarsanilato, hexilresorcinato, hidrabamina, hidroxinaftoato, isetionato, lactato, lactobionato, malato, maleato, mandelato, metanosulfonato, (mesilato), metilsulfato, muscato, napsilato, nitrato, pantotenato, fosfato/difosfato, poligalacturonato, salicilato, estearato, succinato, sulfato, tanato, tartrato, teoclato, trietiodida, y pamoato.

55 Como se emplea en la presente memoria, y a menos que se indique de otra manera, el término “hidrato” significa un compuesto o una sal del mismo que se proporciona en la presente memoria, que incluye además una cantidad de

agua estequiométrica o no estequiométrica unida mediante fuerzas intermoleculares no covalentes. Los hidratos pueden ser cristalinos o no cristalinos.

5 Como se emplea en la presente memoria, y a menos que se indique de otra manera, el término “solvato” significa un solvato formado a partir de la asociación de uno o más moléculas de disolvente para un compuesto que se proporciona en la presente memoria. El término “solvato” incluye hidratos (por ejemplo, monohidrato, dihidrato, trihidrato, tetrahidrato, y similares). Los solvatos pueden ser cristalinos o no cristalinos.

Como se emplea en la presente memoria, y a menos que se especifique de otra manera, el término “estereoisómero” comprende a todos los compuestos puros enantioméricamente/estereoméricamente y enriquecidos enantioméricamente/estereoméricamente que se proporcionan en la presente memoria.

10 Como se emplea en la presente memoria, y a menos que se indique de otra manera, el término “puro estereoméricamente” o “puro enantioméricamente” significa que un compuesto comprende un estereoisómero y es libre sustancialmente de su estereoisómero o enantiómero contrario. Por ejemplo, un compuesto es puro estereoméricamente o enantioméricamente cuando el compuesto contiene 80%, 90%, ó 95% o más de un estereoisómero y 20%, 10% ó 5% o menos del estereoisómero contrario. En determinados casos, en la presente memoria se proporciona un compuesto que se considera activo ópticamente o puro estereoméricamente/enantioméricamente (es decir, sustancialmente la forma *R*- o sustancialmente la forma *S*-) con respecto al centro quiral cuando el compuesto es aproximadamente 80% ee (enantiomérico de más) o más, preferiblemente, igual o mayor al 90% ee con respecto a un centro quiral particular, y más preferiblemente 95% ee con respecto a un centro quiral particular.

20 Como se emplea en la presente memoria, y a menos que se indique de otra manera, el término “enriquecido” estereoméricamente o “enriquecido enantioméricamente” comprende las mezclas racémicas, así como otras mezclas de estereoisómeros de compuestos que se proporcionan en la presente memoria (por ejemplo, *R/S* = 30/70, 35/65, 40/60, 45/55, 55/45, 60/40, 65/35 y 70/30).

25 Los términos “co-administración” y “en combinación con” incluyen la administración de dos o más agentes terapéuticos (por ejemplo, el Compuesto I o una composición que se proporciona en la presente memoria y otro modulador de la actividad linfocítica, incluyendo la actividad de células B y/o la actividad de células T u otros agentes activos) bien simultáneamente, conjuntamente o secuencialmente sin límites de tiempo específicos. En una realización, el Compuesto I y al menos otro agente están presentes en la célula o en el cuerpo del sujeto al mismo tiempo o ejercen su efecto biológico o terapéutico al mismo tiempo. En una realización, el agente o agentes terapéuticos están en la misma composición o en la misma forma de dosis unitaria. En otra realización, el agente o agentes terapéuticos están en composiciones o en formas de dosis unitarias separadas.

Una “célula B” es un linfocito que madura dentro de la médula ósea, e incluye una célula B sin tratamiento previo, una célula B de memoria, o una célula B efectora (células plasmáticas). La célula B en la presente memoria puede ser una célula B normal o no cancerosa.

35 Una “célula T” es un linfocito que madura en el timo, e incluye una célula T auxiliar, una célula T de memoria, y una célula T citotóxica.

Como se emplea en la presente memoria “supervivencia global” se refiere al tiempo desde la aleatorización hasta la muerte por cualquier causa, y se mide en la intención de tratar a la población. La supervivencia global se puede evaluar en estudios de control aleatorios.

40 Como se emplea en la presente memoria “tasa de respuesta objetiva” se refiere a la proporción de pacientes con síntomas de esclerodermia predefinidos reducidos al final de un período de tiempo predefinido. La duración de la respuesta se mide normalmente desde el momento de la respuesta inicial hasta la progresión documentada de la esclerodermia.

45 Como se emplea en la presente memoria “tiempo de progresión” significa el tiempo desde la aleatorización hasta la progresión de la esclerodermia objetivo. En determinadas realizaciones, el tiempo de progresión no incluye las muertes.

Como se emplea en la presente memoria “tiempo libre de progresión” significa el tiempo desde la aleatorización hasta la progresión o muerte de la esclerodermia objetivo.

50 Como se emplea en la presente memoria “tiempo hasta el fallo del tratamiento” significa cualquier punto o puntos finales de medición del tiempo desde la aleatorización hasta la interrupción del tratamiento por cualquier razón, incluyendo la progresión de la enfermedad, toxicidad del tratamiento, y la muerte.

Como se emplea en la presente memoria “mortalidad” significa una medición del número de muertes en una población dada.

Como se emplea en la presente memoria “mortalidad respiratoria” significa pacientes que mueren por hipoxia aguda u otro empeoramiento respiratorio dando como resultado la muerte, tal como necesitar de ventilación mecánica que conduce a la muerte, parada respiratoria, o cualquier otro evento en un sujeto, considerado de naturaleza respiratoria.

- 5 Como se emplea en la presente memoria “hospitalización respiratoria” significa los hospitalizados por empeoramiento del estado pulmonar, como se documenta mediante las anotaciones de admisión al hospital del paciente o mediante otras opiniones médicas.

Como se emplea en la presente memoria “puntuación cutánea modificada de Rodnan” significa un sistema de puntuación numérica validada para evaluar el engrosamiento cutáneo dérmico.

- 10 Como se emplea en la presente memoria “engrosamiento de la piel” significa la piel dura o indurada que se puede evaluar empleando una variedad de técnicas que incluyen el durómetro y mRSS.

Como se emplea en la presente memoria “induración cutánea” significa la piel que está endurecida, roja, inflamada, engrosada o sensible.

- 15 Como se emplea en la presente memoria “índice de calidad de vida dermatológico” significa una evaluación de la calidad de vida relacionada a los síntomas cutáneos para un paciente que tiene esclerodermia.

Como se emplea en la presente memoria “función pulmonar” significa cualquier medida del flujo espiratorio forzado, capacidad vital forzada, FEV 25-75%, volúmenes de los pulmones o capacidad vital.

- 20 Como se emplea en la presente memoria “capacidad de difusión del monóxido de carbono” significa la evaluación de la absorción del monóxido de carbono a través de la membrana capilar alveolar. Ésta puede ser un indicador para la medición de la capacidad de los pulmones para transferir oxígeno de los pulmones hasta el torrente sanguíneo.

Como se emplea en la presente memoria “índice de Disnea de Mahler” significa un instrumento que proporciona mediciones clínicas de la dificultad respiratoria.

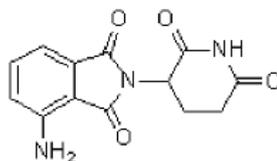
Como se emplea en la presente memoria “puntuación del Cuestionario Respiratorio de Saint George” significa un instrumento que mide la calidad de vida en pacientes con enfermedad pulmonar.

- 25 Como se emplea en la presente memoria “puntuación del tracto gastrointestinal del consorcio de ensayos clínicos de esclerodermia de UCLA” significa un cuestionario aplicado a pacientes que tienen esclerodermia para evaluar los síntomas gastrointestinales asociados con la esclerodermia (esclerosis sistémica).

Como se emplea en la presente memoria “dilatación mediada por flujo” significa cualquier medición de la función vascular endotelial en un paciente que tiene esclerodermia.

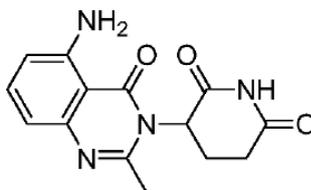
- 30 Como se emplea en la presente memoria “distancia caminada durante seis minutos” significa cualquier evaluación de la distancia que un paciente que tiene esclerodermia puede caminar en 6 minutos o cualquier procedimiento estandarizado para evaluar la capacidad para caminar durante un período de tiempo o distancia fijos.

Como se emplea en la presente memoria, pomalidomida se refiere al siguiente compuesto:



- 35 Compuesto I

En determinadas realizaciones, el Compuesto I para emplear en los métodos que se proporcionan en la presente memoria, incluyendo la terapia de combinación, y en composiciones que se proporcionan en la presente memoria, es un compuesto de fórmula:



Compuesto I,

o una sal, solvato, hidrato, estereoisómero, tautómero, mezcla racémica, co-cristal, clatrato, o polimorfo del mismo, aceptable farmacéuticamente.

En una realización, el compuesto es 3-(5-amino-2-metil-4-oxoquinazolin-3(4H)-il)piperidina-2,6-diona.

5 El compuesto I o una sal, solvato, hidrato, estereoisómero, tautómero, mezcla racémica, co-cristal, clatrato, o polimorfo del mismo, se puede preparar mediante métodos conocidos por un experto en la técnica, por ejemplo, según el procedimiento descrito en la Patente US 7.635.700 y la Solicitud de Patente Provisional US N° 61/451.806.

En determinadas realizaciones, el compuesto de Fórmula I es un sólido. En determinadas realizaciones, el compuesto de Fórmula I está hidratado. En determinadas realizaciones, el compuesto de Fórmula I está solvatado.
10 En determinadas realizaciones, el compuesto de Fórmula I es anhidro. En determinadas realizaciones, el compuesto de Fórmula I no es higroscópico.

En determinadas realizaciones, el compuesto sólido de Fórmula I es amorfo. En determinadas realizaciones, el compuesto sólido de Fórmula I es cristalino. En determinadas realizaciones, el compuesto sólido de Fórmula I está en una forma cristalina descrita en la Solicitud de Patente Provisional U.S. N° 61/451.806, presentada el 11 de
15 Marzo, 2011, que se incorpora en la presente memoria por referencia en su totalidad.

Las formas sólidas del compuesto de Fórmula I se pueden preparar según los métodos descritos en la divulgación de la Solicitud de Patente Provisional U.S. N° 61/451.806. Las formas sólidas se pueden preparar también según otros métodos evidentes para los expertos en la técnica.

En determinadas realizaciones, el compuesto de Fórmula I es una sal de clorhidrato de 3-(5-amino-2-metil-4-oxo-4H-quinazolin-3-il)piperidina-2,6-diona, o un enantiómero o una mezcla de enantiómeros del mismo; o un solvato, hidrato, co-cristal, clatrato, o polimorfo del mismo, aceptable farmacéuticamente. En determinadas realizaciones, la sal clorhidrato es un sólido. En determinadas realizaciones, la sal clorhidrato es anhidra. En determinadas realizaciones, la sal clorhidrato no es higroscópica. En determinadas realizaciones, la sal clorhidrato es amorfa. En determinadas realizaciones, la sal clorhidrato es cristalina. En determinadas realizaciones, la sal clorhidrato está en
20 Forma cristalina A.

La sal clorhidrato del compuesto de Fórmula I y las formas sólidas del mismo se pueden preparar según los métodos descritos en la divulgación de la Solicitud de Patente Provisional U.S. N° 61/451.806. La sal clorhidrato y las formas sólidas de la misma se pueden preparar según otros métodos evidentes para los expertos en la técnica.

El compuesto de Fórmula I que se proporciona en la presente memoria contiene un centro quiral, y puede existir como una mezcla de enantiómeros, *por ejemplo*, una mezcla racémica. Esta divulgación comprende el uso de formas puras estereoméricamente de tal compuesto, así como el empleo de mezclas de estas formas. Por ejemplo, se pueden usar en los métodos y composiciones descritos en la presente memoria, mezclas que comprenden cantidades iguales o no de los enantiómeros del compuesto de Fórmula I que se proporcionan en la presente memoria. Estos isómeros se pueden sintetizar asimétricamente o resolver empleando técnicas estándar, tales como
35 columnas quirales o agentes de resolución quirales. Véase, *por ejemplo*, Jacques, J., *et al.*, *Enantiomers, Racemates and Resolutions* (Wiley-Interscience, Nueva York, 1981); Wilen, S. H., *et al.*, *Tetrahedron* 33:2725 (1997); Eliel, E. L., *Stereochemistry of Carbon Compounds* (McGraw-Hill, NY, 1962); y Willen, S. H., *Tables of Resolving Agents and Optical Resolutions* p.268 (E.L. Eliel, Ed., Univ. of Notre Dame Press, Notre Dame, IN, 1972).

Debe señalarse que si hay discrepancia entre una estructura representada y un nombre proporcionado a esta estructura, la estructura representada se reconocerá como la de más peso. Además, si la estereoquímica de una estructura o una parte de una estructura no se indica con, por ejemplo, líneas gruesas o discontinuas, la estructura o parte de la estructura se interpretará como aplicable a todos los estereoisómeros de la estructura.

Métodos de tratamiento

En la presente memoria se proporcionan métodos de tratamiento, prevención, y/o manejo de enfermedades, trastornos y/o afecciones asociadas a enfermedades relacionadas al sistema inmune y a enfermedades inflamatorias, que comprenden administrar una cantidad eficaz terapéuticamente del Compuesto I o una sal, solvato, hidrato, estereoisómero, tautómero, o mezclas racémicas del mismo, aceptable farmacéuticamente, a un paciente que necesita de los mismos. En determinadas realizaciones, la enfermedad se selecciona del lupus, esclerodermia,
45

síndrome de Sjögren, vasculitis inducida por ANCA, síndrome anti-fosfolípido y miastenia gravis. En determinadas realizaciones, la enfermedad es lupus o esclerodermia.

5 La sensibilidad del Compuesto I o una sal, solvato, hidrato, estereoisómero, tautómero o mezclas racémicas del mismo, aceptable farmacéuticamente se puede estudiar en varios ensayos *in vivo e in vitro*, incluyendo modelos animales conocidos por un experto en la técnica para enfermedades relacionadas con el sistema inmune y con enfermedades inflamatorias, que incluyen, pero no se limitan a el modelo de ratón MRL/MpJ-Faslpr/J del lupus eritematoso sistémico, el modelo de ratón NZBWF1/J del lupus eritematoso sistémico, el modelo de fibrosis cutánea inducida por bleomicina, y el modelo de ratón estricto murino cutáneo-1 (Tsk-1).

Tratamiento de la esclerodermia

10 En determinadas realizaciones, en la presente memoria se proporcionan métodos para tratar, prevenir y/o manejar la esclerodermia o un síntoma de la misma, que comprende administrar una cantidad eficaz terapéuticamente del Compuesto I o una sal, solvato, hidrato, estereoisómero, tautómero o mezclas racémicas del mismo, aceptable farmacéuticamente, a un paciente que tiene esclerodermia.

15 En determinadas realizaciones, en la presente memoria se proporcionan métodos para prevenir la esclerodermia o un síntoma de la misma, que comprende administrar una cantidad eficaz del Compuesto I o una sal, solvato, hidrato, estereoisómero, tautómero o mezclas racémicas del mismo, aceptable farmacéuticamente, a un paciente con riesgo de tener esclerodermia.

En determinadas realizaciones, la esclerodermia es localizada, sistémica, esclerodermia limitada o difusa.

20 En determinadas realizaciones, la esclerodermia sistémica comprende el síndrome CREST (calcinosis, síndrome de Raynaud, disfunción o dismotilidad esofágica, esclerodactalia, telangiectasia). La esclerodermia también se conoce como esclerosis sistémica o esclerosis sistémica progresiva. En determinadas realizaciones, en la presente memoria se proporcionan métodos para tratar o prevenir la enfermedad o síndrome de Raynaud. En determinadas realizaciones, la esclerosis sistémica comprende enfermedad pulmonar de esclerodermia, crisis renal de esclerodermia, manifestaciones cardíacas, debilidad muscular (incluyendo la fatiga o CREST limitado), dismotilidad y espasmo gastrointestinal, y anomalías en el sistema nervioso central, periférico y autónomo (incluyendo el síndrome del túnel carpiano seguido de neuralgia trigeminal). También incluye discapacidad general, que incluye depresión, e impacto sobre la calidad de vida.

25 En determinadas realizaciones, el escleroderma limitado se limita a las manos, la cara, cuello, o combinaciones de los mismos.

30 En determinadas realizaciones, la esclerodermia difusa comprende endurecimiento cutáneo y también aparece sobre las muñecas (o codos). En determinadas realizaciones, la esclerosis sistémica difusa es esclerodermia sinusal, que comprende fibrosis de los órganos internos, pero no hay estiramiento cutáneo; o una esclerosis sistémica progresiva familiar.

35 En una realización, la esclerodermia no se asocia el con debilitamiento, tal como el debilitamiento asociado a la enfermedad.

40 En una realización, en la presente memoria se proporcionan métodos para la reducción, inhibición, o prevención de uno o más de los siguientes síntomas de la esclerodermia: (i) calcificación gradual, engrosamiento, y estiramiento cutáneo (por ejemplo, en extremidades, tal como en manos, cara, y pies); (ii) decoloración cutánea; (iii) entumecimiento de las extremidades; (iv) piel brillante; (v) pequeños bultos blanquecinos bajo la superficie cutánea que erupcionan en un fluido blanco como la tiza; (vi) disfunción esofágica de Raynaud (dolor, entumecimiento, y/o cambios de color en las manos causados por espasmos de los vasos sanguíneos en la exposición al calor o al estrés emocional); (vii) telangiectasia (puntos rojos en, por ejemplo, las manos, palmas, antebrazos, cara, y labios); (viii) dolor y/o rigidez de las articulaciones; (ix) inflamación de las manos y los pies; (x) prurito cutáneo; (xi) rigidez y encurvamiento de los dedos; (xii) úlceras (llagas) en el exterior de determinadas articulaciones, tales como los nudillos y los codos; (xiii) problemas digestivos, tales como ardor, dificultad al tragar, diarrea, intestino irritable, y estreñimiento; (xiv) fatiga y debilidad; (xv) dificultad respiratoria; (xvi) artritis; (xvii) pérdida del cabello; (xviii) problemas en órganos internos; (xix) úlceras digitales; o (xx) auto-amputación digital, que comprende administrar una cantidad eficaz del Compuesto I al paciente que necesita de los mismos.

