(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 661 583**

(51) Int. Cl.:

A61K 31/4035 (2006.01)
A61K 38/13 (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01)
A61K 38/17 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61K 31/10 (2006.01)
A61K 31/165 (2006.01)
A61K 31/40 (2006.01)
A61K 31/4015 (2006.01)
A61K 31/519 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.04.2012** **PCT/US2012/035359**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **01.11.2012** **WO12149251**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.04.2012** **E 12719228 (4)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.01.2018** **EP 2701701**

(54) Título: **Métodos y composiciones usando inhibidores de PDE4 para el tratamiento y gestión de enfermedades autoinmunes e inflamatorias**

(30) Prioridad:

28.04.2011 US 201161480263 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
02.04.2018

(73) Titular/es:

CELGENE CORPORATION (100.0%)
86 Morris Avenue
Summit, NJ 07901, US

(72) Inventor/es:

SCHAFER, PETER;
GANDHI, ANITA y
CAPONE, LORI

(74) Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 661 583 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

Métodos y composiciones usando inhibidores de PDE4 para el tratamiento y gestión de enfermedades autoinmunes e inflamatorias

1. Campo

En la presente memoria se proporciona (*S*)-*N*-(2-(1-(3-etoxi-4-metoxifenil)-2-(metilsulfonil)etil)-1,3-dioxoisoindolin-4-il)acetamida en combinación con ciclosporina A para uso en un método de tratamiento de artritis reumatoide.

2. Antecedentes

La inflamación juega un papel fundamental en las defensas del huésped y la progresión de enfermedades mediadas por inmunidad. La respuesta inflamatoria se inicia en respuesta a daño (por ejemplo, trauma, isquemia, y partículas extrañas) e infección (por ejemplo, infección bacteriana o viral) por una cascada compleja de eventos, incluyendo mediadores químicos (por ejemplo, citoquinas y prostaglandinas) y células inflamatorias (por ejemplo, leucocitos). La respuesta inflamatoria se caracteriza por flujo sanguíneo incrementado, permeabilidad capilar incrementada, y el influjo de células fagocíticas. Estos eventos resultan en hinchazón, enrojecimiento, calor (patrones de calor alterados), y formación de pus en el sitio del daño o infección.

Las citoquinas y prostaglandinas controlan la respuesta inflamatoria, y se liberan en una cascada ordenada y auto-limitante en la sangre o tejidos afectados. Esta liberación de citoquinas y prostaglandinas incrementa el flujo sanguíneo al área del daño o infección, y puede resultar en enrojecimiento y calor. Algunos de estos compuestos químicos causan una extravasación de fluido en los tejidos, resultando en hinchazón. Este proceso protector puede estimular los nervios y causar dolor. Estos cambios, cuando ocurren durante un periodo limitado en el área relevante, funcionan para el beneficio del cuerpo.

El factor de necrosis tumoral alfa (TNF-α) es una citoquina que se libera principalmente por los fagocitos mononucleares en respuesta a inmunoestimuladores. El TNF-α es capaz de aumentar la mayor parte de los procesos celulares, tales como diferenciación, reclutamiento, proliferación, y degradación proteolítica. A bajos niveles, el TNF-α confiere protección frente a agentes infecciosos, tumores, y daño tisular. Pero el TNF-α también tiene un papel en muchas enfermedades. Cuando se administra a mamíferos o seres humanos, el TNF-α causa o agrava la inflamación, fiebre, efectos cardiovasculares, hemorragia, coagulación, y respuestas de fase aguda de manera similar a las observadas durante infecciones agudas y estados de choque. La producción aumentada o no regulada de TNF-α se ha implicado en un número de enfermedades y afecciones médicas, por ejemplo, cánceres, tales como tumores sólidos y tumores transportados por la sangre; enfermedad cardiaca, tal como fallo cardiaco congestivo; y enfermedades virales, genéticas, inflamatorias, alérgicas, y autoinmunes.

La adenosina monofosfato 3',5'-cíclico (AMPc) también juega un papel en muchas enfermedades y afecciones, tales como pero no limitado a asma e inflamación, y otras afecciones (Lowe y Cheng, Drugs of the Future, 17(9), 799-807, 1992). Se ha mostrado que la elevación de AMPc en leucocitos inflamatorios inhibe su activación y la liberación posterior de mediadores inflamatorios, incluyendo TNF-α y NF-κB. Los niveles incrementados de AMPc también dan lugar a la relajación del músculo liso de las vías aéreas.

Se cree que el mecanismo celular primario para la inactivación del AMPc es la degradación de AMPc por una familia de isoenzimas referidas como fosfodiesterasas de nucleótidos cíclicos (PDE) (Beavo y Reitsnyder, Trends in Pharm., 11, 150-155, 1990). Hay once familias de PDE conocidas. Se reconoce, por ejemplo, que la inhibición de PDE tipo IV es particularmente efectiva tanto en la inhibición de la liberación de mediadores inflamatorios como en la relajación del músculo liso de las vías aéreas (Verghese, et al., Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 272(3), 1313-1320, 1995). Así, los compuestos que inhiben PDE4 específicamente, pueden inhibir la inflamación y ayudar en la relajación del músculo liso de las vías aéreas con un mínimo de efectos secundarios no deseados, tales como efectos cardiovasculares o anti-plaquetarios. Los inhibidores de PDE4 usados actualmente carecen de acción selectiva a dosis terapéuticas aceptables.

Las enfermedades inflamatorias tales como artritis, afecciones artríticas relacionadas (por ejemplo, osteoartritis, artritis reumatoide, y artritis psoriásica), enfermedad inflamatoria del intestino (por ejemplo, enfermedad de Crohn y colitis ulcerativa), sepsia, psoriasis, dermatitis atópica, dermatitis de contacto, y enfermedad pulmonar obstructiva crónica, enfermedades pulmonares inflamatorias crónicas también son dolencias prevalentes y problemáticas. La producción aumentada o no regulada de TNF-α juega un papel central en la respuesta inflamatoria y la administración de sus antagonistas bloquea las respuestas crónicas y agudas en modelos animales de enfermedad inflamatoria.

La artritis es una enfermedad autoinmune sistémica que puede referirse a un grupo de afecciones que implican daño en las articulaciones del cuerpo. Hay más de 100 formas diferentes de artritis. La forma más común es osteoartritis (enfermedad articular degenerativa) y otras formas de artritis son artritis reumatoide, artritis psoriásica, y enfermedades autoinmunes relacionadas tales como lupus y gota. La artritis reumatoide se caracteriza por una inflamación crónica de las articulaciones. Tanto el tejido como el fluido sinovial están invadidos por células

inflamatorias que dan lugar a la producción de citoquinas. Las células T y los monocitos que se infiltran en las articulaciones presentan una activación incrementada de marcadores de respuesta inmune Tipo 1 y 2.