50 Sin estar vinculado a ninguna teoría particular, se cree que el Compuesto I o una sal, solvato, hidrato, estereoisómero, tautómero o mezclas racémicas del mismo, aceptable farmacéuticamente, mejora la respuesta del sistema inmune Th1, y suprime la respuesta inmune Th2, lo que puede dar como resultado efectos anti-fibróticos en la piel.

55 En la presente memoria se proporcionan además métodos para mejorar o reducir el engrosamiento cutáneo de un paciente que tiene esclerodermia que comprende administrar al paciente una cantidad eficaz del Compuesto I o una sal, solvato, hidrato, estereoisómero, tautómero o mezclas racémicas del mismo, aceptable farmacéuticamente. En una realización, el engrosamiento cutáneo se reduce aproximadamente 20%, aproximadamente 25%,

aproximadamente 30%, aproximadamente 40%, aproximadamente 50%, aproximadamente 60%, aproximadamente 70%, aproximadamente 80%, aproximadamente 90% o más.

5 En la presente memoria se proporcionan además métodos para alcanzar uno o más desenlaces asociados a la esclerodermia que comprende administrar una cantidad eficaz del Compuesto I o una sal, solvato, hidrato, estereoisómero, tautómero o mezclas racémicas del mismo, aceptable farmacéuticamente, a un paciente que necesita de los mismos.

10 En la presente memoria se proporcionan además métodos para incrementar la supervivencia general, la tasa de respuesta objetiva, el tiempo de progresión, la supervivencia libre de progresión y/o el tiempo hasta el fracaso del tratamiento de un paciente que tiene esclerodermia, que comprende administrar a un paciente una cantidad eficaz del Compuesto I o una sal, solvato, hidrato, estereoisómero, tautómero o mezclas racémicas del mismo, aceptable farmacéuticamente.

15 En la presente memoria se proporcionan además métodos para reducir la mortalidad, la mortalidad respiratoria y/o la hospitalización respiratoria de un paciente que tiene esclerodermia, que comprende administrar al paciente una cantidad eficaz del Compuesto I o una sal, solvato, hidrato, estereoisómero, tautómero o mezclas racémicas del mismo, aceptable farmacéuticamente.

20 En la presente memoria se proporcionan además métodos para mejorar la puntuación cutánea modificada de Rodnan de un paciente que tiene esclerodermia, que comprende administrar al paciente una cantidad eficaz del Compuesto I o una sal, solvato, hidrato, estereoisómero, tautómero o mezclas racémicas del mismo, aceptable farmacéuticamente. En una realización, la mejora de la puntuación cutánea modificada de Rodnan es de 5, 10, 15 ó 20 puntos o más.

25 En la presente memoria se proporcionan además métodos para mejorar o reducir el engrosamiento cutáneo de un paciente que tiene esclerodermia, que comprende administrar al paciente una cantidad eficaz del Compuesto I o una sal, solvato, hidrato, estereoisómero, tautómero o mezclas racémicas del mismo, aceptable farmacéuticamente. En una realización, el engrosamiento cutáneo se reduce aproximadamente 20%, aproximadamente 25%, aproximadamente 30%, aproximadamente 40%, aproximadamente 50%, aproximadamente 60%, aproximadamente 70%, aproximadamente 80%, aproximadamente 90% o más.

En la presente memoria se proporcionan además métodos para mejorar o reducir la induración cutánea de un paciente que tiene esclerodermia, que comprende administrar al paciente una cantidad eficaz del Compuesto I o una sal, solvato, hidrato, estereoisómero, tautómero o mezclas racémicas del mismo, aceptable farmacéuticamente.

30 En la presente memoria se proporcionan además métodos para mejorar el índice de calidad de vida dermatológica de un paciente que tiene esclerodermia, que comprende administrar al paciente una cantidad eficaz del Compuesto I o una sal, solvato, hidrato, estereoisómero, tautómero o mezclas racémicas del mismo, aceptable farmacéuticamente.

35 En la presente memoria se proporcionan además métodos para mejorar la función pulmonar de un paciente que tiene esclerodermia, que comprende administrar al paciente una cantidad eficaz del Compuesto I o una sal, solvato, hidrato, estereoisómero, tautómero o mezclas racémicas del mismo, aceptable farmacéuticamente.

40 En la presente memoria se proporcionan además métodos para mejorar la capacidad de difusión de monóxido de carbono de un paciente que tiene esclerodermia, que comprende administrar al paciente una cantidad eficaz del Compuesto I o una sal, solvato, hidrato, estereoisómero, tautómero o mezclas racémicas del mismo, aceptable farmacéuticamente. En una realización, la capacidad de difusión de monóxido de carbono de un paciente se mejora mediante una mejora en la capacidad de difusión del pulmón del monóxido de carbono (D_LCO) de aproximadamente 10%, aproximadamente 20%, aproximadamente 25%, aproximadamente 30%, aproximadamente 40%, aproximadamente 50%, aproximadamente 60%, aproximadamente 70%, aproximadamente 80%, aproximadamente 90% o más.

45 En la presente memoria se proporcionan además métodos para mejorar el índice de Disnea de Mahler de un paciente que tiene esclerodermia, que comprende administrar al paciente una cantidad eficaz del Compuesto I o una sal, solvato, hidrato, estereoisómero, tautómero o mezclas racémicas del mismo, aceptable farmacéuticamente. En una realización, el índice de Disnea de Mahler es de 4, 5, 6, 7, 8, 9 ó 10 puntos o más.

50 En la presente memoria se proporcionan además métodos para mejorar la puntuación del Cuestionario Respiratorio de Saint George de un paciente que tiene esclerodermia, que comprende administrar al paciente una cantidad eficaz del Compuesto I o una sal, solvato, hidrato, estereoisómero, tautómero o mezclas racémicas del mismo, aceptable farmacéuticamente. En una realización, la mejora de la puntuación del Cuestionario Respiratorio de Saint George es de 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 36, 40, 44, 48, 52 puntos o más.

55 En la presente memoria se proporcionan además métodos para mejorar la puntuación del tracto gastrointestinal del consorcio de ensayos clínicos de esclerodermia de UCLA de un paciente que tiene esclerodermia, que comprende

administrar al paciente una cantidad eficaz del Compuesto I o una sal, solvato, hidrato, estereoisómero, tautómero o mezclas racémicas del mismo, aceptable farmacéuticamente.

5 En la presente memoria se proporcionan además métodos para tratar o prevenir úlceras digitales de un paciente o población de pacientes que tiene esclerodermia, que comprende administrar al paciente una cantidad eficaz del Compuesto I o una sal, solvato, hidrato, estereoisómero, tautómero o mezclas racémicas del mismo, aceptable farmacéuticamente.

En la presente memoria se proporcionan además métodos para mejorar la dilatación por flujo de un paciente que tiene esclerodermia, que comprende administrar al paciente una cantidad eficaz del Compuesto I o una sal, solvato, hidrato, estereoisómero, tautómero o mezclas racémicas del mismo, aceptable farmacéuticamente.

10 En la presente memoria se proporcionan además métodos para mejorar o incrementar la distancia caminada durante seis minutos de un paciente que tiene esclerodermia, que comprende administrar al paciente una cantidad eficaz del Compuesto I o una sal, solvato, hidrato, estereoisómero, tautómero o mezclas racémicas del mismo, aceptable farmacéuticamente. En una realización, la mejora de la distancia caminada durante seis minutos es aproximadamente 200 metros, aproximadamente 250 metros, aproximadamente 300 metros, aproximadamente 350
15 metros, aproximadamente 400 metros, o más.

Tratamiento del Lupus Eritematoso

20 En determinadas realizaciones, en la presente memoria se proporcionan métodos para tratar, prevenir y/o manejar el lupus eritematoso o un síntoma del mismo, que comprende administrar a un paciente que tiene lupus eritematoso una cantidad eficaz del Compuesto I o una sal, solvato, hidrato, estereoisómero, tautómero o mezclas racémicas del mismo, aceptable farmacéuticamente.

En una realización, se proporcionan en la presente memoria métodos para prevenir el lupus eritematoso o un síntoma del mismo, que comprende administrar a un paciente que tiene riesgo de tener lupus eritematoso una cantidad eficaz del Compuesto I o una sal, solvato, hidrato, estereoisómero, tautómero o mezclas racémicas del mismo, aceptable farmacéuticamente.

25 En determinadas realizaciones, se proporcionan en la presente memoria métodos para tratar, prevenir y/o manejar el lupus eritematoso sistémico (SLE), el lupus eritematoso cutáneo (CLE) o el lupus inducido por fármacos.

30 La frase "Lupus eritematoso sistémico" que se emplea en la presente memoria es intercambiable con el SLE, y el lupus se refiere a todas las manifestaciones de la enfermedad como se conocen en la técnica (incluyendo las remisiones y los brotes). En el SLE, la hiperactividad anormal de los linfocitos B y la producción anormal masiva de los auto-anticuerpos inmunoglobulina gamma (IgG), juegan un papel clave. Este proceso patológico da como resultado un secuestro y destrucción de células recubiertas con Ig, fijación y unión de proteínas del complemento, y liberación de quimiotaxinas, péptidos vasoactivos y enzimas destructoras en los tejidos (Hahn BH. Systemic Lupus Erythematosus. In: Kasper DL, Braunwald E, Fauci AS, Hauser SL, Longo DL, Jameson, JL, editores. In: *Harrison's Principles of Internal Medicine* (16ª edición). Nueva York (US): McGraw-Hill; 2005. pp.1960-1967).

35 Los síntomas del SLE varían de una persona a otra, y pueden ir y venir. En la mayoría de los pacientes, los síntomas incluyen dolor e inflamación articular. Frecuentemente las articulaciones afectadas son los dedos, manos, muñecas, y rodillas. Algunos pacientes desarrollan artritis. Otros síntomas comunes incluyen: dolor torácico al respirar profundamente, fatiga, fiebre sin otra causa, malestar general, indisposición, o sensación general de enfermedad (dolencia), pérdida de cabello, llagas orales, ganglios linfáticos inflamados, sensibilidad a la luz solar,
40 erupción cutánea- una erupción en forma de "mariposa" sobre las mejillas y el puente de la nariz que afecta aproximadamente a la mitad de las personas con SLE, en algunos pacientes, la erupción empeora a la luz solar, y la erupción también se puede extender.

Otros síntomas dependen de qué parte del cuerpo se afecte, y pueden incluir lo siguiente:

45 Cerebro y sistema nervioso: cefaleas, entumecimiento, hormigueo, convulsiones, problemas de visión, cambios de personalidad,

Tracto digestivo: dolor abdominal, náuseas, y vómitos,

Corazón: ritmos cardíacos anormales (arritmias),

Pulmón: tos con sangre y dificultad respiratoria, y

Piel: color cutáneo en parches, dedos que cambian de color con el frío (fenómeno de Raynaud).

50 Algunos pacientes sólo tienen síntomas cutáneos. Esto se llama lupus discoide.

En una realización, en la presente memoria se proporcionan métodos para tratar el SLE moderado, grave, o muy grave. El término "SLE grave" como se emplea en la presente memoria se refiere a una afección de SLE donde el

paciente tiene uno o más síntomas o que amenazan a la vida (tal como anemia hemolítica, implicación grave del corazón o los pulmones, enfermedad renal, o implicación del sistema nervioso).

5 En la presente memoria se proporcionan además métodos para lograr uno o más de los objetivos asociados con el SLE que comprende administrar una cantidad eficaz del Compuesto I o una sal, solvato, hidrato, estereoisómero, tautómero o mezclas racémicas del mismo, aceptable farmacéuticamente a un paciente que necesita de los mismos.

10 En la presente memoria se proporcionan además métodos para incrementar la supervivencia general, la tasa de respuesta objetiva, el tiempo de progresión, la supervivencia libre de progresión y/o el tiempo hasta el fracaso del tratamiento de un paciente que tiene SLE, que comprende administrar al paciente una cantidad eficaz del Compuesto I o una sal, solvato, hidrato, estereoisómero, tautómero o mezclas racémicas del mismo, aceptable farmacéuticamente.

15 En una realización determinada, el Compuesto I o una sal, hidrato, estereoisómero, tautómero o mezclas racémicas del mismo, aceptable farmacéuticamente actúa como un inhibidor de la diferenciación de células B CD19+ de memoria humana primaria para la etapa del plasmoblasto. Sin estar vinculado a ninguna teoría en particular, se cree que el Compuesto I o una sal, solvato, hidrato, estereoisómero, tautómero o mezclas racémicas del mismo, aceptable farmacéuticamente, bloquean así a las células en una etapa prematura descendiendo el número de plasmoblastos que son capaces de producir mayores niveles de inmunoglobulina. Una consecuencia funcional de este efecto es reducir la producción de inmunoglobulina G (IgG) e inmunoglobulina M (IgM) en estos cultivos de diferenciación.

20 En determinadas realizaciones, el Compuesto I o una sal, solvato, hidrato, estereoisómero, tautómero o mezclas racémicas del mismo, aceptable farmacéuticamente, inhibe la capacidad de las células B CD19+ de memoria humana primaria para diferenciarse a la etapa de plasmoblasto. En determinadas realizaciones el Compuesto I o una sal, solvato, hidrato, estereoisómero, tautómero o mezclas racémicas del mismo, aceptable farmacéuticamente, no tienen un efecto significativo en las células plasmáticas maduras CD138+ en cultivos a corto plazo. En determinadas realizaciones, el Compuesto I o una sal, solvato, hidrato, estereoisómero, tautómero o mezclas racémicas del mismo, aceptable farmacéuticamente, inhibe factores de diferenciación de células B que incluyen el factor 4 regulador del interferón (IRF4), la proteína de maduración inducida por linfocitos (BLIMP), proteína de unión a la caja X-1 (XBP-1) y proteína 6 del linfoma de células B (Bcl6).

Tratamiento de Otras Enfermedades o Trastornos Relacionados con el sistema Inmune

30 En la presente memoria se proporcionan además métodos para tratar, manejar, o prevenir otras enfermedades o afecciones relacionadas con el sistema inmune empleando el Compuesto I o una sal, solvato, hidrato, estereoisómero, tautómero o mezclas racémicas del mismo, aceptable farmacéuticamente. En determinadas realizaciones, por ejemplo, en la presente invención se proporciona un método para tratar un individuo que tiene una enfermedad o trastorno, en donde la enfermedad o trastorno es causada por, o se asocia con, una respuesta inmune inadecuada o no deseable, *por ejemplo*, una enfermedad, trastorno o afección que se puede tratar beneficiosamente mediante inmunosupresión, que comprende administrar al individuo el Compuesto I o una sal, solvato, hidrato, estereoisómero, tautómero o mezclas racémicas del mismo, aceptable farmacéuticamente.

40 En varias realizaciones específicas, dicha enfermedad relacionada con el sistema inmune es una o más de las seleccionadas del síndrome de Sjögren, vasculitis inducida por ANCA, síndrome anti-fosfolípido, miastenia gravis, enfermedad de Addison, alopecia areata, espondilitis anquilosante, síndrome del anticuerpo anti-fosfolípido, síndrome anti-fosfolípido (primario o secundario), asma, gastritis autoinmune, anemia hemolítica autoinmune, hepatitis autoinmune, enfermedad autoinmune del oído interno, enfermedad linfoproliferativa autoinmune, púrpura trombocitopénica autoinmune, enfermedad de Baló, enfermedad de Behcet, penfigoide buloso, cardiomiopatía, enfermedad celiaca, enfermedad de Chagas, polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica, penfigoide cicatricial (*por ejemplo*, penfigoide de la membrana mucosa), enfermedad de aglutinina fría, enfermedad de Degos, dermatitis herpetiforme, crioglobulinemia mixta esencial, síndrome de Goodpasture, síndrome de enfermedad de Graves, síndrome de Guillain-Barre, tiroiditis de Hashimoto (enfermedad de Hashimoto; tiroiditis autoinmune), fibrosis pulmonar idiopática, púrpura trombocitopénica idiopática, nefropatía IgA, artritis juvenil, líquen plano, enfermedad de Ménière, enfermedad tisular conectiva mixta, morfea, narcolepsia, neuromiotonía, trastornos neuropsiquiátricos autoinmunes pediátricos (PANDAs), pénfigo vulgar, anemia perniciosa, poliarteritis nodosa, policondritis, polimialgia reumática, agammaglobulinemia primaria, cirrosis biliar primaria, enfermedad de Raynaud (fenómeno de Raynaud), síndrome de Reiter, policondritis recidivante, fiebre reumática, síndrome de Sjögren, síndrome de la persona rígida (síndrome de Moersch-Woltmann), arteritis de Takayasu, arteritis temporal (arteritis de las células gigantes), uveítis, vasculitis (*por ejemplo*, vasculitis no asociada con el lupus eritematoso), vitíligo, y/o granulomatosis de Wegener.