La psoriasis es una enfermedad autoinmune sistémica crónica que aparece en la piel. Hay cinco tipos de psoriasis: en placas, en gotas, inversa, pustulosa y eritrodérmica. La forma más común, psoriasis en placas, se observa comúnmente como tonos rojos y blancos de parches escamosos que aparecen en la primera capa superior de la epidermis. Algunos pacientes, sin embargo, no tienen síntomas dermatológicos. En la psoriasis en placas, la piel se acumula rápidamente en estos sitios, lo que la proporciona una apariencia plateada, blanca. Las placas aparecen frecuentemente en la piel de los codos y rodillas, pero pueden afectar cualquier área, incluyendo el cráneo, palmas de las manos y plantas de los pies, y genitales. A diferencia del eccema, la psoriasis se encuentra más probablemente en el lado exterior de la articulación. El trastorno es una afección crónica recurrente que varía en gravedad de parches menores localizados a cobertura corporal completa. Las uñas de los dedos de las manos y uñas de los dedos de los pies están frecuentemente afectadas (distrofia ungueal psoriásica) y puede observarse como un síntoma aislado. La psoriasis también puede causar inflamación de las articulaciones, que se conoce como artritis psoriásica. En la psoriasis, una hipótesis es que las células T se vuelven activas, migran a la dermis y desencadenan la liberación de citoquinas, TNF-α en particular, lo que causa inflamación y la rápida proliferación de queratinocitos.

La artritis psoriásica es una afección artrítica inflamatoria crónica que afecta la piel, las articulaciones, los sitios de inserción de tendones, ligamentos, y fascia. Gladman, Current Opinion in Rheumatology, "Current concepts in psoriatic arthritis," 2002, 14:361-366, y Ruddy et al., Rheumatology, vol. 2., capítulo 71, página 1071, 6ª ed., 2001. La artritis psoriásica está asociada comúnmente con psoriasis. *Id.* Aproximadamente el 7% de los pacientes con psoriasis desarrolla artritis psoriásica. The Merck Manual, 448 (17ª ed., 1999).

La artritis psoriásica puede aparecer en una variedad de patrones clínicos. Hay cinco patrones generales de artritis psoriásica: artritis de las articulaciones interfalángicas distales, artritis destructora, poliartritis simétrica indistinguible de artritis reumatoide, oligoartritis asimétrica, y espondiloartropatía. Ruddy *et al.,* página 1073. La psoriasis parece preceder el inicio de la artritis psoriásica en el 60-80% de los pacientes. Ocasionalmente, la artritis y la psoriasis aparecen simultáneamente. Las erupciones cutáneas pueden estar precedidas por la artropatía.

Los síntomas de la artritis psoriásica incluyen formación de hueso extra, rigidez de las articulaciones, dactilitis, entesopatía, tendinitis, y espondilitis. Gladman, página 362. La mayor parte de los pacientes tienen el patrón clásico de psoriasis de lesiones en la piel. Ruddy *et al.,* página 1075. Placas escamosas, eritematosas, lesiones en gota, lagos de pus, y eritroderma son lesiones cutáneas psoriásicas que pueden observarse en pacientes con artritis psoriásica. Las lesiones en las uñas, incluyendo con fóvea, líneas de Beau, leuconiquia, onicolisis, manchas de aceite, hiperqueratosis subungular, hemorragias en astilla, lúnulas en manchas, y rotura, son características clínicas asociadas significativamente con el desarrollo de artritis psoriásica. Ruddy *et al.,* página 1076. Los síntomas oculares en la artritis psoriásica incluyen conjuntivitis, iritis, episcleritis, queratoconjuntivitis seca e insuficiencia aórtica.

Aunque la causa exacta de la artritis psoriásica es desconocida, los factores genéticos, medioambientales, inmunológicos, y vasculares contribuyen a la predisposición individual. Ruddy *et al.,* páginas 1071-72, y Gladman, página 363. La enfermedad ocurre lo más probablemente en familiares de primer grado que están afectados que en la población general. Ruddy *et al.,* página 1071. Los estudios poblacionales han mostrado que están asociados múltiples antígenos de leucocitos humanos (HLA). British Society for Rheumatology, Rheumatology, 2001; 40:243, y Gladman, página 362. Mucha evidencia sugiere que un proceso mediado por células T dirige la patofisiología de la artritis psoriásica. Ruddy *et al.,* páginas 1071 y 1077, y Gladman, página 363. Las células T activadas pueden contribuir a la producción aumentada de citoquinas encontrada en el fluido sinovial. Las citoquinas Th1 (por ejemplo, factor de necrosis tumoral-alfa (TNF-alfa), interleuquina (IL)-1-beta e IL-10) son más prevalentes en artritis psoriásica que en artritis reumatoide, lo que sugiere que las dos enfermedades pueden resultar de un mecanismo diferente. Ruddy *et al.,* página 1071. Los monocitos también juegan un papel en la artritis psoriásica y son responsables de la producción de metaloproteinasas de matriz, que pueden mediar los cambios destructores en las articulaciones de pacientes con artritis psoriásica. Gladman, página 364.

Internacionalmente, la incidencia de artritis psoriásica es 1-40%. La artritis psoriásica se desarrolla habitualmente en la cuarta a sexta década de la vida, pero puede ocurrir casi a cualquier edad. Los hombres y mujeres están afectados por igual, pero se produce una predominancia de hombres en la forma espondilítica, mientras se produce una predominancia de mujeres en la forma reumatoide. Ruddy *et al.,* página 1077.

Existe una necesidad significativa de métodos seguros y efectivos para tratar, prevenir y gestionar la artritis psoriásica, particularmente para pacientes que son refractarios a los tratamientos convencionales. Además, existe una necesidad de tratar dicha enfermedad mientras se reduce o evita la toxicidad y/o efectos secundarios asociados con las terapias convencionales.

Así, los compuestos y composiciones que puedan bloquear la actividad o inhibir la producción de PDE4 y determinadas citoquinas, incluyendo TNF-α, pueden ser terapéuticos beneficiosos. Muchos inhibidores que son moléculas pequeñas han demostrado una capacidad para tratar o prevenir enfermedades inflamatorias en las que

están implicados PDE4 o TNF-α (para una revisión, véase Lowe, 1998 Exp. Opin. Ther. Patents 8:1309-1332). Una de dichas clases de moléculas son las fenetilsulfonas sustituidas descritas en las Patentes U.S. Nos. 6.020.358; 6.962.940; 7.208.526; y 7.659.302, y Publicación de Patente U.S. No. 2008/0234359. Por ejemplo, Apremilast es un nuevo inmunomodulador oral pluripotente que inhibe específicamente PDE4 e inhibe la producción espontánea de TNF-α de células sinoviales reumatoides humanas y mejora la artritis experimental. (McCann et al., Arthritis Res. Ther. 2010, 12(3):R107). Además, Etanercept (Enbrel®) es un inhibidor de TNF-α útil.