55 Dosificaciones y cantidades de dosificación

La dosis del Compuesto I o una sal, solvato, hidrato, estereoisómero, tautómero o mezclas racémicas del mismo, aceptable farmacéuticamente, que se le administra al paciente es generalmente bastante variable y puede estar sujeta a juicio del profesional sanitario. Las dosis del Compuesto I o una sal, solvato, hidrato, estereoisómero,

5 tautómero o mezclas racémicas del mismo, aceptable farmacéuticamente, varía dependiendo de factores tales como: indicación específica a tratar, prevenir, o manejar; edad y condición del paciente; y de la cantidad del segundo agente activo que se use, si lo hubiera. En general, el Compuesto I o una sal, solvato, hidrato, estereoisómero, tautómero o mezclas racémicas del mismo, aceptable farmacéuticamente, se puede administrar en un paciente de una a cuatro veces o más al día, en una dosis de aproximadamente 0,005 mg/kg del peso corporal del paciente hasta aproximadamente 10 mg/kg del peso corporal del paciente, pero la dosis anterior puede variar adecuadamente dependiendo de la edad, peso corporal y condición del paciente y del tipo de administración. En una realización, la dosis es aproximadamente 0,01 mg/kg del peso corporal del paciente hasta aproximadamente 5 mg/kg del peso corporal del paciente, aproximadamente 0,05 mg/kg del peso corporal del paciente hasta 10 aproximadamente 1 mg/kg del peso corporal del paciente, aproximadamente 0,1 mg/kg del peso corporal del paciente hasta aproximadamente 0,75 mg/kg del peso corporal del paciente o aproximadamente 0,25 mg/kg del peso corporal del paciente hasta aproximadamente 0,5 mg/kg del peso corporal del paciente.

15 En una realización, se proporciona una dosis al día. De todos modos, la cantidad administrada del Compuesto I o una sal, solvato, hidrato, estereoisómero, tautómero o mezclas racémicas del mismo, aceptable farmacéuticamente, dependerá de factores tales como la solubilidad del componente activo, la formulación que se utilice y de la ruta de administración. En una realización, la aplicación de una concentración tópica proporciona exposiciones intracelulares o concentraciones de aproximadamente 0,01 - 10 µM.

20 En determinadas realizaciones, el Compuesto I o una sal, solvato, hidrato, estereoisómero, tautómero o mezclas racémicas del mismo, aceptable farmacéuticamente, se emplea en una cantidad de aproximadamente 0,1 mg hasta aproximadamente 1000 mg al día, y se puede ajustar de una manera convencional (*por ejemplo*, se administra la misma cantidad cada día del periodo del tratamiento, prevención o manejo), en ciclos (*por ejemplo*, una semana sí, una semana no), o en una cantidad que incrementa o desciende en el transcurso del tratamiento, prevención, o manejo. En otras realizaciones, la dosis puede ser desde aproximadamente 1 mg hasta aproximadamente 300 mg, desde aproximadamente 0,1 mg hasta aproximadamente 150 mg, desde aproximadamente 1 mg hasta 25 aproximadamente 200 mg, desde aproximadamente 10 mg hasta aproximadamente 100 mg, desde aproximadamente 0,1 mg hasta aproximadamente 50 mg, desde aproximadamente 1 mg hasta aproximadamente 50 mg, desde aproximadamente 10 mg hasta aproximadamente 50 mg, desde aproximadamente 20 mg hasta aproximadamente 30 mg, o desde aproximadamente 1 mg hasta aproximadamente 20 mg.

Terapia de combinación

30 En métodos y composiciones que se proporcionan en la presente memoria, el Compuesto I o una sal, solvato, hidrato, estereoisómero, tautómero o mezclas racémicas del mismo, aceptable farmacéuticamente, se puede combinar con otros compuestos activos farmacológicamente ("agentes activos secundarios"). Determinadas combinaciones pueden funcionar sinérgicamente en el tratamiento de determinados tipos de enfermedades o trastornos, y en afecciones y síntomas asociados con tales enfermedades o trastornos. El Compuesto I o una sal, 35 solvato, hidrato, estereoisómero, tautómero o mezclas racémicas del mismo, aceptable farmacéuticamente, puede funcionar también para aliviar efectos adversos asociados con determinados agentes activos secundarios, y viceversa.

40 En los métodos y composiciones proporcionados en la presente memoria se pueden emplear uno o más ingredientes o agentes activos secundarios. Los agentes activos secundarios pueden ser grandes moléculas (*por ejemplo*, proteínas) o moléculas pequeñas (*por ejemplo*, moléculas sintéticas inorgánicas, organometálicas, u orgánicas).

45 En otra realización, el método del tratamiento que se proporciona en la presente memoria comprende la administración de un segundo agente terapéutico, en donde el segundo agente terapéutico es un fármaco anti-inflamatorio, *por ejemplo*, un fármaco anti-inflamatorio esteroideo, o un fármaco anti-inflamatorio no-esteroideo (AINE), acetaminofeno, naproxeno, ibuprofeno, ácido acetilsalicílico, y similares. En una realización más específica en la que se administra un AINE, se puede administrar también un inhibidor de la bomba de protones (PPI, de sus siglas en inglés), *por ejemplo*, omeprazol. En una realización, el agente antiinflamatorio es un corticoide. En otra realización, el agente antiinflamatorio es colchicina.

50 En otra realización, el segundo agente terapéutico es un compuesto inmunomodulador o un compuesto inmunosupresor, tal como azatioprina (ImuranTM, AzasanTM), metotrexato (RheumatrexTM, TrexallTM), penicilamina (DepenTM, CuprimineTM), ciclofosfamida (CytosanTM), micofenolato (CellCeptTM, MyforticTM), bosentán (Tracleer®), prednisona (DeltasoneTM, Liquid PredTM), y un inhibidor de la PDE5. En otra realización, donde el individuo afectado tiene ulceraciones digitales e hipertensión pulmonar, se puede administrar un vasodilatador, tal como prostaciclina (iloprost).

55 En otra realización, el segundo agente activo es un inhibidor de los receptores ActRII o un inhibidor de activina-ActRII. Inhibidores de los receptores ActRII, incluyen inhibidores ActRIIA e inhibidores ActRIIB. Los inhibidores de los receptores ActRII pueden ser polipéptidos que comprenden dominios de unión de activina de ActRII. En determinadas realizaciones, el dominio de unión a activina que comprende polipéptidos se une a una porción Fc de un anticuerpo (*es decir*, se genera un conjugado que comprende un dominio de unión a activina que comprende un

polipéptido de un receptor ActRII y una porción Fc de un anticuerpo). En determinadas realizaciones, el dominio de unión a activina, se une a una porción Fc de un anticuerpo a través de un enlazador, *por ejemplo*, un enlazador peptídico.

5 Un ejemplo de un polipéptido ActRIIA de unión a activina fusionado a un dominio Fc humano se proporciona en SEQ ID NO: 1.

SEQ ID NO:1

ILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQTGVEPCYGDKDKRRHCFATWKNISGS
 IEIVKQGCWLDDINCYDRTDCVEKKDSPEVYFCCCEGNMCNEKFSYFPEM
 EVTQPTSNPVTPKPPTGGGTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI
 SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV
 SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPVPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP
 SREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGS
 FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

10 Un ejemplo de proteína de fusión que comprende un dominio extracelular soluble de ActRIIB fusionado a un dominio Fc se proporciona en SEQ ID NO: 2

SEQ ID NO:2

ETRECIYYNANWELERTNQGLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVK
 KGCWDDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEV
 TYEPPPTGGGTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV
 VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD
 WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ
 VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTV
 DKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

15 Otros ejemplos de proteínas no anticuerpos seleccionados para unirse a activina o a ActRIIA y métodos para diseñar y seleccionar los mismos se encuentran en WO/2002/088171, WO/2006/055689, WO/2002/032925, WO/2005/037989, US 2003/0133939, y US 2005/0238646, cada una de las cuales se incorporan en la presente memoria por referencia en su totalidad.

20 Se puede administrar cualquier combinación de los agentes terapéuticos anteriores, adecuados para el tratamiento de las enfermedades o síntomas de las mismas. Tales agentes terapéuticos se pueden administrar en cualquier combinación con el Compuesto I o una sal, solvato, hidrato, estereoisómero, tautómero o mezclas racémicas del mismo, aceptable farmacéuticamente, al mismo tiempo o separados en el transcurso del tratamiento.

Terapia de ciclo

25 En determinadas realizaciones, el Compuesto I o una sal, solvato, hidrato, estereoisómero, tautómero o mezclas racémicas del mismo, aceptable farmacéuticamente, que se proporciona en la presente memoria se administra de manera cíclica a un paciente. La terapia de ciclo implica la administración de un agente activo durante un periodo de tiempo, seguido de un descanso (*es decir*, suspensión de la administración) durante un periodo de tiempo, y repetición de esta administración secuencial. La terapia de ciclo puede reducir el desarrollo de resistencia para una o más de las terapias, evita o reduce los efectos adversos de una de las terapias, y/o mejora la eficacia del tratamiento.

Por consiguiente, en una realización, se proporciona en la presente memoria un compuesto que se administra diariamente en una sola dosis o en dosis divididas en un ciclo de unas cuatro a seis semanas con un periodo de descanso de aproximadamente una semana o dos semanas. La terapia de ciclo permite además incrementar la frecuencia, el número, y la duración de los ciclos de dosificación. Por tanto, otra realización comprende la administración de un compuesto que se proporciona en la presente memoria para administrar en más ciclos que los típicos cuando se administra en solitario. En otra realización, en la presente memoria se proporciona un compuesto que se administra durante un mayor número de ciclos que los que causarían toxicidad limitante de dosis en un paciente para el cual no se está administrando un segundo ingrediente activo.

En una realización, en la presente memoria se proporciona un compuesto que se administra diariamente y continuamente durante tres o cuatro semanas a una dosis desde aproximadamente 0,1 mg hasta aproximadamente 500 mg al día, seguido de un descanso de una o dos semanas. En otras realizaciones, la dosis puede ser desde aproximadamente 1 mg hasta aproximadamente 300 mg, desde aproximadamente 0,1 mg hasta aproximadamente 150 mg, desde aproximadamente 1 mg hasta aproximadamente 200 mg, desde aproximadamente 10 mg hasta aproximadamente 100 mg, desde aproximadamente 0,1 mg hasta aproximadamente 50 mg, desde aproximadamente 1 mg hasta aproximadamente 50 mg, desde aproximadamente 10 mg hasta aproximadamente 50 mg, desde aproximadamente 20 mg hasta aproximadamente 30 mg, o desde aproximadamente 1 mg hasta aproximadamente 20 mg, seguido de un descanso.

En una realización, en la presente memoria se proporciona un compuesto y un segundo ingrediente activo que se administran por vía oral, con una administración del compuesto proporcionado en la presente memoria que se produce 30 a 60 minutos antes del segundo ingrediente activo, durante un ciclo de cuatro a seis semanas. En otra realización, se administra la combinación de un compuesto que se proporciona en la presente memoria y un segundo ingrediente activo, mediante infusión intravenosa a lo largo de aproximadamente 90 minutos en cada ciclo.

Normalmente, el número de ciclos durante el cual se administra el tratamiento de combinación a un paciente irá desde aproximadamente uno hasta aproximadamente 24 ciclos, desde aproximadamente dos hasta aproximadamente 16 ciclos, o desde aproximadamente tres hasta aproximadamente cuatro ciclos.

Composiciones farmacéuticas y formas de dosificación

Las composiciones farmacéuticas se pueden emplear en la preparación de formas de dosificación unitaria, individual. Las composiciones farmacéuticas y las formas de dosificación que se proporcionan en la presente memoria comprenden un compuesto proporcionado en la presente memoria, o una sal, solvato, hidrato, estereoisómero, racemato, clatrato, o un profármaco del mismo, aceptable farmacéuticamente. Las composiciones farmacéuticas y las formas de dosificación pueden comprender además uno o más excipientes.

Las composiciones farmacéuticas y las formas de dosificación que se proporcionan en la presente memoria pueden comprender también uno o más ingredientes activos adicionales. Ejemplos de segundos ingredientes activos opcionales o adicionales, se describen anteriormente.

Las formas de dosificación unitarias que se proporcionan en la presente memoria son adecuadas para la administración oral, a través de mucosas (*por ejemplo*, nasal, sublingual, vaginal, bucal, o rectal), parenteral (*por ejemplo*, subcutánea, intravenosa, inyección por bolo, intramuscular, o intra-arterial), tópica (*por ejemplo*, gotas oculares u otras preparaciones oftálmicas), transdérmica o transcutánea, a un paciente. Ejemplos de formas de dosificación incluyen, pero no se limitan a: comprimidos, pastillas, cápsulas, tales como cápsulas de gelatina blanda elástica; papelillos; dispersiones; supositorios; polvos; aerosoles (*por ejemplo*, pulverizadores o inhaladores nasales); geles; formas de dosificación líquidas adecuadas para administración oral o a través de las mucosas a un paciente, incluyendo suspensiones (*por ejemplo*, suspensiones líquidas acuosas o no-acuosas, emulsiones de fase externa oleosa, o emulsiones líquidas de fase externa acuosa), disoluciones, y elixires; formas de dosificación líquida adecuadas para administración parenteral a un paciente; gotas oculares u otras preparaciones oftálmicas adecuadas para administración tópica; y sólidos estériles (*por ejemplo*, sólidos cristalinos o amorfos) que se pueden reconstituir para proporcionar formas de dosificación líquidas adecuadas para la administración parenteral a un paciente.

La composición, forma, y tipo de formas de dosificación variará dependiendo de su uso. Por ejemplo, una forma de dosificación que se emplea en el tratamiento agudo de una enfermedad puede contener mayores cantidades de uno o más de los ingredientes activos de los que comprende una forma de dosificación empleada en el tratamiento crónico de la misma enfermedad. De forma similar, una forma de dosificación parenteral puede contener cantidades más pequeñas de uno o más de los ingredientes activos de los que comprende una forma de dosificación oral empleada para tratar la misma enfermedad. Estas y otras maneras en las que varían las formas de dosificación específicas empedadas serán fácilmente evidentes para los expertos en la técnica. Véase, *por ejemplo*, *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 20ª edición; Mack Publishing, Easton PA (2000).

En una realización, las composiciones farmacéuticas y las formas de dosificación comprenden uno o más excipientes. Los excipientes adecuados son bien conocidos por los expertos en la técnica de la farmacia, y en la presente memoria se proporcionan ejemplos no limitantes de excipientes adecuados. Si un excipiente en particular

es adecuado para la incorporación en una composición farmacéutica o forma de dosificación depende de una variedad de factores bien conocidos en la técnica que incluyen, pero no se limitan a, la manera en la cual se administrará la forma de dosificación a un paciente. Por ejemplo, formas de dosificación oral, tales como comprimidos pueden contener excipientes no adecuados para el uso en formas de dosificación parenteral. La idoneidad de un excipiente particular puede depender también de los ingredientes activos específicos en la forma de dosificación. Por ejemplo, la descomposición de algunos ingredientes activos se puede acelerar por algunos excipientes, tales como lactosa, o cuando se exponen al agua. Los ingredientes activos que comprenden aminos primarias o secundarias son particularmente susceptibles a tal descomposición acelerada. Por consiguiente, las composiciones farmacéuticas y las formas de dosificación proporcionadas contienen poca, si la hubiera, lactosa u otros mono- o di-sacáridos. Como se emplea en la presente memoria, el término "libre en lactosa" significa que la cantidad de lactosa presente, si la hubiera, es insuficiente para incrementar sustancialmente la tasa de degradación de un ingrediente activo.

Las composiciones libres en lactosa pueden comprender excipientes que son bien conocidos en la técnica y se enumeran, por ejemplo, en la *U.S. Pharmacopeia* (USP) 25-NF20 (2002). En general, las composiciones libres en lactosa comprenden ingredientes activos, un aglutinante/rellenador, y un lubricante en cantidades compatibles farmacéuticamente y aceptables farmacéuticamente. En una realización, las formas de dosificación libres en lactosa comprenden ingredientes activos, celulosa microcristalina, almidón pre-gelatinizado y estearato de magnesio.

También se proporcionan composiciones farmacéuticas y formas de dosificación anhidras que comprenden ingredientes activos, ya que el agua puede facilitar la degradación de algunos compuestos. Por ejemplo, la adición de agua (*por ejemplo*, 5%) es ampliamente aceptada en las técnicas farmacéuticas como un medio de simulación del almacenamiento a largo plazo para determinar características, tales como la vida media o la estabilidad de las formulaciones a largo plazo. Véase, *por ejemplo*, Jens T. Carstensen, *Drug Stability: Principles & Practice*, 2ª Edición, Marcel Dekker, NY, NY, 1995, pp. 379-80. En efecto, el agua y el calor aceleran la descomposición de algunos compuestos. Por tanto, el efecto del agua en una formulación puede ser de gran significancia ya que la hidratación y/o humedad se encuentran normalmente durante la fabricación, manipulación, empaquetado, almacenamiento, transporte, y uso de las formulaciones.

Las composiciones farmacéuticas y formas de dosificación anhidras se pueden preparar empleando ingredientes anhidros o que contienen poca hidratación y condiciones de baja hidratación o baja humedad. Las composiciones farmacéuticas y las formas de dosificación que comprenden lactosa, y al menos un ingrediente activo que comprende una amina primaria o secundaria, son anhidros si se prevé el contacto sustancial con la hidratación y/o humedad durante la fabricación, empaquetado, y/o almacenamiento.

Una composición farmacéutica anhidra se debería preparar y almacenar de tal forma que se mantuviera su naturaleza anhidra. Por consiguiente, las composiciones anhidras, en una realización, se envasan empleando materiales conocidos para prevenir la exposición al agua, de tal forma que se puedan incluir en kits de formulación adecuados. Ejemplos de envases adecuados incluyen, pero no se limitan a, láminas selladas herméticamente, plásticos, envases de dosis unitaria (*por ejemplo*, viales), envases en blíster, y envases en tiras.