Una interrelación delicada bien equilibrada entre los elementos inmunes humorales y celulares en la respuesta inflamatoria permite la eliminación de agentes dañinos y el inicio de la reparación del tejido dañado. Cuando esta interrelación equilibrada de forma delicada se interrumpe, la respuesta inflamatoria puede resultar en un daño considerable en el tejido normal y puede ser más dañina que la agresión original que inició la reacción. En estos casos de respuestas inflamatorias incontroladas, es necesaria la intervención clínica para evitar el daño tisular y disfunción orgánica. Las enfermedades tales como psoriasis, artritis reumatoide, osteoartritis, artritis psoriásica, enfermedad de Crohn, asma, alergias o enfermedad inflamatoria del intestino, se caracterizan por inflamación crónica.

Los tratamientos actuales para trastornos inflamatorios implican medicaciones sintomáticas y agentes inmunosupresores para controlar los síntomas. Por ejemplo, los fármacos anti-inflamatorios no esteroideos (NSAID) tales como aspirina, ibuprofeno, fenoprofeno, naproxeno, tolmetina, sulindac, meclofenamato sodio, piroxicam, flurbiprofeno, diclofenac, oxaprozina, nabumetona, etodolac, y quetoprofeno tienen efectos analgésicos y anti-inflamatorios. Sin embargo, se cree que los NSAID no son capaces de alterar la progresión de la enfermedad. (Tierney et al. (eds), Current Medical Diagnosis & Treatment, 37 ed., Appleton & Lange (1998), p 793). Además, los NSAID causan frecuentemente efectos secundarios gastrointestinales, afectan el tracto intestinal inferior causando perforación o agravando la enfermedad inflamatoria del intestino, producen toxicidad renal, y prolongan el tiempo de sangrado. Los corticosteroides son otra clase de fármacos que se usan comúnmente para controlar los síntomas inflamatorios. Los corticosteroides, como los NSAID, no alteran la progresión natural de la enfermedad, y así, las manifestaciones clínicas de la enfermedad activa reaparecen comúnmente cuando se interrumpe el fármaco. El problema serio de reacciones inadecuadas que resultan de terapia prolongada con corticosteroides (por ejemplo, osteoporosis, riesgo incrementado de infección, apetito incrementado, hipertensión, edema, úlceras pépticas, psicosis) limita en gran medida su uso a largo plazo.

Las dosis bajas de agentes inmunosupresores tales como agentes citotóxicos pueden usarse para el tratamiento de trastornos inflamatorios. Por ejemplo, algunos tratamientos para la psoriasis y artritis se basan en fármacos anti-reumáticos que modifican la enfermedad (DMARD tales como ciclosporina A y metotrexato), agentes anti-inflamatorios (inhibidores de TNF-α tales como etanercept), y analgésicos.

Se están buscando constantemente nuevos tratamientos para los trastornos inflamatorios y autoinmunes. En particular, se está buscando constantemente cualquier nuevo tratamiento que reduzca la dosificación y/o frecuencia de administración de agentes que se están usando actualmente, o que sea capaz de hacer que un tratamiento usado actualmente sea más efectivo. Aunque ha habido reportes de combinaciones entre inhibidores de PDE4 y corticosteroides en modelos de leucemia y cáncer de la piel, la combinación de inhibidores de PDE4 con inhibidores de TNF-α, inhibidores de calcineurina, o antimetabolitos para el tratamiento de enfermedades inflamatorias todavía no se ha utilizado. Véase, por ejemplo, Dong, H. et al., Biochem Pharmacol., 2010, 79(3): 321-329; Kowalczyk P. et al., Eur J Pharmacol., 2009, 610(1-3): 29-36; Meyers, J.A., et al. Clin Cancer Res., 2007, 13(16): 4920-4927.

US 2009/239926 A1 describe el uso de ciclopropil-N-{2-[(1S)-1-(3-etoxi-4-metoxifenil)-2-(metilsulfonil)etil]-3-oxoisoindolina-4-il}carboxamida en el tratamiento de psoriasis o artritis psoriásica. US 2006/183787 describe el uso de (+)-2-[1-(3-etoxi-4-metoxifenil)-2-metilsulfoniletil]-4-acetilaminoisoindolina-1,3-diona en el tratamiento de artritis psoriásica.

3. Compendio

La presente invención proporciona (*S*)-*N*-(2-(1-(3-etoxi-4-metoxifenil)-2-(metilsulfonil)etil)-1,3-dioxoisoindolin-4-il)acetamida, o una sal, o solvato farmacéuticamente aceptable de éste, y una cantidad terapéuticamente efectiva de agente activo adicional ciclosporina A para uso en un método para tratar la artritis reumatoide.

4. Breve descripción de las figuras

La **Figura 1.** muestra efectos de (+)-2-[1-(3-etoxi-4-metoxifenil)-2-metilsulfoniletil]-4-acetilaminoisoindolina-1,3-diona (Compuesto A) y dexametasona en el grosor de las patas posteriores en ratones.

La **Figura 2.** muestra efectos de (+)-[1-(3-etoxi-4-metoxifenil)-2-metilsulfonil]etil]-4-acetilaminoisoindolina-1,3-diona (Compuesto A) y Etanercept en el grosor de las patas posteriores en ratones.

La **Figura 3.** muestra la producción de interferón-gamma en respuesta a inhibidores de PDE4 en combinación con ciclosporina, Etanercept o metotrexato.

La **Figura 4.** muestra la producción de interleuquina-2 en respuesta a inhibidores de PDE4 en combinación con ciclosporina, Etanercept o metotrexato.

La **Figura 5.** muestra la producción de interleuquina-4 en respuesta a inhibidores de PDE4 en combinación con ciclosporina, Etanercept o metotrexato.

La **Figura 6.** muestra la producción de interleuquina-10 en respuesta a inhibidores de PDE4 en combinación con ciclosporina, Etanercept o metotrexato.

La **Figura 7.** muestra la producción de interleuquina-13 en respuesta a inhibidores de PDE4 en combinación con ciclosporina, Etanercept o metotrexato.

La **Figura 8.** muestra la producción de proteína 10 inducible por interferón en respuesta a inhibidores de PDE4 en combinación con ciclosporina, Etanercept o metotrexato.

La **Figura 9.** muestra la producción de proteína 1-alfa inflamatoria de macrófagos en respuesta a inhibidores de PDE4 en combinación con ciclosporina, Etanercept o metotrexato.

La **Figura 10.** muestra la producción de proteína 1-beta inflamatoria de macrófagos en respuesta a inhibidores de PDE4 en combinación con ciclosporina, Etanercept o metotrexato.

La **Figura 11.** muestra la producción de TNF-α en respuesta a inhibidores de PDE4 en combinación con ciclosporina, Etanercept o metotrexato.

La **Figura 12.** muestra la producción de interferón-gamma en respuesta a inhibidores de PDE4 en combinación con ciclosporina, Etanercept o metotrexato.

La **Figura 13.** muestra la producción de interleuquina-2 en respuesta a inhibidores de PDE4 en combinación con ciclosporina, Etanercept o metotrexato.

La **Figura 14.** muestra la producción de interleuquina4 en respuesta a inhibidores de PDE4 en combinación con ciclosporina, Etanercept o metotrexato.

La **Figura 15.** muestra la producción de interleuquina-10 en respuesta a inhibidores de PDE4 en combinación con ciclosporina, Etanercept o metotrexato.

La **Figura 16.** muestra la producción de interleuquina-13 en respuesta a inhibidores de PDE4 en combinación con ciclosporina, Etanercept o metotrexato.

La **Figura 17.** muestra la producción de proteína 10 inducible por interferón en respuesta a inhibidores de PDE4 en combinación con ciclosporina, Etanercept o metotrexato.

La **Figura 18.** muestra la producción de proteína 1-alfa inflamatoria de macrófagos en respuesta a inhibidores de PDE4 en combinación con ciclosporina, Etanercept o metotrexato.

La **Figura 19.** muestra la producción de proteína 1-beta inflamatoria de macrófagos en respuesta a inhibidores de PDE4 en combinación con ciclosporina, Etanercept o metotrexato.

La **Figura 20.** muestra la producción de TNF-α en respuesta a inhibidores de PDE4 en combinación con ciclosporina, Etanercept o metotrexato.

La **Figura 21.** muestra la producción de interleuquina-10 en respuesta a inhibidores de PDE4 en combinación con ciclosporina, Etanercept o metotrexato en células mononucleares de sangre periférica tratadas con enterotoxina B estafilocócica.

La **Figura 22.** muestra la producción de proteína 10 inducible por interferón en respuesta a inhibidores de PDE4 en combinación con ciclosporina, Etanercept o metotrexato en células mononucleares de sangre periférica tratadas con enterotoxina B estafilocócica.

La **Figura 23.** muestra la producción de proteína 1-alfa inflamatoria de macrófagos en respuesta a inhibidores de PDE4 en combinación con ciclosporina, Etanercept o metotrexato en células mononucleares de sangre periférica tratadas con enterotoxina B estafilocócica.

La **Figura 24.** muestra la producción de proteína 1-beta inflamatoria de macrófagos en respuesta a inhibidores de PDE4 en combinación con ciclosporina, Etanercept o metotrexato en células mononucleares de sangre periférica tratadas con enterotoxina B estafilocócica.

La **Figura 25.** muestra la producción de TNF-α en respuesta a inhibidores de PDE4 en combinación con ciclosporina, Etanercept o metotrexato en células mononucleares de sangre periférica tratadas con enterotoxina B estafilocócica.

La **Figura 26.** muestra la producción de IL-7 en respuesta al Compuesto A, solo o en combinación con metotrexato.

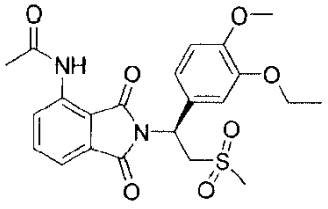
La **Figura 27.** muestra la producción de IL-7 en respuesta al Compuesto A, solo o en combinación con Etanercept.

La **Figura 28.** muestra la producción de IL-7 en respuesta al Compuesto A, solo o en combinación con prednisona.

5. Descripción detallada

5.1. Terapias de combinación que comprenden inhibidores de PDE4 para la inflamación

En la presente memoria se describen métodos para tratar, gestionar o prevenir artritis reumatoide. El Compuesto A, que es el enantiómero (+) de 2-[1-(3-etoxi-4-metoxifenil)-2-metilsulfoniletil]-4-acetilaminoisoindolina-1,3-diona, también conocido como Apremilast, o una sal farmacéuticamente de éste en combinación con ciclosporina A para uso en un método para tratar artritis reumatoide. Sin estar limitado por teoría, el enantiómero (+) de 2-[1-(3-etoxi-4-metoxifenil)-2-metilsulfoniletil]-4-acetilaminoisoindolina-1,3-diona se cree que es (S)-*N*-(2-(1-(3-etoxi-4-metoxifenil)-2-(metilsulfonil)etil)-1,3-dioxoisoindolin-4-il)acetamida, que tiene la estructura siguiente:



(A).

El Compuesto A puede prepararse según los métodos descritos en la Patente U.S. No. 6.962.940, titulada "(+)-2-[1-(3-Ethoxy-4-methoxyphenyl)-2-methylsulfonylethyl]-4-acetylaminoisoindoline-1,3-dione: Methods Of Using And Compositions Thereof," o la Publicación de Patente U.S. No. 2010/0168475. Generalmente, la 2-[1-(3-etoxi-4-metoxifenil)-2-metilsulfoniletil]-4-acetilaminoisoindolina-1,3-diona racémica puede prepararse usando los métodos descritos en la Patente de los Estados Unidos No. 6.020.358. El enantiómero (+) correspondiente puede aislarse del compuesto racémico por técnicas conocidas en la técnica. Los ejemplos incluyen, pero no están limitados a, la formación de sales quirales y el uso de cromatografía líquida quiral o de alta resolución "HPLC" y la formación y cristalización de sales 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 (1977); Eliel, E. L., Stereochemistry of Carbon Compounds (McGraw-Hill, NY, 1962); Wilen, S. H., Tables of Resolving Agents and Optical Resolutions p. 268 (E. L. Eliel, Ed., Univ. de Notre Dame Press, Notre Dame, IN, 1972).

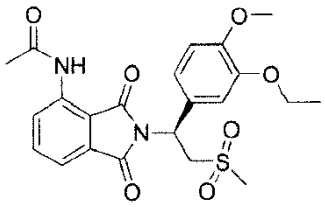
En un método específico, el enantiómero (+) de 2-[1-(3-etoxi-4-metoxifenil)-2-metilsulfoniletil]-4-acetilaminoisoindolina-1,3-diona se sintetiza a partir de anhídrido 3-acetamidoftálico y una sal de aminoácido quiral de (*S*)-2-(3-etoxi-4-metoxifenil)-1-(metilsulfonil)-et-2-ilamina. Las sales de aminoácido quirales de (*S*)-2-(3 etoxi-4-metoxifenil)-1-(metilsulfonil)-et-2-ilamina incluyen, pero no están limitadas a sales formadas con los isómeros L de alanina, arginina, asparagina, ácido aspártico, cisteína, glutamina, ácido glutámico, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, triptófano, tirosina, valina, ornitina, ácido 4-aminobutírico, ácido 2-aminoisobutírico, ácido 3-aminopropiónico, ornitina, norleucina, norvalina, hidroxiprolina, sarcosina, citrulina, ácido cisteico, t-butilglicina, t-butilalanina, fenilglicina, ciclohexilalanina, y N-acetil-L-leucina. Una sal de aminoácido quiral específica es sal de N-acetil-L-leucina de (S)-2-(3-etoxi-4-metoxifenil)-1-(metilsulfonil)-et-2-ilamina, que se resuelve a partir de 2-(3-etoxi-4-metoxifenil)-1-(sulfonil)-et-2-ilamina y N-acetil-L-leucina en metanol.