También se proporcionan composiciones farmacéuticas y formas de dosificación que comprenden uno o más compuestos que reducen la tasa mediante la cual se descompondrá un ingrediente activo. Tales compuestos, que se refieren en la presente memoria como "estabilizantes", incluyen pero no se limitan a, antioxidantes tales como ácido ascórbico, reguladores del pH, o reguladores de la sal.

Al igual que las cantidades y los tipos de excipientes, las cantidades y los tipos específicos de los ingredientes activos en una forma de dosificación, pueden diferir dependiendo de factores tales como, pero no limitados a, la vía mediante la cual se va a administrar a los pacientes. En una realización, las formas de dosificación comprenden un compuesto proporcionado en la presente memoria en una cantidad desde aproximadamente 0,10 hasta aproximadamente 500 mg. En otras realizaciones, las formas de dosificación comprenden un compuesto proporcionado en la presente memoria en una cantidad de aproximadamente 0,1, 1, 2, 5, 7,5, 10, 12,5, 15, 17,5, 20, 25, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, ó 500 mg.

En otras realizaciones, las formas de dosificación comprenden el segundo ingrediente activo en una cantidad de a 1 hasta aproximadamente 1000 mg, desde aproximadamente 5 hasta aproximadamente 500 mg, desde aproximadamente 10 hasta aproximadamente 350 mg, o desde aproximadamente 50 hasta aproximadamente 200 mg. Por supuesto, la cantidad específica del segundo agente activo dependerá del agente específico que se emplee, las enfermedades o trastornos que se están tratando o manejando, y de la cantidad o cantidades de un compuesto proporcionado en la presente memoria, y de cualquier agente activo adicional opcional que se administre simultáneamente al paciente.

Formas de Dosificación Oral

Las composiciones farmacéuticas que son adecuadas para la administración oral se pueden proporcionar como formas de dosificación diferenciadas, tales como, pero no limitadas a, comprimidos (*por ejemplo*, comprimidos masticables), pastillas, cápsulas y líquidos (*por ejemplo*, jarabes aromatizados). Tales formas de dosificación

contienen cantidades predeterminadas de los ingredientes activos, y se pueden preparar mediante métodos farmacéuticos bien conocidos por los expertos en la técnica. Véase *generalmente, Remington's Pharmaceutical Sciences*, 20ª edición; Mack Publishing, Easton PA (2000).

5 Las formas de dosificación oral que se proporcionan en la presente memoria se preparan mediante la combinación de ingredientes activos en una mezcla íntima con al menos un excipiente según las técnicas de compuestos farmacéuticos convencionales. Los excipientes pueden tomar una amplia variedad de formas dependiendo de la forma de la preparación deseada para la administración. Por ejemplo, excipientes adecuados para usar en formas de dosificación líquida oral o en aerosol incluyen, pero no se limitan a, agua, glicoles, aceites, alcoholes, agentes saborizantes, conservadores, y agentes colorantes. Ejemplos de excipientes adecuados para usar en formas de dosificación orales sólidas (*por ejemplo*, polvos, comprimidos, capsulas, y pastillas) incluyen, pero no se limitan a, almidones, azúcares, celulosa microcristalina, diluyentes, agentes de granulación, lubricantes, aglutinantes, y agentes disgregantes.

15 En una realización, las formas de dosificación oral son comprimidos o cápsulas, en cuyo caso se emplean excipientes sólidos. En otra realización, los comprimidos se pueden recubrir mediante técnicas estándar acuosas o no acuosas. Tales formas de dosificación se pueden preparar mediante cualquiera de los métodos de farmacia. En general, las composiciones farmacéuticas y las formas de dosificación se preparan mezclando uniforme e íntimamente los ingredientes activos de la mezcla con los vehículos líquidos, los vehículos sólidos finamente divididos, o ambos, y dando forma después al producto en la presentación deseada si es necesario.

20 Por ejemplo, un comprimido se puede preparar mediante compresión o moldeado. Los comprimidos se pueden preparar mediante la compresión en una máquina adecuada de los ingredientes activos en una forma que fluye libremente, tal como en polvos o gránulos, mezclado opcionalmente con un excipiente. El moldeado de los comprimidos se puede realizar mediante el moldeado en una máquina adecuada de una mezcla del compuesto en polvo humedecida con un diluyente líquido inerte.

25 Ejemplos de excipientes que se pueden emplear en las formas de dosificación oral que se proporcionan en la presente memoria incluyen, pero no se limitan a, aglutinantes, rellenos, disgregantes, y lubricantes. Aglutinantes adecuados para su empleo en composiciones farmacéuticas y formas de dosificación incluyen, pero no se limitan a, almidón de maíz, almidón de patata, u otros almidones, gelatina, gomas sintéticas y naturales tales como de acacia, alginato sódico, ácido alginico, otros alginatos, tragacanto en polvo, goma guar, celulosa y sus derivados (*por ejemplo*, etilcelulosa, acetato de celulosa, carboximetilcelulosa cálcica, carboximetilcelulosa sódica), polivinilpirrolidona, metilcelulosa, almidón pre-gelatinizado, hidroxipropilmetilcelulosa, (*por ejemplo*, Nos 2208, 2906, 2910), celulosa microcristalina, y mezclas de los mismos.

35 Formas adecuadas de la celulosa microcristalina incluyen, pero no se limitan a, el material vendido como AVICEL-PH-101, AVICEL-PH-103 AVICEL RC-581, AVICEL-PH-105 (disponible en FMC Corporation, American Viscose Division, Avicel Sales, Marcus Hook, PA), y mezclas de las mismas. Un aglutinante específico es una mezcla de celulosa microcristalina y carboximetilcelulosa sódica vendida como AVICEL RC-581. Excipientes o aditivos adecuados anhidros o de baja humedad incluyen AVICEL-PH-103TM y Almidón 1500 LM.

40 Ejemplos de rellenos adecuados para emplear en las composiciones farmacéuticas y las formas de dosificación que se proporcionan en la presente memoria incluyen, pero no se limitan a, talco, carbonato cálcico (*por ejemplo*, gránulos o polvos), celulosa microcristalina, celulosa en polvo, dextratos, caolín, manitol, ácido salicílico, sorbitol, almidón, almidón pre-gelatinizado, y mezclas de los mismos. El aglutinante o relleno en las composiciones farmacéuticas está presente en una realización, desde aproximadamente 50 hasta aproximadamente 99 por ciento del peso de la composición farmacéutica o forma de dosificación.

45 Los disgregantes se pueden emplear en las composiciones para proporcionar comprimidos que se disgregan cuando se exponen a un entorno acuoso. Los comprimidos que contienen demasiado disgregante puede disgregarse en el almacenamiento, aunque contengan muy poco puede que no se disgreguen en una tasa deseada o bajo las condiciones que se desean. Por tanto, se puede emplear para formas de dosificación oral sólida, una cantidad suficiente de disgregante que ni sea demasiado ni muy poca para alterar negativamente la liberación de los ingredientes activos. La cantidad de disgregante empleada varía en base al tipo de formulación, y es fácilmente apreciable para los expertos en la técnica. En una realización, las composiciones farmacéuticas comprenden desde aproximadamente 0,5 hasta aproximadamente 15 por ciento en peso del disgregante, o desde aproximadamente 1 hasta aproximadamente 5 por ciento en peso de disgregante.

55 Los disgregantes que se pueden emplear en las composiciones farmacéuticas y en las formas de dosificación incluyen, pero no se limitan a, agar-agar, ácido alginico, carbonato cálcico, celulosa microcristalina, croscarmelosa sódica, crospovidona, polacrilina potásica, glicolato sódico de almidón, almidón de patata o tapioca, otros almidones, almidón pre-gelatinizado, otros almidones, arcillas, otros alginatos, otras celulosas, gomas, y mezclas de las mismas.

Los lubricantes que se pueden emplear en las composiciones farmacéuticas y en las formas de dosificación incluyen, pero no se limitan a, estearato cálcico, estearato de magnesio, aceite mineral, aceite mineral ligero,

glicerina, sorbitol, manitol, polietilenglicol, otros glicoles, ácido esteárico, laurilsulfato sódico, talco, aceite vegetal hidrogenado (por ejemplo, aceite de cacahuete, aceite de algodón, aceite de girasol, aceite de sésamo, aceite de oliva, aceite de maíz, y aceite de soja), estearato de zinc, oleato de etilo, laureato de etilo, agar, y mezclas de los mismos. Lubricantes adicionales incluyen, por ejemplo, un gel de sílice syloid (AEROSIL200, fabricado por W.R. Grace Co. de Baltimore, MD), un aerosol coagulado de sílice sintético (comercializado por Degussa Co. de Plano, TX), CAB-O-SIL (un producto de dióxido de silicón pirogénico vendido por Cabot Co. de Boston, MA), y mezclas de los mismos. Si acaso se emplean, los lubricantes se pueden usar en una cantidad de menos de aproximadamente 1 por ciento en peso de las composiciones farmacéuticas o formas de dosificación en las que se incorporan.

En una realización, una forma de dosificación sólida comprende un compuesto que se proporciona en la presente memoria, lactosa anhidra, celulosa microcristalina, polivinilpirrolidona, ácido esteárico, sílice anhidro coloidal, y gelatina.

Formas de Dosificación de Liberación Controlada

Ingredientes activos tales como los compuestos que se proporcionan en la presente memoria se pueden administrar mediante medios de liberación controlada o mediante dispositivos de reparto que son bien conocidos por los expertos en la técnica. Ejemplos incluyen, pero no se limitan a, los descritos en las Patentes U.S. Nos: 3.845.770; 3.916.899; 3.536.809; 3.598.123; y 4.008.719; 5.674.533; 5.059.595; 5.591.767; 5.120.548; 5.073.543; 5.639.476; 5.354.556; 5.639.480; 5.733.566; 5.739.108; 5.891.474; 5.922.356; 5.972.891; 5.980.945; 5.993.855; 6.045.830; 6.087.324; 6.113.943; 6.197.350; 6.248.363; 6.264.970; 6.267.981; 6.376.461; 6.419.961; 6.589.548; 6.613.358; 6.699.500, cada una de las cuales se incorpora en la presente memoria por referencia. Tales formas de dosificación se pueden emplear para proporcionar una liberación lenta o controlada de uno o más ingredientes activos empleando, por ejemplo, hidroxipropilmetilcelulosa, otras matrices poliméricas, geles, membranas permeables, sistemas osmóticos, recubrimientos multicapa, micropartículas, liposomas, microesferas, o una combinación de los mismos para proporcionar el perfil de liberación deseado en proporciones variables. Las formulaciones de liberación controlada adecuadas son conocidas por los expertos en la técnica, incluyendo las descritas en la presente memoria, pueden seleccionarse fácilmente para usarse con los ingredientes activos que se proporcionan en la presente memoria. Por tanto, las composiciones que se proporcionan comprenden formas de dosificación unitarias adecuadas para administración oral tal como, pero no se limita a, comprimidos, cápsulas, cápsulas de gel, y pastillas que se adaptan para la liberación controlada.

Todos los productos farmacéuticos de liberación controlada tienen el objetivo común de mejorar la terapia farmacológica sobre el que se logra mediante sus equivalentes no controlados. Idealmente, el empleo de una preparación de liberación controlada diseñada de forma óptima en el tratamiento médico, se caracteriza con un mínimo de sustancia farmacológica que se está empleando para curar o controlar la afección en un mínimo periodo de tiempo. Las ventajas de las formulaciones de liberación controlada incluyen la actividad prolongada del fármaco, una frecuencia de dosificación reducida, y un incremento del cumplimiento del sujeto. Además, las formulaciones de liberación controlada se pueden emplear para modificar el tiempo de inicio de la acción u otras características, tales como los niveles sanguíneos del fármaco, y pueden por tanto modificar la aparición de efectos secundarios (por ejemplo, adversos).

Muchas formulaciones de liberación controlada se diseñan para liberar inicialmente una cantidad de fármaco (ingrediente activo) que produce de inmediato el efecto terapéutico deseado, y libera gradual y continuamente otras cantidades de fármaco para mantener este nivel del efecto terapéutico o profiláctico a lo largo de un periodo de tiempo prolongado. Para mantener este nivel constante del fármaco en el cuerpo, el fármaco se tiene que liberar desde la forma de dosificación en una tasa que reemplazará la cantidad del fármaco que se está metabolizando y excretando por el cuerpo. La liberación controlada de un ingrediente activo se puede estimular mediante varias condiciones que incluyen, pero no se limitan a, el pH, temperatura, enzimas, agua, u otras condiciones fisiológicas o compuestos.

En determinadas realizaciones, el fármaco se puede administrar empleando infusión intravenosa, una bomba osmótica implantable, un parche transdérmico, liposomas, u otros modos de administración. En una realización, se puede emplear una bomba (véase, Sefton, *CRC Crit. Ref. Biomed. Eng.* 14:201 (1987); Buchwald *et al.*, *Surgery* 88:507 (1980); Saudek *et al.*, *N. Engl. J. Med.* 321:574 (1989)). En otra realización, se pueden emplear materiales poliméricos. En otra realización, el sistema de liberación controlada se puede reemplazar en un sujeto en un lugar adecuado determinado por un experto en la técnica, es decir, se requiere por tanto únicamente una fracción de la dosis sistémica (véase, *por ejemplo*, Goodson, *Medical Applications of Controlled Release*, vol. 2, pp. 115-138 (1984)). Otros sistemas de liberación controlada se discuten en la revisión de Langer (*Science* 249:1527-1533 (1990)). El ingrediente activo se puede dispersar en una matriz interna sólida, por ejemplo, polimetilmetacrilato, polibutylmetacrilato, cloruro de polivinilo plastificado o no plastificado, nylon plastificado, tereftalato de polietileno, caucho natural, poliisopreno, poliisobutileno, polibutadieno, polietileno, copolímeros de etileno y acetato de vinilo, cauchos de silicona, polidimetilsiloxanos, copolímeros de carbonato de silicona, polímeros hidrofílicos tales como hidrogeles de ésteres de ácido acrílico y metacrílico, colágeno, polivinilalcohol reticulado y acetato de polivinilo hidrolizado parcialmente reticulado, que está rodeado por una membrana polimérica, por ejemplo, polietileno, polipropileno, copolímeros de etileno/propileno, copolímeros de etileno/acrilato de etilo, copolímeros de etileno/acetato de vinilo, cauchos de silicona, polidimetilsiloxanos, caucho de neopreno, polietileno clorado,

5 policloruro de vinilo, copolímeros de cloruro de vinilo con acetato de vinilo, cloruro de vinilideno, etileno y propileno, tereftalato de polietileno ionómero, gomas de butilo, cauchos de epiclorihidrina, copolímero de etileno/alcohol vinílico, terpolímero de etileno/acetato de vinilo/alcohol vinílico, y copolímero de etileno/viniloxietanol, que es insoluble en los fluidos corporales. El ingrediente activo difunde después a través de la membrana polimérica externa en una etapa que controla la tasa de liberación. El porcentaje del ingrediente activo en tales composiciones parenterales es altamente dependiente de la naturaleza específica de los mismos, así como de las necesidades del sujeto.

Formas de Dosificación Parenteral

10 Las formas de dosificación parenteral se pueden administrar a los pacientes mediante varias vías que incluyen, pero no se limitan a, la subcutánea, intravenosa (incluyendo la inyección en bolo), intramuscular, e intra-arterial. En algunas realizaciones, la administración de una forma de dosificación parenteral evita las defensas naturales del paciente frente a los contaminantes, y por tanto, en estas realizaciones, las formas de dosificación parenterales son estériles o capaces de ser estériles antes de la administración a un paciente. Ejemplos de formas de dosificación parenteral incluyen, pero no se limitan a, disoluciones listas para inyección, productos secos listos para disolverse o suspenderse en un vehículo aceptable farmacéuticamente para inyección, suspensiones listas para inyección, y emulsiones.

15 Los vehículos adecuados que se pueden emplear para proporcionar formas de dosificación parenteral son bien conocidos por los expertos en la técnica. Ejemplos incluyen, pero no se limitan a: agua para Inyección USP; vehículos acuosos tales como, pero no limitados a, Cloruro de Sodio para Inyección, Inyección de Ringer, Inyección de Dextrosa, Inyección de Dextrosa y Cloruro de Sodio, e Inyección de Ringer Lactato; vehículos miscibles en agua tales como, pero no limitados a, alcohol de etilo, polietilenglicol, y polipropilenglicol; y vehículos no acuosos tales como, pero no limitados a, aceite de maíz, aceite de algodón, aceite de cacahuete, aceite de sésamo, oleato de etilo, miristato de isopropilo, y benzoato de bencilo.

20 Los compuestos que incrementan la solubilidad de uno o más de los ingredientes activos descritos en la presente memoria, se pueden incorporar también en las formas de dosificación parenterales. Por ejemplo, la ciclodextrina y sus derivados se pueden emplear para incrementar la solubilidad de un compuesto proporcionado en la presente memoria. Véase, *por ejemplo*, la Patente U.S. N° 5.134.127, la cual se incorpora en la presente memoria por referencia.

Formas de Dosificación Tópicas y por Mucosas

30 Las formas de dosificación tópicas y a través de las mucosas que se proporcionan en la presente memoria incluyen, pero no se limitan a, pulverizadores, aerosoles, disoluciones, emulsiones, suspensiones, gotas oculares u otras preparaciones oftálmicas, u otras formas conocidas por un experto en la técnica. Véase, *por ejemplo*, *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 16ª, 18ª y 20ª eds., Mack Publishing, Easton PA (1980, 1990 y 2000); e *Introduction to Pharmaceutical Dosage Forms*, 4ª ed., Lea & Febiger, Filadelfia (1985). Las formas de dosificación adecuadas para tratar los tejidos de las mucosas dentro de la cavidad oral se pueden formular como enjuagues o como geles orales.