La combinación inventiva del inhibidor de PDE4 (*S*)-*N*-(2-(1-(3-etoxi-4-metoxifenil)-2-(metilsulfonil)etil)-1,3-dioxoisoindolin-4-il)acetamida ("Compuesto A") con ciclosporina A ("CsA") proporciona efectos sinérgicos para la inhibición de citoquinas asociadas con la artritis reumatoide. Como se proporciona en la presente memoria, la determinación de si la adición de Compuesto A aumentaba la inhibición de la producción de citoquinas respecto a la producida por CsA sola se evaluó en células T estimuladas con anticuerpo monoclonal (mAb) anti-CD3 humano y PBMC tratadas con enterotoxina B estafilocócica (SEB). El perfilado de citoquinas incluyó interferón-gamma (IFN-γ), interleuquina (IL)-2, IL-4, IL-10, IL-13, proteína 10 inducible por interferón (IP-10), proteína 1-alfa inflamatoria de macrófagos (MIP-1α) y proteína 1-beta inflamatoria de macrófagos (MIP-1β) y factor de necrosis tumoral alfa (TNF-α).

5.2. Definiciones

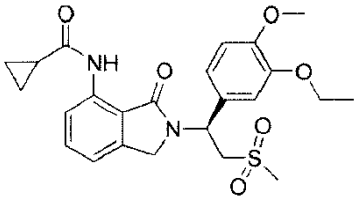
Tal y como se usa en la presente memoria, el término "Compuesto A" se refiere a una forma enantioméricamente pura de 2-[1-(3-etoxi-4-metoxifenil)-2-metilsulfoniletil]-4-acetilaminoisoindolina-1,3-diona, también conocido como Apremilast, y que cuando se disuelve en metanol rota el plano de la luz polarizada en la dirección (+). Sin estar

limitado por teoría, se cree que el Compuesto A es (*S*)-*N*-(2-(1-(3-etoxi-4-metoxifenil)-2-(metilsulfonil)etil)-1,3-dioxoisoindolin-4-il)acetamida, que tiene la estructura siguiente:



(A).

Tal y como se usa en la presente memoria, el término "Compuesto B" se refiere a {2-[(1S)-1-(3-etoxi-4-metoxi-fenil)-2-metanosulfonil-etil]-3-oxo-2,3-dihidro-1H-isoindol-4-il}-amida del ácido ciclopropanocarboxílico enantioméricamente pura. Sin estar limitado por teoría, se cree que el Compuesto B es (*S*)-*N*-(2-(1-(3-etoxi-4-metoxifenil)-2-(metilsulfonil)etil)-3-oxoisoindolin-4-il)ciclopropanocarboxamida, que tiene la estructura siguiente:



(B).

Tal y como se usa en la presente memoria y a no ser que se indique otra cosa, el término "sal farmacéuticamente aceptable" incluye, pero no está limitado a, sales preparadas a partir de ácidos o bases no tóxicos farmacéuticamente aceptables incluyendo ácidos y bases inorgánicas y ácidos y bases orgánicas. Las sales de adición a base farmacéuticamente aceptables adecuadas incluyen sales metálicas preparadas a partir de aluminio, calcio, litio, magnesio, potasio, sodio y cinc o sales orgánicas preparadas a partir de lisina, N,N'-dibenciletilendiamina, cloroprocaína, colina, dietanolamina, etilendiamina, meglumina (N-metilglucamina) y procaína. Los ácidos no tóxicos adecuados incluyen, pero no están limitados a, ácidos inorgánicos y orgánicos tales como ácido acético, algínico, antranílico, bencenosulfónico, benzoico, camforsulfónico, cítrico, etanosulfónico, fórmico, fumárico, furoico, galacturónico, glucónico, glucurónico, glutámico, glicólico, bromhídrico, clorhídrico, isetiónico, láctico, maleico, málico, mandélico, metanosulfónico, múcico, nítrico, pamoico, pantoténico, fenilacético, fosfórico, propiónico, salicílico, esteárico, succínico, sulfanílico, sulfúrico, tartárico, y ácido p-toluenosulfónico. Los ácidos no tóxicos específicos incluyen ácidos clorhídrico, bromhídrico, fosfórico, sulfúrico, y metanosulfónico. Los ejemplos de sales específicas incluyen sales hidrocloruro y mesilato.

Tal y como se usa en la presente memoria y a no ser que se indique otra cosa, el término "hidrato" significa un compuesto proporcionado en la presente memoria o una sal de éste, que incluye además una cantidad estequiométrica o no estequiométrica de agua unida por fuerzas intermoleculares no covalentes.

Tal y como se usa en la presente memoria y a no ser que se indique otra cosa, el término "solvato" significa un solvato formado a partir de la asociación de una o más moléculas de disolvente con un compuesto proporcionado en la presente memoria. El término "solvato" incluye hidratos (por ejemplo, mono-hidrato, dihidrato, trihidrato, tetrahidrato y semejantes).

Tal y como se usa en la presente memoria y a no ser que se indique otra cosa, el término "polimorfo" significa formas sólidas cristalinas de un compuesto proporcionado en la presente memoria o complejo de éste. Los diferentes polimorfos del mismo compuesto pueden presentar diferentes propiedades físicas, químicas, y/o espectroscópicas.

Tal y como se usa en la presente memoria y a no ser que se especifique otra cosa, el término "profármaco" significa un derivado de un compuesto que puede hidrolizarse, oxidarse, o reaccionar de otra forma en condiciones biológicas (*in vitro* o *in vivo*) para proporcionar el compuesto. Los ejemplos de profármacos incluyen, pero no están limitados a, derivados y metabolitos de (+)-2-[1-(3-etoxi-4-metoxifenil)-2-metilsulfoniletil]-4-acetilaminoisoindolina-1,3-diona que incluyen restos biohidrolizables tales como análogos amidas biohidrolizables, ésteres biohidrolizables, carbamatos biohidrolizables, carbonatos biohidrolizables, ureidos biohidrolizables, y fosfato biohidrolizables. Los profármacos pueden prepararse típicamente usando métodos muy conocidos, tales como los descritos por 1 Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery, 172-178, 949-982 (Manfred E. Wolff ed., 5ª ed. 1995).

Tal y como se usa en la presente memoria y a no ser que se especifique otra cosa, el término "enantiómero," "isómero" o "estereoisómero" engloba todos los compuestos enantioméricamente/estereoméricamente puros y enantioméricamente/estereoméricamente enriquecidos proporcionados en la presente memoria.

Tal y como se usa en la presente memoria y a no ser que se indique otra cosa, el término "estereoméricamente puro" o "enantioméricamente puro" significa que un compuesto comprende un estereoisómero y carece sustancialmente de su contra estereoisómero o enantiómero. Por ejemplo, un compuesto es estereoméricamente o enantioméricamente puro, cuando el compuesto contiene más de o igual a 80%, 90%, 95%, 98% ó 99% de un estereoisómero, y 20%, 10%, 5%, 2%, 1% o menos del contra estereoisómero. "Carece sustancialmente de su enantiómero (-)" está englobado por el término estereoméricamente puro o enantioméricamente puro.

Tal y como se usa en la presente memoria, el término "efecto adverso" incluye, pero no está limitado a, toxicidades gastrointestinales, renales y hepáticas, leucopenia, incrementos en los tiempos de sangrado, debido, por ejemplo, a trombocitopenia, y prolongación de la gestación, náusea, vómito, somnolencia, astenia, mareo, teratogenicidad, síntomas extra-piramidales, acatisia, cardiotoxicidad incluyendo alteraciones cardiovasculares, inflamación, disfunción sexual masculina, y niveles séricos elevados de enzimas hepáticas. El término "toxicidades gastrointestinales" incluye, pero no está limitado a, ulceraciones y erosiones gástricas e intestinales. El término "toxicidades renales" incluye, pero no está limitado a, afecciones tales como necrosis papilar y nefritis intersticial crónica.

Tal y como se usa en la presente memoria, el término "paciente" se refiere a un mamífero, particularmente un ser humano. En algunas realizaciones, el paciente es una hembra. En realizaciones adicionales, el paciente es un macho. En realizaciones adicionales, el paciente es un niño.

Tal y como se usan en la presente memoria y a no ser que se especifique otra cosa, los términos "tratar," "que trata" y "tratamiento" contemplan una acción que ocurre mientras un paciente está padeciendo la enfermedad o trastorno especificado, que reduce la gravedad o síntomas de la enfermedad o trastorno, o retarda o ralentiza la progresión o síntomas de la enfermedad o trastorno.

Tal y como se usan en la presente memoria y a no ser que se especifique otra cosa, los términos "prevenir," "que previene" y "prevención" contemplan una acción que ocurre antes de que un paciente empiece a padecer la enfermedad o trastorno especificado, que inhibe o reduce la gravedad o síntomas de la enfermedad o trastorno.

Tal y como se usan en la presente memoria y a no ser que se indique otra cosa, los términos "gestionar," "que gestiona" y "gestión" engloban prevenir la recurrencia de la enfermedad o trastorno especificado en un paciente que ya ha padecido la enfermedad o trastorno, y/o prolongar el tiempo en el que un paciente que ha padecido la enfermedad o trastorno permanece en remisión. Los términos engloban modular el umbral, desarrollo y/o duración de la enfermedad o trastorno, o cambiar la manera en la que un paciente responde a la enfermedad o trastorno.

5.3. Tratamiento

En la presente memoria se proporciona la combinación inventiva para uso en métodos para tratar, gestionar y/o prevenir artritis reumatoide-que comprende administrar a un paciente que necesita dicho tratamiento, gestión o prevención, una cantidad terapéuticamente o profilácticamente efectiva de Compuesto A, o una sal, solvato farmacéuticamente aceptable de éste y una cantidad terapéuticamente efectiva del agente adicional ciclosporina A. En algunas realizaciones, se usa la sal o solvato del Compuesto A. En otras realizaciones, se usa la base libre del Compuesto A.

La invención proporcionada en la presente memoria comprende administrar Compuesto A que carece sustancialmente de su enantiómero (-), o una sal, solvato farmacéuticamente aceptable de éste, después del inicio de los síntomas de la artritis reumatoide.

La invención proporcionada en la presente memoria también incluye inhibir o evitar los síntomas de la artritis reumatoide, así como abordar la enfermedad en sí misma, antes del inicio de los síntomas mediante la administración del Compuesto A, o una sal, solvato farmacéuticamente aceptable de éste. En algunas realizaciones, los pacientes tratados por los métodos proporcionados en la presente memoria tienen un historial de artritis. En determinadas realizaciones, los métodos comprenden administrar el Compuesto A o una sal, solvato farmacéuticamente aceptable de éste, a un paciente (por ejemplo, un ser humano) que padece o es probable que padezca, artritis reumatoide).

Los inhibidores de PDE4 (*S*)-*N*-(2-(1-(3-etoxi-4-metoxifenil)-2-(metilsulfonil)etil)-1,3-dioxoisoindolin-4-il)acetamida y (*S*)-*N*-(2-(1-(3-etoxi-4-metoxifenil)-2-(metilsulfonil)etil)-3-oxoisoindolin-4-il)ciclopropanocarboxamida pueden usarse en el tratamiento, gestión o prevención de la artritis reumatoide. La magnitud de una dosis profiláctica o terapéutica de un ingrediente activo particular en la gestión aguda o crónica de la artritis variará, sin embargo, con la naturaleza y gravedad de la enfermedad o afección, y la ruta por la que el ingrediente activo se administra. La dosis, y quizá la frecuencia de la dosis, también variará según la edad, peso corporal, y respuesta del paciente individual. Los regímenes de dosificación adecuados pueden seleccionarse fácilmente por los expertos en la técnica con la consideración debida de dichos factores.

En general, el intervalo de dosis diaria recomendada para las afecciones descritas en la presente memoria estará en el intervalo de aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 1.000 mg al día, proporcionada como una dosis única una vez al día o como dosis divididas a lo largo del día. Más específicamente, la dosis diaria puede

administrarse una vez, dos veces, tres veces, o cuatro veces diariamente en dosis divididas igualmente. Específicamente, un intervalo de dosis diaria puede ser de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 500 mg al día, más específicamente, entre aproximadamente 10 mg y aproximadamente 200 mg al día. Específicamente, la dosis diaria puede administrarse en formas de dosificación de 1 mg, 5 mg, 6,25 mg, 10 mg, 15 mg, 20 mg, 25 mg, 30 mg, 50 mg, 100 mg, 200 mg, 300 mg, 400 mg ó 500 mg (Q.D. o B.I.D.). En la gestión del paciente, la terapia puede iniciarse a una dosis menor, quizá aproximadamente 1 mg a aproximadamente 25 mg, e incrementarse si es necesario hasta aproximadamente 200 mg a aproximadamente 1.000 mg al día bien como una única dosis o dosis divididas, dependiendo de la respuesta global del paciente. En realizaciones adicionales, la dosis diaria del Compuesto A es de aproximadamente 0,01 mg a aproximadamente 100 mg por kg del peso corporal de un paciente. En algunas realizaciones, la dosis diaria del compuesto elegido es aproximadamente 1 mg/kg, 5 mg/kg, 6,25 mg/kg,10 mg/kg ó 25 mg/kg. En determinadas realizaciones, la cantidad terapéuticamente efectiva del primer agente activo como se proporciona en la presente memoria es aproximadamente 1, 5, ó 25 mg por kg de peso corporal del paciente al día y la cantidad terapéuticamente efectiva del agente activo adicional como se proporciona en la presente memoria es aproximadamente 1, 5, ó 6,25 mg por kg de peso corporal del paciente al día.