35 Los excipientes adecuados (*por ejemplo*, vehículos y diluyentes) y otros materiales que se pueden emplear para proporcionar formas de dosificación para las mucosas que se engloban en la presente memoria, son bien conocidos por los expertos en las técnicas farmacéuticas, y dependen del tejido en particular al que se aplicará una composición farmacéutica o forma de dosificación. En una realización, los excipientes incluyen, pero no se limitan a, agua, acetona, etanol, etilenglicol, propilenglicol, butano-1,3-diol, miristato de isopropilo, palmitato de isopropilo, aceite mineral, y mezclas de los mismos, para formar disoluciones, emulsiones o geles, que sean aceptables farmacéuticamente y no sean tóxicas. También se pueden añadir hidratantes o humectantes a las composiciones farmacéuticas y formas de dosificación. Ejemplos de ingredientes adicionales son bien conocidos en la técnica. Véase, *por ejemplo*, *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 16ª, 18ª y 20ª eds., Mack Publishing, Easton PA (1980, 1990 y 2000).

40 El pH de una composición farmacéutica o forma de dosificación se puede ajustar para mejorar el reparto de uno o más ingredientes activos. También se puede ajustar para mejorar el reparto, la polaridad de un vehículo disolvente, su fuerza iónica, o tonicidad. También se pueden añadir compuestos tales como estearatos a las composiciones farmacéuticas o formas de dosificación, para alterar la hidrofilia o lipofilia de uno o más ingredientes activos para mejorar el reparto. En otras realizaciones, los estearatos pueden servir como un vehículo lipídico para la formulación, como un agente emulsionante o tensioactivo, o como un agente que mejora el reparto o que mejora la penetración. En otras realizaciones, se pueden emplear sales, solvatos, hidratos, profármacos, clatratos, o estereoisómeros de los ingredientes activos para ajustar además las propiedades de la composición resultante.

Kits

55 En una realización, los ingredientes activos que se proporcionan en la presente memoria no se administran a un paciente al mismo tiempo o mediante la misma ruta de administración. En otra realización, se proporcionan kits que pueden simplificar la administración de cantidades apropiadas de los ingredientes activos.

En una realización, un kit comprende una forma de dosificación de un compuesto que se proporciona en la presente memoria. Los kits pueden comprender además ingredientes activos adicionales, tales como compuestos anti-inflamatorios, inmunomoduladores o inmunosupresores, o una combinación de los mismos. Ejemplos de ingredientes activos adicionales incluyen, pero no se limitan a, los descritos en la presente memoria.

- 5 En otra realización, los kits pueden comprender además dispositivos que se emplean para administrar los ingredientes activos. Ejemplos de tales dispositivos incluyen, pero no se limitan a, jeringas, bolsas por goteo, parches, e inhaladores.

- 10 Los kits pueden comprender además células o sangre para trasplante, así como vehículos aceptables farmacéuticamente que se pueden emplear para administrar uno o más ingredientes activos. Por ejemplo, si se proporciona un ingrediente activo en una forma sólida que se tenga que reconstituir para la administración parenteral, el kit puede comprender un envase cerrado de un vehículo adecuado en el que el ingrediente activo se puede disolver para formar una disolución estéril libre de partículas que es adecuada para la administración parenteral. Ejemplos de vehículos aceptables farmacéuticamente incluyen, pero no se limitan a: Agua para Inyección USP; vehículos acuosos tales como, pero no limitados a, Cloruro de Sodio para Inyección, Inyección de Ringer, Inyección de Dextrosa, Inyección de Dextrosa y Cloruro de Sodio, e Inyección de Ringer Lactato; vehículos miscibles en agua tales como, pero no limitados a, alcohol de etilo, polietilenglicol, y polipropilenglicol; y vehículos no acuosos tales como, pero no limitados a, aceite de maíz, aceite de algodón, aceite de cacahuete, aceite de sésamo, oleato de etilo, miristato de isopropilo, y benzoato de bencilo.
- 15

EJEMPLOS

- 20 Los siguientes ejemplos se presentan a modo de ilustración, no como limitación.

Ejemplo 1: Efecto del compuesto de ensayo sobre la producción de citoquina y quimioquina en células T humanas estimuladas con CD3 anti-humana

- 25 Este ejemplo demuestra el efecto del 3-(5-amino-2-metil-4-oxoquinazolin-3(4*H*)-il)piperidina-2,6-diona (compuesto de ensayo) sobre la producción de citoquina y quimioquina en células T humanas estimuladas con CD3 anti-humana empleando Tecnología Luminex multiplex.

Se emplean las siguientes abreviaturas:

Abreviatura	Explicación o Definición
IL	Interleuquina
G-CSF	Factor de Estimulación de la Colonia de Granulocitos
GM-CSF	Factor de Estimulación de la Colonia de Granulocitos Macrófagos
IFN- γ	Interferón Gamma
TNF- α	Factor de Necrosis Tumoral Alfa
RANTES	Regulada por Activación, Expresada y Secretada por Células T Normales

En este estudio se emplearon los siguientes materiales:

Medio RPMI-1640 enriquecido con FBS 10%, penicilina 100 unidades/mL, estreptomina 100 mg/mL y L-glutamina 2 mM (Life Technologies)

- 30 Cóctel Enriquecido con Células T Humanas RosetteSep® (StemCell, Cat# 15061)

Kit Plex-12 de Citoquina/quimioquina Humana Luminex (Millipore, Cat# MPXHCYTO-60K-12)

Instrumento Luminex IS100 (Millipore)

Anticuerpo CD3 Anti-humano, clon OKT3 (eBioscience, Cat# 16-0037-85)

- 35 Los compuestos de ensayo se prepararon como disoluciones madre de 4mM en DMSO. Las células T se aislaron de la capa leucocitaria por selección negativa empleando el Cóctel Enriquecido con Células T Humanas RosetteSep® según los procedimientos del fabricante.

Los 96 pocillos se pre-cubrieron con 3 μ g/mL de anticuerpo CD3 anti-humano en 100 μ L 1X PBS durante 4 horas a 37°C. Las placas se lavaron 3 veces con Medio Completo RPMI-1640 antes del ensayo de células T. Las células T se incubaron a continuación en placas pre-cubiertas con anti-CD3 a una densidad de 2,5 x 10⁵ células/pocillo en 180

µL de Medio Completo RPMI-1640. Las células se trataron con 20 µL 10X de un compuesto de ensayo de titulación a 10, 1, 0,1, 0,01, 0,001, 0,0001, y 0,00001 µM por duplicado. Las concentraciones de DMSO finales fueron 0,25%. Las placas se incubaron durante 48 horas a 37°C, 5% CO₂.

- 5 Después de 48 horas, se recogieron los sobrenadantes y se ensayaron mediante ensayo de chip en perla (CBA) citométrico multiplex para las siguientes citoquinas/quimioquinas: IL-2, IL-3, IL-5, IL-10, IL-13, IL-15, IL-17A, GM-CSF, G-CSF, IFN-γ, TNF-α, y RANTES. Las placas CBA se analizaron en el instrumento Luminex IS100.

Los datos a partir de cada donador se representan gráficamente empleando el programa informático GraphPad Prism 5.0 y se expresó como media pg/mL ± SEM y % de DMSO control ± SEM.

- 10 El compuesto de ensayo demostró actividad inmunomoduladora en células T humanas primarias estimuladas con anti-CD3, alterando la producción de varias citoquinas y quimioquinas. Los niveles de referencia de las citoquinas y de las quimioquinas producidas mediante estimulación de células T humanas incubadas con el vehículo se presentan en la Tabla 1 de abajo.

Tabla 1: Niveles de referencia de citoquinas y quimioquinas

Citoquina/Quimioquina	Cantidad de Referencia Producida (pg/mL)
IL-2	31
IL-	38
IL-5	27
IL-10	449
IL-13	205
IL-17A	19
GM-CSF	132
IFN-γ	1271
TNF-α	411
RANTES	314

- 15 El compuesto de ensayo mejoró la producción de IL-2, IL-3, IL-5, IL-10, IL-13, GM-CSF, IFN-γ, RANTES, y TNF-α en células T humanas estimuladas. La mejora de la producción por el compuesto de ensayo fue mayormente dependiente de la concentración para la mayoría de las citoquinas y quimioquinas, excepto para IL-10 y IL-5. El compuesto de ensayo mejoró la producción de IL-10 a concentraciones bajas pero inhibió la mejora de la producción de IL-10 a concentraciones más altas. El compuesto de ensayo incrementó la producción de IL-5 3- y 4-veces a 0,01 y 0,1 µM, respectivamente, mostrando menos mejora tanto a concentraciones más bajas como más altas. En las FIGs 1 y 2, se proporciona el efecto del compuesto de ensayo en la producción de citoquina y quimioquina en células T humanas estimuladas con anti-CD3, expresado como cantidad absoluta producida y como porcentaje de las células control del vehículo, respectivamente. En la FIG.2 las líneas discontinuas indican el nivel equivalente a la producción de referencia doble (EC₂₀₀).

25 Ejemplo 2: Actividad anti-inflamatoria

La actividad anti-inflamatoria del 3-(5-amino-2-metil-4-oxoquinazolin-3(4H)-il)piperidina-2,6-diona (compuesto de ensayo) se estudió en células mononucleares de sangre periférica humana (hPBMC, de sus siglas en inglés). Se utilizó la Tecnología Luminex para determinar la concentración (mejora) inhibitoria, IC₅₀, para el compuesto durante la elaboración de perfiles de citoquinas/quimioquinas pro-inflamatorias e IL-10 (citoquina anti-inflamatoria) a partir de PBMCs de donantes humanos sanos estimulados con LPS.

- 30 Se emplearon las siguientes abreviaturas:

ES 2 659 205 T3

Abreviatura	Explicación o Definición
GM-CSF	Factor de Estimulación de la Colonia de Granulocitos Macrófagos
IL	Interleuquina
LPS	Lipopolisacárido
MCP-1	Proteína quimioatrayente de monocitos 1
MDC	Quimioquina derivada de macrófagos
MIP-1 α	Proteína inflamatoria de macrófagos 1-alfa
MIP-1 β	Proteína inflamatoria de macrófagos 1-beta
PBMC	Células mononucleares de sangre periférica humana
PPM	Modificador de la vía pleiotrópica
RANTES	Regulada por Activación, Expresada y Secretada por Células T Normales
TNF- α	Factor de Necrosis Tumoral-Alfa

Se obtuvieron 50 ml de una capa leucocitaria de donantes sanos a partir del Banco de Sangre de Nueva Jersey (East Orange, Nueva Jersey). Los liposacáridos (cepa) (Cat# L-1887) se adquirió de Sigma. Los Kits Milliplex con perlas de unión a anticuerpo para Tecnología xMAP Luminex, se adquirieron de Millipore (Billerica, Massachusetts) y se combinaron en un formato multiplex antes del ensayo.

5 Purificación de Células Mononucleares de Sangre Periférica Humana

50 ml de capa leucocitaria humana se repartieron en alícuotas de 25 ml cada una en dos tubos cónicos de 50 ml y se añadió 25 ml de HBSS estéril a cada tubo cónico. Los tubos se mezclaron suavemente por inversión. Se repartieron en alícuotas quince ml de Ficoll-Paque Plus a temperatura ambiente (GE Healthcare (localización); cat# 17-1440-02) en cuatro tubos cónicos de 50 ml. Después, 25 ml de la mezcla de la capa leucocitaria/HBSS se estratificó suave y lentamente en la superficie del Ficol. Las muestras se centrifugaron a 450 rpm durante 35 minutos. La capa superior que contiene plasma se pipeteó y se desechó. La superficie de contacto que contiene células mononucleares se transfirió a dos tubos cónicos de 50 ml. Los tubos cónicos se llenaron con HBSS hasta un volumen final de 50 ml y se centrifugaron a 1200 rpm durante 10 minutos. Las células se lavaron de nuevo en HBSS y se centrifugaron a 1000 rpm durante 10 minutos. Las células del sedimento se resuspendieron con 20 ml de medio RPMI completo (RPMI/5% suero humano/1x de penicilina/estreptomina/glutamina) y se contabilizaron.

Tratamiento de Células Mononucleares de Sangre Periférica Humana

Se añadió un millón de μ l (2x10⁶/ml) de hPBMCs a cada pocillo de una placa de fondo plano de 96 pocillos (recuento celular final=2x10⁵/pocillo) y se incubaron a 37°C durante 1 hora. Se añadieron veinte μ l (10x) del compuesto a cada pocillo de ensayo y veinte μ l de medio que contiene DMSO 2,5% a cada pocillo control ([DMSO]_{final}=0,25%) y la placa se incubó durante 1 hora a 37°C. Las células se estimularon después con 80 μ l de LPS 2,5 ng/ml ([LPS]_{final}=1 ng/ml) y se incubaron durante 18 horas a 37°C.

Se transfirieron 50 μ l de sobrenadante de cada pocillo a 3 placas de 96 pocillos de fondo redondo y se almacenaron a -20°C para análisis Luminex. Los pocillos se realizaron por duplicado para cada muestra.

Análisis Luminex

Se analizaron las muestras de sobrenadantes para las citoquinas en formato multiplex según las instrucciones del fabricante (Millipore, Billerica, Ma 01821) empleando un instrumento Luminex IS100. Los análisis de IL-12 y GM-CSF se realizaron en formato dúplex empleando sobrenadantes puros, mientras que para todas las citoquinas se realizaron en un formato multiplex empleando sobrenadantes diluidos 1:20. Los datos de los análisis se realizaron empleando un programa informático Upstate Beadview. Las IC₅₀ se calcularon empleando regresión no-lineal, dosis-respuesta sigmoidal, limitando la cota superior hasta 100% y la inferior a 0%, permitiendo una pendiente variable. Las EC₅₀ se basaron en el límite superior de las curvas sigmoidales iguales a 246,9%, que representan la mejora media de IL-10 producida por pomalidomida (control) a 10 μ M y el límite inferior hasta 100%. Las IC₅₀ se realizaron empleando el GraphPad Prism v5.00. Los valores de los datos representan la media + SEM (error estándar de la media) de n (número de experimentos por duplicado).

Como se demostró mediante los datos en la Tabla 2 de abajo y en la FIG.3, el compuesto de ensayo tiene potencias variables para las inhibiciones de las múltiples citoquinas examinadas, por ejemplo, IL-6, IL-8, IL-1 β , GM-CSF, MDC, MIP-1 α , MIP-1 β , y TNF- α , en general. Además, el compuesto de ensayo mejoró la producción de IL-10, MCP-1, y RANTES con varias potencias, como se proporcionan en la Tabla 3 y la FIG.4.

5 Tabla 2: Resumen del Perfil Inhibitorio de Citoquina del Compuesto de Ensayo

Citoquina	Compuesto de ensayo IC ₅₀ (μ M)
IL-6	0,060
IL-8	>10
IL-1 β	0,054
GM-CSF	0,95
MDC	0,062
MIP-1 α	0,30
MIP-1 β	>10
TNF- α	0,034

Tabla 3: Resumen del Perfil de Citoquina frente al % medio de control a 0,1 μ M

Citoquina	Compuesto de ensayo (% de control)
IL-10	480
MCP-1	236
RANTES	131

Ejemplo 3: Efecto en la función de las células asesinas (NK) humanas en respuesta a IgG/Rituximab

10 En este ejemplo se estudió la capacidad del compuesto de ensayo para mejorar la función de las células NK en respuesta a IgG/Rituximab. La actividad inmunomoduladora del compuesto de ensayo se comparó en dos ensayos de la función celular de las células asesinas naturales (NK) (1) IgG y IL-2 inducen la producción de interferón-gamma (IFN- γ) y (2) actividad letal, como medida en un modelo ADCC (citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo) *in vitro*.

15 Se emplean las siguientes abreviaturas

Abreviatura	Explicación o Definición
ABC-DLBCL	Célula B Activada similar al Linfoma Difuso de Células B grandes
ADCC	Citotoxicidad Celular Dependiente de Anticuerpo
DMSO	Sulfóxido de dimetilo
IgG	Inmunoglobulina G
IFN- γ	Interferón-gamma
NK	Asesinas naturales
PPM	Modificador de la vía pleiotrópica

ES 2 659 205 T3

Abreviatura	Explicación o Definición
rhIL-2	Interleuquina-2 Recombinante Humana

Los materiales que se emplearon en el estudio y sus fuentes se proporcionan a continuación:

Capa leucocitaria de voluntarios sanos (Banco de Sangre de Nueva Jersey)

Ficoll-Hypaque Plus (Fisher Scientific Co LLC, PA, Cat # 17144002)

Medio RPMI-1640 enriquecido con 10% de FBS (suero fetal bovino), 100 unidades/mL de penicilina,

5 100 mg/mL de estreptomina, y L-glutamina 2 mM (Invitrogen, Cat # 21870-076)

Medio RPMI-1640 (sin rojo de fenol) enriquecido con FBS 10%, 100 unidades/mL de penicilina,

100 mg/mL de estreptomina, y L-glutamina 2 mM (Invitrogen, Cat # 11835-030)

Rituximab (Rituxan, Roche, Inc.) (Cat N° DIN 02241927, Lot N° B50177)

Suero AB+ humano (Gemini Bio Products, CA, Cat # 100-512)

10 Kit de ensayo de Citotoxicidad No-Radiactiva CytoTox 96 (Promega, WI, Cat # G1780)

Cóctel de Enriquecimiento de Células NK Humanas RosetteSep (Stem Cell Technologies, Vancouver, BC, Cat# 15065)

CD56+ anti-humano de ratón conjugado con APC (BD Biosciences, CA, Cat # 555518)

Inmunoglobulina G humana a partir de suero (IgG) (Sigma, St. Louis, MO; Cat # I2511-10MG)

15 IL-2 Recombinante Humana (R&D Systems, MN, Cat # 202-IL-050/CF)

Kit ELISA IFN-gamma Humana (ThermoFisher, Cat # PIEHIFNG5)

Se emplearon las siguientes líneas celulares:

Célula B Activada similar al Linfoma Difuso de Células B grandes (ABC-DLBCL): células Riva (NCI, MD)

20 Célula B centrogerminal similar al Linfoma Difuso de Células B grandes (GCB-DLBCL): WSU-DLCL2 (Celgene Signal, CA)

Farage (ATCC, VA)

Linfoma folicular: DoHH2 (DSMZ, Alemania)

Linfoma de Burkitt (BL): Raji (ATCC, VA).