5.3.1. Terapia de combinación

Tal y como se proporciona en la presente memoria, (*S*)-*N*-(2-(1-(3-etoxi-4-metoxifenil)-2-(metilsulfonil)etil)-1,3-dioxoisoindolin-4-il)acetamida se administra en combinación con otro fármaco (un "segundo agente activo" o un "agente activo adicional") para tratar, gestionar y/o prevenir artritis reumatoide.

El Compuesto A se combina con un segundo agente activo en la invención proporcionada en la presente memoria. En algunas realizaciones, en la presente memoria se proporcionan combinaciones sinérgicas para el tratamiento, prevención y/o gestión de la artritis reumatoide. En algunas realizaciones, el Compuesto A también puede usarse para aliviar efectos adversos asociados con los segundos agentes activos. Alternativamente, en algunas realizaciones, los segundos agentes activos también pueden usarse para aliviar efectos adversos asociados con el Compuesto A.

El segundo agente activo que se va a usar en la invención proporcionada en la presente memoria en combinación con el Compuesto A es ciclosporina A.

Los segundos agentes activos pueden administrarse antes, después, o simultáneamente con el Compuesto A.

En algunas realizaciones, la administración de una combinación del Compuesto A y ciclosporina A resulta en un efecto terapéutico sinérgico para el tratamiento, gestión, y/o prevención de la artritis reumatoide.

La administración de (*S*)-*N*-(2-(1-(3-etoxi-4-metoxifenil)-2-(metilsulfonil)etil)-1,3-dioxoisoindolin-4-il)acetamida y ciclosporina A a un paciente puede ocurrir simultáneamente o secuencialmente por la misma ruta o rutas diferentes de administración. La idoneidad de una ruta de administración particular empleada para un segundo agente activo depende del segundo agente activo en sí mismo (por ejemplo, si puede administrarse oralmente o tópicamente sin descomposición antes de entrar en la corriente sanguínea) y el sujeto que se está tratando. Una ruta de administración particular del enantiómero (+) de 2-[1-(3-etoxi-4-metoxifenil)-2-metilsulfoniletil]-4-acetilaminoisoindolina-1,3-diona es la administración oral en formas de dosificación de un comprimido o una cápsula. Las rutas de administración particulares para los segundos agentes o ingredientes activos proporcionados en la presente memoria son conocidas para los expertos en la técnica. Véase, por ejemplo, The Merck Manual, 448 (17ª ed., 1999).

La cantidad de segundo agente activo administrado puede determinarse sobre la base del agente específico usado, el sujeto que se está tratando, la gravedad y estadio de la enfermedad y la o las cantidades de Compuesto A y cualesquiera segundos agentes activos adicionales administrados simultáneamente al paciente. Los expertos en la técnica pueden determinar las cantidades específicas según procedimientos convencionales conocidos en la técnica. En el inicio, se puede empezar a partir de la cantidad del segundo agente activo que se usa convencionalmente en las terapias y ajustar la cantidad según los factores descritos anteriormente. Véase, por ejemplo, Physician's Desk Reference (56ª Ed., 2004).

Puede ser necesario usar dosificaciones del ingrediente activo que están fuera de los intervalos descritos en la presente memoria en algunos casos, como será evidente para los expertos en la técnica. Además, se indica que el sanitario o médico responsable sabrá cómo, y cuando, interrumpir, ajustar, o terminar la terapia conjuntamente con la respuesta del paciente individual.

Las expresiones "cantidad terapéuticamente efectiva," "cantidad profilácticamente efectiva," y "cantidad terapéuticamente o profilácticamente efectiva," tal y como se usan en la presente memoria engloban las cantidades de dosificación y esquemas de frecuencia de dosis descritos anteriormente. Pueden ser aplicables diferentes cantidades terapéuticamente efectivas para diferentes enfermedades y afecciones, como conocerán fácilmente los expertos en la técnica. De forma similar, las cantidades suficientes para tratar o prevenir dichos trastornos, pero insuficientes para causar, o suficientes para reducir, efectos adversos asociados con formas racémicas del

Compuesto A también están englobadas por las cantidades de dosificación descritas en la presente memoria y esquemas de frecuencia de dosis.

5.4. Composiciones farmacéuticas y formas de dosificación

Pueden usarse composiciones farmacéuticas en la preparación de formas de dosificación unitarias individuales. Las composiciones farmacéuticas y formas de dosificación proporcionadas en la presente memoria pueden comprender un inhibidor de PDE4, incluyendo, pero no limitado a, el Compuesto A, o una sal, solvato farmacéuticamente aceptable de éste y el segundo agente activo ciclosporina.

Las formas de dosificación unitarias proporcionadas en la presente memoria son adecuadas para administración oral, mucosal (por ejemplo, nasal, sublingual, vaginal, cística, rectal, prepucial, ocular, bucal o aural), parenteral (por ejemplo, subcutánea, intravenosa, inyección en bolo, intramuscular o intraarterial), tópica (por ejemplo, gotas oculares u otras preparaciones oftálmicas), transdérmica o transcutánea a un paciente. Los ejemplos no limitativos de formas de dosificación incluyen comprimidos; comprimidos oblongos; cápsulas, tales como cápsulas de gelatina elástica blanda; sobres; pastillas; comprimidos para chupar; dispersiones; supositorios; polvos; aerosoles (por ejemplo, pulverizadores nasales o inhaladores); geles; formas de dosificación líquidas adecuadas para administración oral o mucosal a un paciente, incluyendo suspensiones (por ejemplo, suspensiones líquidas acuosas o no acuosas, emulsiones líquidas agua en aceite o aceite en agua), disoluciones y elixires; formas de dosificación líquidas 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 pueden reconstituirse para proporcionar formas de dosificación líquidas adecuadas para administración parenteral a un paciente.

La composición, forma y tipo de formas de dosificación proporcionadas en la presente memoria variarán típicamente dependiendo de su uso. Por ejemplo, una forma de dosificación usada en el tratamiento agudo de una enfermedad puede contener cantidades mayores de uno o más de los ingredientes activos que comprende que una forma de dosificación usada en el tratamiento crónico de la misma enfermedad. De forma similar, una forma de dosificación parenteral puede contener cantidades menores de uno o más de los ingredientes activos que comprende que una forma de dosificación oral usada para tratar la misma enfermedad. Éstas y otras maneras en las que las formas de dosificación específicas proporcionadas en la presente memoria variarán entre sí serán fácilmente evidentes para los expertos en la técnica. Véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 20ª ed., Mack Publishing, Easton PA (2000).