25 Las células NK se aislaron a partir de la capa leucocitaria de sangre de donantes sanos mediante selección negativa empleando Cóctel de Enriquecimiento de Células NK Humanas RosetteSep (Stem Cell Technologies, Vancouver, BC) previo a la centrifugación por gradiente de densidad para Ficoll-Hypaque (Fisher Scientific Co LLC, PA) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las células CD56+ NK se aislaron hasta una pureza ~85%, como se determinó mediante citometría de flujo (BD, Biosciences, CA).

Ensayo de Interferón-Gamma (IFN-Gamma) inducido por NK IgG

30 Se recubrieron placas de fondo plano de noventa y seis pocillos con IgG 100 µg/mL (Sigma) durante la noche a 4°C. Al día siguiente, la IgG no unida se lavó con 1X PBS frío. Las células NK se incubaron entonces en 96 pocillos recubiertos con IgG a 2 x 10⁵ células por pocillo en 180 µL de Medio RPMI-1640 y rhIL-2 10 ng/mL (R&D Systems, MN). El compuesto de ensayo se añadió en un volumen de 20 µL de DMSO. Las concentraciones finales del compuesto de ensayo fueron de 0,0001, 0,001, 0,01 0,1, 1, ó 10 µM. Las concentraciones finales de DMSO fueron del 0,25%. Después de 48 horas, se recogieron los sobrenadantes y se analizaron mediante ELISA para la producción de IFN-γ.

40 Se analizaron para cada donante los datos empleados para determinar la capacidad del compuesto de ensayo para mejorar la producción de IFN-γ de células NK en respuesta de la estimulación de IgG y rhIL-2 inmovilizados empleando el programa informático GraphPad Prism v5.0. Los datos se presentan de dos maneras, (1) como la cantidad absoluta si se produce IFN-γ (pg/mL ± SEM) y (2) como el porcentaje de la cantidad de IFN-γ producida en presencia de pomalidomina 1 µM. EC₅₀ es la concentración del compuesto de ensayo que proporciona la producción media máxima de IFN-γ, con una producción máxima definida como la cantidad de IFN-γ producida en presencia de pomalidomina 1 µM. Los valores EC₅₀ se calcularon empleando regresión no-lineal, dosis-respuesta sigmoidal,

limitando la cota superior hasta 100% y la inferior a 0%, permitiendo una pendiente variable. EC₅₀ para el compuesto de ensayo fue de 0,0015 µM.

5 El compuesto de ensayo mejoró la producción de IFN-γ de células NK de una manera dependiente de la dosis en respuesta a la estimulación de IgG y IL-2 inmovilizadas. En la FIG.5 se proporcionan los resultados (expresados como pg/mL de la IFN-γ producida), respectivamente. La FIG.6 proporciona los resultados expresados como un porcentaje del incremento del IFN-γ producido relativo al IFN-γ producido en presencia de pomalidomida a 1 µM para el compuesto de ensayo. Cada valor trazado en las FIGs 5 y 6 representan la media de 12-14 determinaciones ± SEM.

Ensayo ADCC

10 Las células NK (5 x 10⁴) purificadas se sembraron en placas con fondo en U de 96 pocillos en 100 µL de medio RPMI-1640 sin fenol (invitrogen) + suero AB+ humano 2% (Gemini Bio Products, CA) y se trataron con 10 ng/mL de rhIL-2 y rituximab (5 µg/mL) más diferentes concentraciones del compuesto de ensayo de 0,01 hasta 10 µM durante 48 horas.

15 Se trataron varias líneas celulares de linfoma (GCB-DLBCL: WSU-DLCL2 y Farage; Linfoma folicular: DoHH2; ABC-DLBCL: Riva; linfoma de Burkitt [BL]: Raji) con 5 µg/mL de rituximab durante 30 minutos a 37°C. El rituximab sin unir se lavó, se añadieron las células diana (5 x 10³/100 µL/pocillo) a las células efectoras pretratadas (Células NK) en una proporción de 10:1, y las dos se co-incubaron durante 4 horas a 37°C. Las condiciones de control consistían de células NK más células tumorales tratadas con (1) sólo medio, (2) sólo rituximab, o (3) sólo IL-2. Se analizó la citotoxicidad de las células NK frente a las células tumorales empleando una alícuota de sobrenadante (50 µL) utilizando un ensayo de liberación de lactato deshidrogenasa (LDH) estándar para medir la ADCC (Ensayo de Citotoxicidad No-Radiactiva CytoTox 96, Promega, WI). La liberación espontánea de las células diana en solitario fue <15% de la liberación máxima, como se determinó con las células diana lisadas en Triton X-100 1%. La liberación experimental se corrigió mediante la resta de la liberación espontánea de las células efectoras en la dilución correspondiente. Se calculó el porcentaje de lisis específica según la fórmula:

25 Porcentaje de lisis específica = 100 x (experimental - efector espontáneo - diana espontánea) / (diana máxima - diana espontánea).

30 El compuesto de ensayo indujo el ADCC mediado por células NK de manera dependiente de la dosis en todas las líneas celulares. Se realizaron tres experimentos para cada línea celular y se ensayaron muestras de cada uno de los tres donantes en cada experimento. Los datos se representan en la FIG.8, como media de las 9 determinaciones ± SEM.

Ejemplo 4: Efecto de la expresión de los factores de transcripción en el modelo de diferenciación de células B humanas primarias

35 En este ejemplo, se ensaya el efecto del 3-(5-amino-2-metil-4-oxoquinazolin-3(4*H*)-il)piperidina-2,6-diona (compuesto de ensayo) en la expresión de factores de transcripción que controlan la diferenciación de células plasmáticas, y producción de inmunoglobulina, empleando un sistema de cultivo *in vitro* de diferenciación de células B humanas.

En este ejemplo se emplearon las siguientes abreviaturas:

Abreviatura o Término Especialista	Explicación o Definición
BCL6	Proteína 6 del linfoma de células B
BLIMP-1	Linfocito B inducido por maduración de Proteína 1
EtOH	Etanol
FBS	Suero Fetal Bovino
DMSO	Sulfóxido de dimetilo
IRF-4	Factor Regulador del Interferón 4
MFI	Intensidad de fluorescencia media
PAX5	Proteína de caja apareada Pax-5

ES 2 659 205 T3

Abreviatura o Término Especialista	Explicación o Definición
SLE	Lupus eritematoso sistémico
XBP-1	Proteína 1 de unión a la caja X

Se obtuvieron 50 ml de capa leucocitaria a partir de donantes sanos del Banco de Sangre de Nueva Jersey. Se obtuvieron muestras PBMC de lupus SLE de Conversant Bio (Huntsville, Alabama 35806).

En este estudio se emplearon los siguientes reactivos de cultivos celulares.

Artículo	Fuente
Medio Dulbecco Modificado de Iscove	Invitrogen
Suero Fetal Bovino	Lonza
Insulina Humana	Sigma
Transferrina Humana	Sigma
penicilina/estreptomicina	Lonza
IL-2 Humana Recombinante	R & D Systems
IL-6 Humana Recombinante	R & D Systems
IL-10 Humana Recombinante	R & D Systems
IL-15 Humana Recombinante	R & D Systems
Ligando CD40/TNFSF5/histidina-diana	R & D Systems
Polihistidina de ratón anticuerpo IgG1	R & D Systems
ODN 2006-ligando TLR9 Humano	Invivogen
Interferón Humano ALFA A	Fuente de interferón PB

5

Lo siguiente se empleó en el análisis citométrico

Artículo	Fuente
FITC CD19 anti-humano	IBD Pharmigen
FITC CD20 anti-humano	IBD Pharmigen
CD27 PE anti-humano	IBD Pharmigen
CD38 PE anti-humano	IBD Pharmigen
CD38 APC anti-humano	IBD Pharmigen
FITC Isotipo IgG1k anti-ratón	IBD Pharmigen
PE Isotipo IgG1k anti-ratón	IBD Pharmigen
FITC Isotipo IgG2bk anti-ratón	IBD Pharmigen

ES 2 659 205 T3

Artículo	Fuente
APC Isotipo IgG1k anti-ratón	IBD Pharmigen
Tampón de tinción	IBD Pharmigen

Se emplearon los siguientes cebadores genéticos para el RT-PCR:

Artículo	Fuente
Ensayo de expresión génica AICDA	Applied Biosystem
Ensayo de expresión génica BCL6	Applied Biosystem
Ensayo de expresión génica GAPDH	Applied Biosystem
Ensayo de expresión génica IGJ	Applied Biosystem
Ensayo de expresión génica IRF4	Applied Biosystem
Ensayo de expresión génica PAX5	Applied Biosystem
Ensayo de expresión génica PRDM1	Applied Biosystem
Ensayo de expresión génica XBP1	Applied Biosystem
Kit de Transcripción Inversa	Applied Biosystem
Mix Master	Applied Biosystem

Purificación de hPBMCs

- 5 Cincuenta ml de capa leucocitaria humana se repartieron en alícuotas de 25 ml cada una en dos tubos cónicos de 50 ml y se añadió 25 ml de HBSS estéril a cada tubo cónico. Los tubos se mezclaron suavemente por inversión. Se repartieron en alícuotas quince ml de Ficoll-Paque Plus a temperatura ambiente (GE Healthcare; cat# 17-1440-02) en cuatro tubos cónicos de 50 ml. Después 25 ml de la mezcla de capa leucocitaria/HBSS se estratificó suave y lentamente en la superficie del Ficol. Las muestras se centrifugaron a 450 rpm durante 35 minutos. La capa superior que contiene plasma se pipeteó y se desechó. La superficie de contacto que contiene células mononucleares se transfirió a tubos cónicos de 50 ml. Los tubos cónicos se llenaron con HBSS hasta un volumen final de 50 ml y se centrifugaron a 1200 rpm durante 10 minutos. Las células se lavaron de nuevo en HBSS y se centrifugaron a 1000 rpm durante 10 minutos. Las células del sedimento se resuspendieron con 20 ml de medio de células B (Iscoves+PFBS 10%, P/S 1%, y 5 µg/mL de insulina humana) y se contabilizaron en el contador celular.

15 Enriquecimiento de Células B con CD19+

- Las PBMCs purificadas se contabilizaron y se repartieron en alícuotas a 2×10^8 células por tubo. Las células se centrifugaron a 1200 rpm durante 5 minutos y después se desecharon los sobrenadantes. Las células se resuspendieron en 4 mL de Tampón Robosep (catálogo Stemcell Technologies #20104) y se transfirieron a un tubo de poliestireno de fondo redondo de 14 mL (catálogo BD # 352057) y se mezclaron bien. A continuación se añadieron 200 µL de un cóctel de enriquecimiento de células B Humanas EasySep (catálogo StemCell Technologies # 19054). Las muestras se agitaron e incubaron a temperatura ambiente durante 10 minutos. A continuación se añadieron a cada tubo 300 µL de partículas EasySep Magnetic (agitado) (catálogo StemCell Technologies # 19054). Las muestras se agitaron e incubaron a temperatura ambiente durante 5 minutos. Después de 5 minutos de incubación, se añadieron 5 mL de tampón Robosep al tubo y se mezcló bien mediante pipeteado arriba y abajo. El tubo se colocó inmediatamente en el imán magnético (catálogo StemCell Technologies # 19054) y se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos. Después de la incubación, en un movimiento continuo, se invirtió el imán y el tubo, y se recogió la fracción deseada en un tubo cónico de 50 mL. Estos procedimientos se repitieron y

combinaron para el resto de las PBMCs (por un donante). La fracción combinada se centrifugó a 1200 rpm durante 5 minutos y a continuación se desecharon los sobrenadantes y las células se resuspendieron en 5 mL de medio de células B. Las células CD19+ aisladas se contabilizaron en el contador celular.

Ensayo de Diferenciación de Células B

- 5 Etapa 1- Activación de Células B- del día 0 al día 4: Preparar el cóctel de células B en fresco mediante adición de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de transferrina humana al medio de Células B. (Iscoves+PFBS 10%, P/S 1%, y 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de insulina humana). El volumen de medio necesario para el experimento requería de un filtro de 0,22 μm . Añadir el cóctel de diferenciación de células B (concentración final): IL-2 recombinante humana (20U/mL), IL-10 (50 ng/mL), IL-15 (10 ng/mL), Ligando CD40/TNFSF5/histidina-diana (50 ng/mL), Polihistidina de ratón anticuerpo IgG1 (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$), y ODN 2006-ligandoTLR9 Humano (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) para células. Se añadieron a cada pocillo de una placa de fondo plano con 6 pocillos cinco mililitros (1x10⁵/mL) de células B CD19+ (recuento celular final=5x10⁵/pocillo). Se añadieron cinco μL (1x) \pm de compuesto/DMSO a cada pocillo de ensayo (DMSO final 0,1%) y se incubaron a 37°C durante 4 días.

- 15 Etapa 2-Generación de plasmoblastos- del día 4 al día 7: Las células se recogieron y contaron en el contador celular; se eliminó una alícuota para análisis de flujo, las células restantes se lavaron con PBS. Preparar el cóctel de células B mediante adición de 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de transferrina humana al medio de células B. (Iscoves+PFBS 10%, P/S 1%, y 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de insulina humana). El volumen de medio necesario para el experimento requería de un filtro de 0,22 μm . Añadir el cóctel de diferenciación de células B (concentración final): IL-2 recombinante humana (20U/mL), IL-10 (50 ng/mL), IL-15 (10 ng/mL), IL-6 (50 ng/mL) a las células. Añadir el cóctel de células B y transferir las células a los pocillos originales y enrasar a un volumen de hasta 5 mL. Se añadieron cinco μL (1x) \pm de compuesto/DMSO a cada pocillo de ensayo (DMSO final 0,1%) y se incubaron a 37°C durante 4 días.

- 20 El día 7, las células se recogieron y se contaron en el contador celular. Las células se dividieron después para análisis de flujo y las células restantes se lisaron con tampón RLT y se almacenaron a -80°C para extracción de ARN y expresión genética. Los sobrenadantes se repartieron en alícuotas y se congelaron a -20°C para análisis de inmunoglobulina.

- 25 Preparación de las Existencias de Disoluciones y Diluciones del Compuesto de Ensayo

Los compuestos de ensayo se pesaron y disolvieron en DMSO 100% estéril (sulfóxido de dimetilo; Research Organics, Cleveland, OH) para crear unas existencias de la disolución de 40 mM. Las existencias de las disoluciones 40 mM se utilizaron en el ensayo para obtener concentraciones del compuesto de ensayo final en base al diseño experimental.

- 30 Extracción de ARN y Expresión Genética

- 35 Se recogieron las células B diferenciadas (véase la sección 4.3.3) para una preparación total de ácido ribonucleico (ARN) con un instrumento de extracción de ARN Qiacube (Qiagen, Valencia, CA) utilizando columnas mini spin QIAGEN RNeasy. El ARN purificado se reservó transcrito en un ADNc con un termociclador [MJ Research; Inc., St. Bruno, Quebec, Canadá] empleando un kit de transcripción inversa (Applied Biosystems). El ensayo de expresión genética se llevó a cabo empleando un sistema RT-PCR 7500 (Applied Biosystems) por triplicado. Se hizo correr para cada muestra un control de ensayo de la expresión genética de gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa y se empleó como un control de normalización. Para cada gen, las muestras de cada experimento se normalizaron para el tratamiento con DMSO 0,1% sólo para ese punto de tiempo particular.

- 40 Se recogieron y analizaron los sobrenadantes (a partir de la sección 8.4.3) mediante ELISA para la producción de IgG y IgM (ZeptoMetrix Corp. Buffalo, NY).

Fenotipado de células

- 45 Las células B diferenciadas (véase sección 4.3.3) se recogieron, contaron, y se repartieron en alícuotas de aproximadamente 1x10⁶ células o menos por tubo de 4 mL. Las células se lavaron con tampón de tinción 1X. A continuación, las células se bloquearon con suero humano 10%/PBS durante 20-30 minutos. Tras el bloqueo, las células se centrifugaron durante 5 minutos a 1200 rpm y se desecharon los sobrenadantes. En los 100 μL de tampón restante, se añadieron 20 μL de varios anticuerpos BD Pharmingen flow según el diseño experimental. Las células se tiñeron durante 20-30 minutos a 4°C. A continuación las células se lavaron 2X con tampón de tinción y se desecharon los sobrenadantes. A continuación, se añadieron 500 μL de tampón de tinción o de PBS a los tubos. Las muestras se analizaron inmediatamente o se dejaron a 4°C durante la noche. Las células se tiñeron con CD20 y 50 CD38, CD19 y CD27 anti-humano de ratón, o con los respectivos controles de isótopos. Todas las muestras se analizaron empleando un citómetro de flujo FACSCanto, el programa informático de análisis FACSDiva (BD Biosciences), y el programa informático de Análisis FlowJo.

Análisis de la viabilidad celular

Para determinar el recuento de células vivas, las células B (véase sección 4.3.3) se tiñeron con azul de tripano 0,4% y las células se contaron empleando el contador celular Countess automatizado (Invitrogen) en muestras por duplicado.

5 Los datos se representaron en gráficas empleando el programa informático GraphPad Prism 5.0. Los valores IC₅₀ se calcularon empleando regresión no-lineal, dosis-respuesta sigmoideal, limitando la cota superior hasta 100% y la inferior a 0% para una pendiente variable. Los resultados para los compuestos de ensayo en los ensayos de Ig se expresaron como el porcentaje de inhibición relativo a los valores de DMSO control.

La potencia para la inhibición de la producción de PBMC normal y de SLE de IgG y IgM para el compuesto de ensayo es como sigue:

IgG IC ₅₀ (nM)		IgM IC ₅₀ (nM)	
SLE (n=3)	Normal (n=3)	SLE (n=3)	Normal (n=3)
46	61	30	23

10

Ejemplo 5: Efectos en la prevención y el tratamiento de la fibrosis cutánea inducida por bleomicina

En este ejemplo, se estudiaron los efectos del 3-(5-amino-2-metil-4-oxoquinazolin-3(4*H*)-il)piperidina-2,6-diona (compuesto de ensayo) en la progresión de la fibrosis experimental y en la regresión de la fibrosis establecida en un modelo de ratón de fibrosis cutánea inducida por bleomicina.

15 En este ejemplo se emplearon las siguientes abreviaturas:

Abreviatura o Término Específico	Explicación o Definición
ANOVA	Análisis de Varianza
α-SMA	Actina Alfa de Músculo Liso
CMC	Carboximetilcelulosa
ECM	Matriz Extracelular
NaCl	Cloruro sódico
PO	Oralmente
QD	Dosis una vez al día
SSc	Esclerosis Sistémica

En este estudio se utilizaron ratones DBA/2. Se utilizaron ocho animales por grupo de tratamiento en este estudio.

Los ratones se mantuvieron en la jaula bajo condiciones de comida y agua a voluntad.

20 El vehículo, carboximetilcelulosa (CMC) 0,5%/Tween 80 0,25%, se preparó en agua destilada y se disolvió durante la noche en un agitador magnético (añadir 0,5g CMC; Sigma #C9481) y 0,25 ml de Tween 80 (Sigma #P8074) hasta 99,75 ml para hacer un total de 100 ml de CMC 0,5%/Tween 80 0,25%).

25 El compuesto de ensayo en polvo se pesó y se suspendió fresco a diario en el vehículo CMC 0,5%/Tween 80 0,25%, para permitir la hidrólisis del fármaco en el medio acuoso. El compuesto se suspendió, no se disolvió, en este vehículo. La formulación se homogeneizó con un mortero de teflón (tritador tisular Potter-Elvehjem) empleando un homogeneizador tisular Eberbach motorizado. La concentración de fármaco utilizado a diario en estos estudios fue de 3 mg/ml.

30 La bleomicina se obtuvo de la farmacia de la Universidad de Erlangen-Nuremberg y se preparó en fresco una vez a la semana. La fibrosis cutánea se indujo en la semana 6 de edad de los ratones DBA mediante inyecciones intracutáneas de 100 µl de bleomicina disuelta en NaCl 0,9%, a una concentración de 0,5 mg/ml, cada día en áreas definidas de 1,5 cm² en la parte superior de la espalda.

Diseño del estudio

El modelo de ratón de fibrosis cutánea inducida por bleomicina es muy utilizado para evaluar las terapias anti-fibróticas. En este modelo, se induce una fibrosis cutánea localizada, mediante inyecciones intracutáneas con bleomicina cada día durante 3 semanas. Este modelo se asemeja a las etapas inflamatorias tempranas de la SSc. Para evaluar los efectos potenciales en la prevención de la fibrosis, el tratamiento se inició simultáneamente con la primera inyección de bleomicina. Para estudiar el efecto del compuesto de ensayo en la prevención de la fibrosis cutánea inducida por bleomicina *in vivo*, los tratamientos se dividieron en los siguientes grupos:

- Grupo control: Inyección intradérmica de NaCl durante 3 semanas. El tratamiento consiste en la administración del vehículo (CMC 0,5%/Tween 80 0,25%).
- Grupo de bleomicina sin tratar: Inyección intradérmica de bleomicina durante tres semanas. Administración del vehículo (CMC 0,5%/Tween 80 0,25%).
- Grupo del compuesto de ensayo: Inyección intradérmica de bleomicina durante tres semanas. El compuesto de ensayo se administró a 30 mg/kg; PO, QD.
- Grupo control positivo: Inyección intradérmica de bleomicina durante tres semanas. Inyección de Imatinib (50 mg/kg; IP, QD). Se demostró previamente que el Imatinib mesilato ejerce potentes efectos anti-fibróticos en la fibrosis cutánea inducida por bleomicina. Véase Akhmetshina A. *et al.*, *Arthritis Rheum* 2009; 60(1):219-224.

Para evaluar la regresión de la fibrosis, se utilizó un modelo modificado de fibrosis cutánea inducida por bleomicina. Los ratones se pre-probaron con bleomicina para inducir una fibrosis cutánea fuerte. Un grupo recibió tratamiento con el compuesto de ensayo, mientras que la exposición a bleomicina se continuaron durante tres semanas más. El efecto de este grupo se comparó con el de los ratones expuestos a bleomicina durante seis semanas (prevención de otra progresión) y los ratones se expusieron a bleomicina durante tres semanas seguido de NaCl durante tres semanas más (inducción de la regresión). Los grupos siguientes se utilizaron para el estudio de regresión:

- Grupo control: Inyección intradérmica de NaCl durante seis semanas. El tratamiento control consistió en la administración del vehículo.
- Grupo 1 de bleomicina sin tratar (regresión): Inyección intradérmica de bleomicina durante tres semanas seguido de inyecciones intradérmicas de NaCl durante otras tres semanas. El tratamiento consistió en la administración del vehículo. El grupo 2 de bleomicina sin tratar (prevención de la progresión): Inyección intradérmica de bleomicina durante seis semanas. El tratamiento consistió en la administración del vehículo.
- Grupo del compuesto de ensayo: Inyección intradérmica de bleomicina durante seis semanas. El compuesto de ensayo se administró a 30 mg/kg; PO, QD.
- Grupo control positivo: Inyección intradérmica de bleomicina durante seis semanas. Inyección de Imatinib (50 mg/kg; IP, QD).

Procedimiento Experimental

El engrosamiento dérmico se determinó mediante tinción con hematoxilina y eosina y activación de fibroblastos mediante el ejemplo de inmunohistoquímica para actina alfa del músculo liso (α -SMA). El engrosamiento dérmico, como se determinó mediante la puntuación cutánea modificada de Rodnan, es normalmente el principal resultado más frecuente en ensayos clínicos humanos para los agentes anti-fibróticos en SSc. Las secciones de piel se tiñeron con hematoxilina/eosina para una mejor visualización de la estructura tisular. El engrosamiento dérmico se analizó con un microscopio Nikon Eclipse 80i (Nikon, Badhoevedorp, Países Bajos) mediante medición de la distancia máxima entre la unión epidérmica-dérmica y la unión dérmica-grasa subcutánea en 4 secciones de piel diferentes en cada ratón. La evaluación se realizó mediante 2 examinadores independientes.

Para la cuantificación de los miofibroblastos, las secciones de piel se sometieron a desparafinación y se incubaron con albúmina sérica bovina 5% durante 60 minutos. Se detectaron las células positivas para α -SMA mediante incubación con anticuerpos anti- α -SMA monoclonales (clon 1A4; Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania) durante 2 horas a temperatura ambiente seguido por incubación con peróxido de hidrógeno 3% durante 10 minutos. Se utilizaron como anticuerpos secundarios anticuerpos anti-conejo de cabra marcados con peroxidasa de rábano picante (Dako, Hamburg, Alemania). La expresión de α -SMA se visualizó con 3,3'-diaminobencidamida tetrahidrocloruro (Sigma-Aldrich). Se utilizaron como controles anticuerpos de IgG de ratón monoclonales (Calbiochem, San Diego, CA).

Además, se medirá la cantidad de colágeno en la lesión cutánea con el ensayo de colágeno SirCol; el RNA y el plasma de todos los ratones se recuperó para los demás análisis.

El compuesto de ensayo descendió significativamente el engrosamiento dérmico de la lesión cutánea en el modelo de ratón de fibrosis cutánea inducida por bleomicina. El compuesto de ensayo a 30 mg/kg; PO, QD previno significativamente el engrosamiento dérmico mediante aproximadamente $22 \pm 0,49\%$ ($p < 0,0001$).

5 En la FIG.8 se muestran microfotografías de las secciones de piel teñidas con hematoxilina y eosina. El engrosamiento dérmico se ensayó mediante la medición de la distancia máxima entre la unión epidérmica-dérmica y la unión dérmica-grasa subcutánea. La línea dibujada entre los puntos de unión muestra el engrosamiento relativo en los grupos de tratamiento.

10 Para determinar el efecto de los tratamientos en la activación de los fibroblastos, se contaron las α -SMA + miofibroblastos en las secciones de las lesiones cutáneas. El compuesto de ensayo a 30 mg/kg; PO, QD, redujo el número de miofibroblastos mediante $30 \pm 0,23\%$ ($p < 0,0001$).

Efecto en la regresión de la fibrosis cutánea inducida por bleomicina

15 También se confirmó en el modelo de bleomicina diseñado para investigar la regresión potencial de la fibrosis, los efectos inhibitorios del compuesto de ensayo en la progresión de la fibrosis. El compuesto de ensayo redujo el engrosamiento dérmico del engrosamiento dérmico inducido por bleomicina mediante $22 \pm 0,28\%$ ($p < 0,0001$). La FIG.9 muestra las microfotografías de las secciones de piel teñidas con hematoxilina y eosina. El engrosamiento dérmico se ensayó mediante la medición de la distancia máxima entre la unión epidérmica-dérmica y la unión dérmica-grasa subcutánea. La línea dibujada entre los puntos de unión muestra el engrosamiento relativo en los grupos de tratamiento.

20 El alcance de la presente invención no está limitado por las realizaciones específicas descritas en la presente memoria. De hecho, varias modificaciones de la invención además de las descritas serán evidentes para el experto en la técnica a partir de la descripción anterior y de las figuras acompañantes. Tales modificaciones se destinan a entrar dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

ES 2 659 205 T3

LISTA DE SECUENCIAS

- <110> Celgene Corporation,
Anita Gandhi
Peter H. Schafer
- <120> Uso de 3-(5-amino-2-metil-4-oxoquinazolin-3(4H)-il)piperidina-2,6-diona
en el tratamiento de enfermedades inflamatorias y
relacionadas con el sistema inmune
- <130> 12827-263-228
- <140>
- <141>
- <<150> 61/451,995
<151> 2011-03-11
- <150> 61/480,272
<151> 2011-04-28
- <160> 2
- <170> FastSEQ para Windows Versión 4.0
- <210> 1
<211> 344
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial
- <220>
- <223> ActRIIA humana fusionada a un dominio Fc humano
- <400> 7
Ile Leu Gly Arg Ser Glu Thr Gln Glu Cys Leu Phe Phe Asn Ala Asn
1 5 10 15
Trp Glu Lys Asp Arg Thr Asn Gln Thr Gly Val Glu Pro Cys Tyr Gly
20 25 30
Asp Lys Asp Lys Arg Arg His Cys Phe Ala Thr Trp Lys Asn Ile Ser
35 40 45
Gly Ser Ile Glu Ile Val Lys Gln Gly Cys Trp Leu Asp Asp Ile Asn
50 55 60
Cys Tyr Asp Arg Thr Asp Cys Val Glu Lys Lys Asp Ser Pro Glu Val
65 70 75 80
Tyr Phe Cys Cys Cys Glu Gly Asn Met Cys Asn Glu Lys Phe Ser Tyr
85 90 95
Phe Pro Glu Met Glu Val Thr Gln Pro Thr Ser Asn Pro Val Thr Pro
100 105 110
Lys Pro Pro Thr Gly Gly Gly Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
115 120 125
Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
130 135 140
Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
145 150 155 160
Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
165 170 175
Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln

```

                180                185                190
Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
    195                200                205
Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
    210                215                220
Leu Pro Val Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
225                230                235
Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr
    245                250                255
Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
    260                265                270
Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
    275                280                285
Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
    290                295                300
Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
305                310                315
Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
    325                330                335
Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
    340

```

<210> 2

<211> 335

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Proteína de fusión Fc-ActRIIB procesada con 6 aminoácidos en el N-terminal del dominio EC eliminado y 3 aminoácidos en el C-terminal del dominio EC eliminado (aminoácidos 25-131 de SEQ ID NO:28) y con una mutación L79D

<400> 25

```

Glu Thr Arg Glu Cys Ile Tyr Tyr Asn Ala Asn Trp Glu Leu Glu Arg
 1                5                10                15
Thr Asn Gln Ser Gly Leu Glu Arg Cys Glu Gly Glu Gln Asp Lys Arg
    20                25
Leu His Cys Tyr Ala Ser Trp Arg Asn Ser Ser Gly Thr Ile Glu Leu
    35                40                45
Val Lys Lys Gly Cys Trp Asp Asp Asp Phe Asn Cys Tyr Asp Arg Gln
    50                55                60
Glu Cys Val Ala Thr Glu Glu Asn Pro Gln Val Tyr Phe Cys Cys Cys
    65                70                75                80
Glu Gly Asn Phe Cys Asn Glu Arg Phe Thr His Leu Pro Glu Ala Gly
    85                90                95
Gly Pro Glu Val Thr Tyr Glu Pro Pro Pro Thr Gly Gly Gly Thr His
    100                105
Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val
    115                120                125
Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
    130                135                140
Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
    145                150                155                160
Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
    165                170                175
Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
    180                185                190
Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
    195                200                205
Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
    210                215                220

```

ES 2 659 205 T3

Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro
225					230					235					240
Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu
			245						250					255	
Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn
			260					265					270		
Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser
		275					280					285			
Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg
	290					295					300				
Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu
305					310					315					320
His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys	
				325					330						335

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto para usar en un método para tratar, prevenir o controlar una enfermedad relacionada con el sistema inmune o una enfermedad inflamatoria, en donde el método comprende administrar a un paciente que necesita del mismo, una cantidad eficaz del compuesto, en donde el compuesto es 3-(5-amino-2-metil-4-oxoquinazolin-3(4*H*)-il)piperidin-2,6-diona, o una sal, solvato, hidrato, estereoisómero, tautómero, mezcla racémica, co-cristal, clatrato, o polimorfo del mismo, aceptable farmacéuticamente.
2. El compuesto para uso de la reivindicación 1, en donde la enfermedad es el lupus eritematoso sistémico, esclerodermia, síndrome de Sjögren, vasculitis inducida por ANCA, síndrome antifosfolípídico o miastenia grave.
3. El compuesto para uso de la reivindicación 1 o 2, en donde la enfermedad es el lupus eritematoso sistémico.
4. El compuesto para uso de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde la enfermedad es el lupus eritematoso sistémico grave.
5. El compuesto para uso de la reivindicación 1 o 2, en donde la enfermedad es la esclerodermia.
6. El compuesto para uso de la reivindicación 5, en donde la esclerodermia es localizada, sistémica, esclerodermia limitada o difusa.
7. El compuesto para uso de la reivindicación 6, en donde la esclerodermia sistémica comprende el síndrome CREST.
8. El compuesto para uso de la reivindicación 1, en donde la enfermedad es el lupus eritematoso sistémico, y el método comprende administrar una cantidad eficaz de dicho compuesto a un paciente que tiene los síntomas del lupus eritematoso sistémico, en donde el síntoma se selecciona del grupo que consiste en dolor articular, inflamación articular, artritis, dolor torácico al respirar profundamente, fiebre sin otra causa, malestar general, indisposición, pérdida de cabello, llagas orales, ganglios linfáticos inflamados, sensibilidad a la luz solar, erupción cutánea, cefaleas, entumecimiento, hormigueo, convulsiones, problemas de visión, cambios de personalidad, dolor abdominal, náuseas, vómitos, ritmos cardíacos anormales, tos con sangre y dificultad respiratoria, coloración cutánea en parches y fenómeno de Raynaud.
9. El compuesto para uso de la reivindicación 1, en donde la enfermedad es esclerodermia, y el método comprende administrar a un paciente que tiene los síntomas de la esclerodermia una cantidad eficaz de dicho compuesto, en donde el síntoma se selecciona del grupo que consiste en (i) endurecimiento gradual, engrosamiento, y estiramiento cutáneo; (ii) decoloración cutánea; (iii) entumecimiento de las extremidades; (iv) piel brillante; (v) pequeños bultos blanquecinos bajo la superficie cutánea que erupcionan en un fluido blanco como la tiza; (vi) disfunción esofágica de Raynaud; (vii) telangiectasia; (viii) dolor y/o rigidez de las articulaciones; (ix) inflamación de las manos y los pies; (x) prurito cutáneo; (xi) rigidez y encorvamiento de los dedos; (xii) úlceras en el exterior de determinadas articulaciones, tales como los nudillos y los codos; (xiii) problemas digestivos, tales como ardor, dificultad al tragar, diarrea, intestino irritable y estreñimiento; (xiv) fatiga y debilidad; (xv) ; (xvi) artritis; (xvii) pérdida del cabello; (xviii) problemas en órganos internos; (xix) úlceras digitales; y (xx) auto-amputación digital.
10. El compuesto para uso de la reivindicación 1, en donde el método comprende mejorar la puntuación cutánea modificada de Rodnan, reducir o mejorar el engrosamiento cutáneo, reducir o mejorar la induración cutánea, mejorar la función pulmonar, mejorar el índice de calidad de vida dermatológico, mejorar la capacidad de difusión de monóxido de carbono, mejorar el índice de disnea de Mahler, mejorar la puntuación del cuestionario respiratorio de Saint George, mejorar la puntuación del tracto gastrointestinal del consorcio de ensayos clínicos de esclerodermia de UCLA, mejorar la dilatación mediada por flujo o mejorar o incrementar la distancia caminada durante seis minutos de un paciente que tiene esclerodermia.
11. El compuesto para uso de cualquiera de las reivindicaciones 1-10 que comprende además administrar un segundo agente activo que es un compuesto antiinflamatorio o inmunomodulador.
12. El compuesto para uso de cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en donde la cantidad eficaz de dicho compuesto es desde aproximadamente 0,005 mg/kg hasta aproximadamente 10 mg/kg del peso corporal del paciente.
13. Un método *in vitro* para la actividad moduladora de una célula B que comprende poner en contacto la célula con una cantidad eficaz de 3-(5-amino-2-metil-4-oxoquinazolin-3(4*H*)-il)piperidin-2,6-diona, o una sal, forma sólida, solvato, hidrato, estereoisómero, tautómero, mezcla racémica, co-cristal, clatrato, o polimorfo del mismo, aceptable farmacéuticamente.

14. Un método *in vitro* para la actividad moduladora de una célula T que comprende poner en contacto la célula con una cantidad eficaz de 3-(5-amino-2-metil-4-oxoquinazolin-3(4*H*)-il)piperidin-2,6-diona, o una sal, forma sólida, solvato, hidrato, tautómero, estereoisómero, mezcla racémica, co-cristal, clatrato, o polimorfo del mismo, aceptable farmacéuticamente.

5

FIG. 1

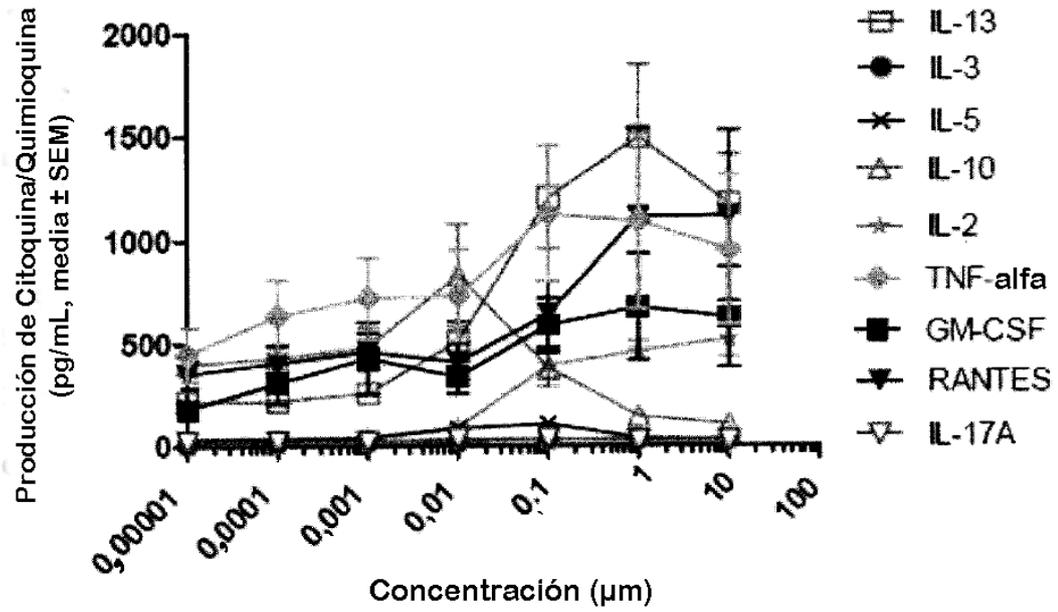


FIG. 2

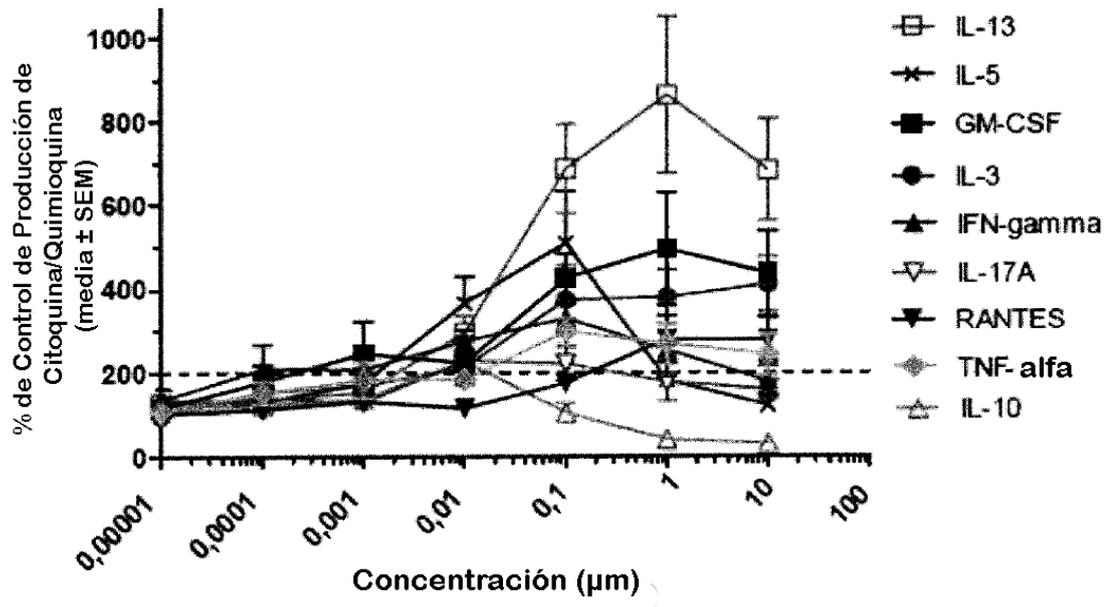


FIG. 3

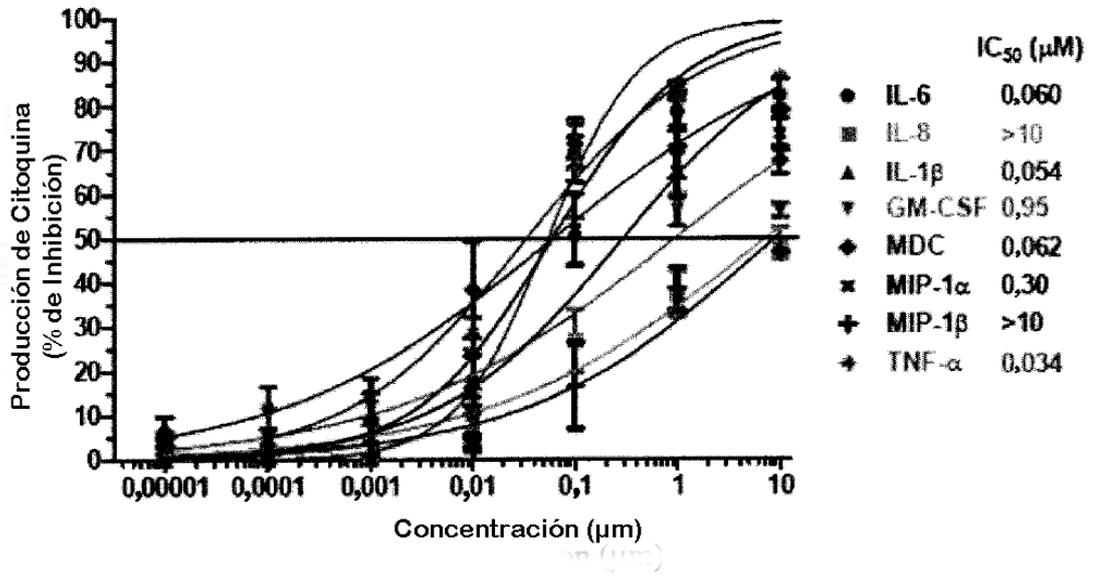


FIG. 4

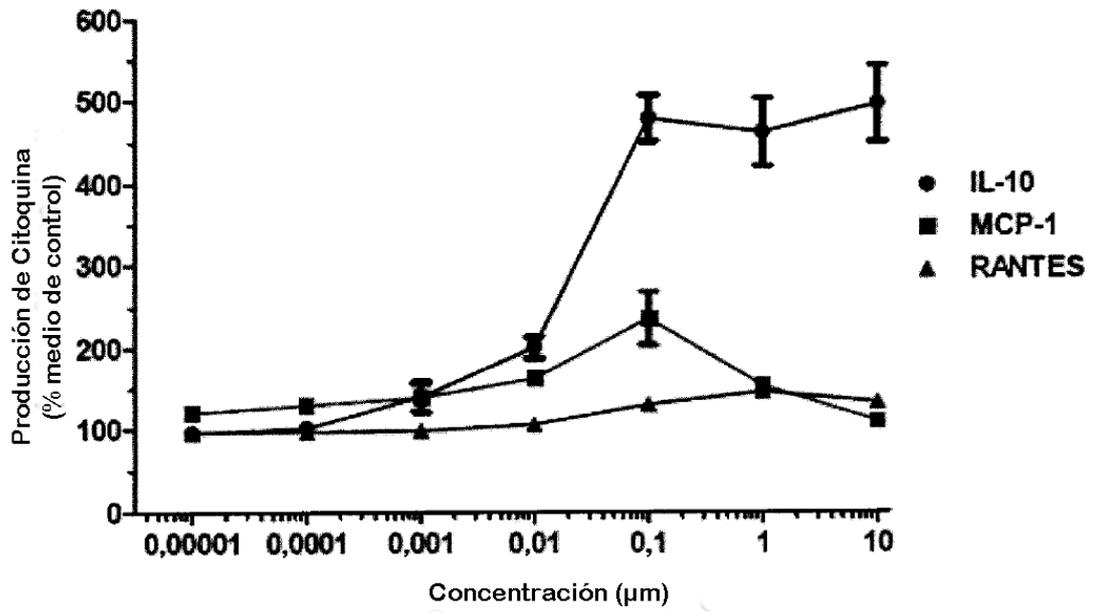


FIG. 5

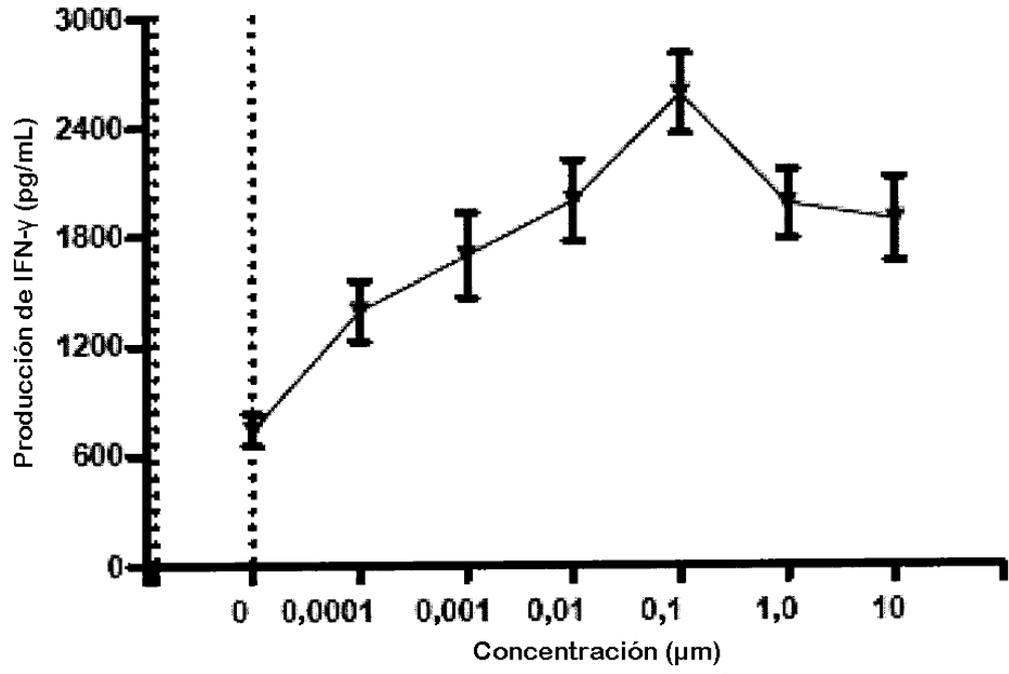


FIG. 6

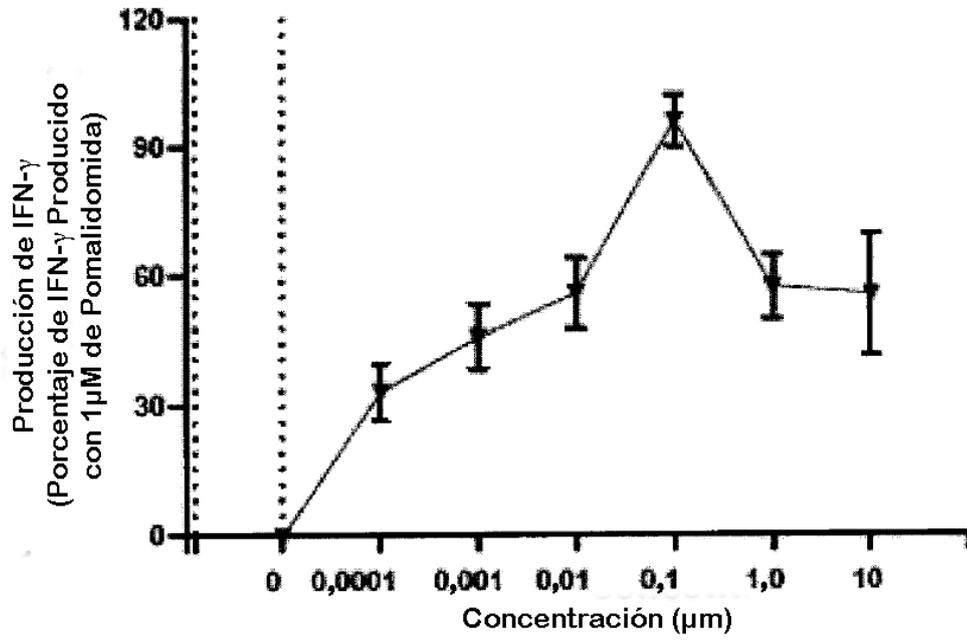


FIG. 7

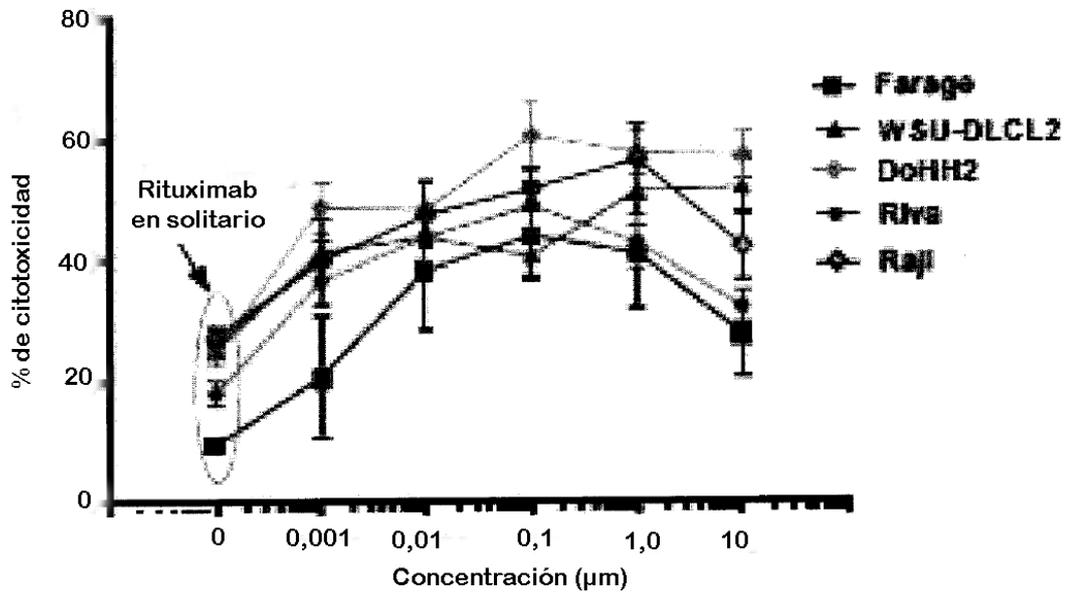
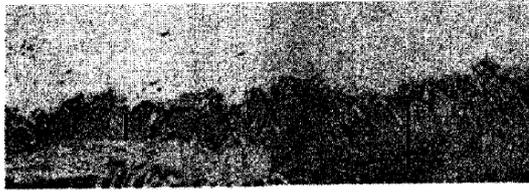
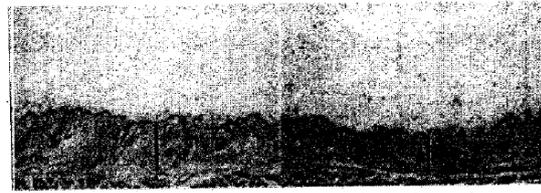


FIG. 8



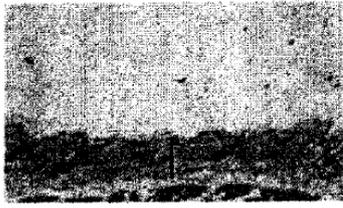
NaCl

Bleomicina

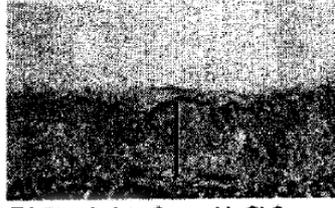


Compuesto de ensayo (30 mg/kg) Imatinib (50 mg/kg)

FIG. 9



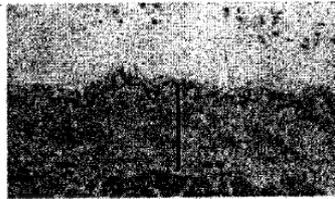
NaCl



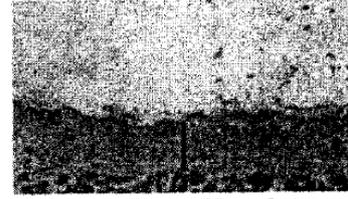
Bleomicina 3 w + NaCl 3 w



Bleomicina 6 w



Compuesto de ensayo (30 mg/kg)



Imatinib (50 mg/kg)