Las composiciones farmacéuticas y formas de dosificación típicas comprenden uno o más excipientes. Los excipientes adecuados son muy conocidos por los expertos en la técnica de farmacia y los ejemplos no limitantes de excipientes adecuados se proporcionan en la presente memoria. Si un excipiente particular es adecuado para su incorporación en una composición farmacéutica o forma de dosificación depende de una variedad de factores incluyendo, pero no limitado a, la manera en la que la forma de dosificación se administrará a un paciente. Por ejemplo, las formas de dosificación orales tales como comprimidos pueden contener excipientes no idóneos para uso en formas de dosificación parenterales. La idoneidad de un excipiente particular también puede depender de los ingredientes activos específicos en la forma de dosificación. Por ejemplo, la descomposición de algunos ingredientes activos puede acelerarse por algunos excipientes tales como lactosa o cuando se exponen al agua. Los ingredientes activos que comprenden aminas primarias o secundarias son particularmente susceptibles a dicha descomposición acelerada. Consecuentemente, en la presente memoria se proporcionan composiciones farmacéuticas y formas de dosificación que contiene poca, si alguna, lactosa otros mono-o di-sacáridos. Tal y como se usa en la presente memoria, el término "libre de lactosa" significa que la cantidad de lactosa presente, si alguna, es insuficiente para incrementar sustancialmente la tasa de degradación de un ingrediente activo.

Las composiciones libres de lactosa proporcionadas en la presente memoria pueden comprender excipientes que son muy conocidos en la técnica y se listan, por ejemplo, en la *Farmacopea de los EEUU* (USP) 25-NF20 (2002). En general, las composiciones libres de lactosa comprenden ingredientes activos, un aglutinante/relleno y un lubricante en cantidades farmacéuticamente compatibles y farmacéuticamente aceptables. Las formas de dosificación libres de lactosa particulares comprenden ingredientes activos, celulosa microcristalina, almidón pre-gelatinizado y estearato de magnesio.

En la presente memoria 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%) está ampliamente aceptada en las técnicas farmacéuticas como un medio para simular el almacenamiento a largo plazo con el fin de determinar características tales como vida útil o la estabilidad de las formulaciones con el tiempo. Véase, por ejemplo, Jens T. Carstensen, Drug Stability: Principles & Practice, 2ª. Ed., Marcel Dekker, NY, NY, 1995, p. 379-80. En efecto, el agua y el calor aceleran la descomposición de algunos compuestos. Así, el efecto del agua en una formulación puede tener una gran significancia ya que el contenido en agua y/o la humedad se encuentran comúnmente durante la fabricación, manejo, envasado, almacenamiento, transporte y uso de las formulaciones.

Las composiciones farmacéuticas y formas de dosificación anhidras proporcionadas en la presente memoria pueden prepararse usando ingredientes anhidros o que contienen un bajo contenido en agua y condiciones de bajo contenido en agua o baja humedad. Las composiciones farmacéuticas y formas de dosificación que comprenden lactosa y al menos un ingrediente activo que comprende una amina primaria o secundaria son preferiblemente anhidras si se espera un contacto sustancial con contenido de agua y/o humedad durante la fabricación, envasado y/o almacenamiento.

Una composición farmacéutica anhidra debe prepararse y almacenarse de manera que se mantenga su naturaleza anhidra. De acuerdo con esto, las composiciones anhidras se envasan preferiblemente usando materiales que se sabe que evitan la exposición al agua de manera que pueden incluirse en kits de formulación adecuados. Los ejemplos no limitantes de envases adecuados incluyen aluminios, plásticos, contenedores de dosis unitaria (por ejemplo, viales), envases blíster, y láminas en tiras sellados herméticamente.

En la presente memoria también se proporcionan composiciones farmacéuticas y formas de dosificación que comprenden uno o más compuestos que reducen la velocidad a la que se descompondrá un ingrediente activo. Dichos compuestos, que se refieren en la presente memoria como "estabilizantes," incluyen, pero no están limitados a, antioxidantes tales como ácido ascórbico, tampones de pH o tampones de sal. Como las cantidades y tipos de excipientes, las cantidades y tipos específicos de ingredientes activos en una forma de dosificación pueden ser diferentes dependiendo de factores tales como, pero no limitado a, la ruta por la que se va a administrar a pacientes. Sin embargo, las formas de dosificación típicas proporcionadas en la presente memoria comprenden (*S*)-*N*-(2-(1-(3-etoxi-4-metoxifenil)-2-(metilsulfonil)etil)-1,3-dioxoisoindolin-4-il)acetamida o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable de éste en una cantidad de aproximadamente 1 a aproximadamente 1.000 mg. Las formas de dosificación típicas comprenden Compuesto A o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable de éste en una cantidad de aproximadamente 1, 2, 5, 7,5, 10, 12,5, 15, 17,5, 20, 25, 30, 50, 100, 150 ó 200 mg. En una realización particular, una forma de dosificación comprende bien uno de Compuesto A en una cantidad de aproximadamente 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 50, 100 ó 200 mg.

Por supuesto, la cantidad específica del fármaco anti-artrítico dependerá del agente específico usado, el tipo de artritis que se está tratando o gestionando, y la o las cantidades del inhibidor de PDE4 proporcionadas en la presente memoria y los agentes activos adicionales administrados simultáneamente al paciente.

5.4.1. Formas de dosificación orales

Las composiciones farmacéuticas proporcionadas en la presente memoria que son adecuadas para administración oral pueden presentarse pararse como formas de dosificación discretas, tal como, pero no están limitados a, comprimidos (por ejemplo, comprimidos masticables), comprimidos oblongos, cápsulas, y líquidos (por ejemplo, jarabes con sabor). Dichas formas de dosificación contienen cantidades predeterminadas de ingredientes activos, y pueden prepararse por métodos de farmacia muy conocidos para los expertos en la técnica. Véase, generalmente, Remington's Pharmaceutical Sciences, 20ª ed., Mack Publishing, Easton PA (2000).

Las formas de dosificación orales típicas proporcionadas en la presente memoria se preparan combinando el o los ingredientes activos en una mezcla íntima con al menos un excipiente según técnicas de composición farmacéuticas convencionales. Los excipientes pueden tomar una amplia variedad de formas dependiendo de la forma de preparación deseada para administración. Los ejemplos no limitantes de excipientes adecuados para uso en formas de dosificación orales líquidas o en aerosol incluyen agua, glicoles, aceites, alcoholes, agentes saporíferos, conservantes, y agentes colorantes. Los ejemplos no limitantes de excipientes adecuados para uso en formas de dosificación orales sólidas (por ejemplo, polvos, comprimidos, cápsulas, y comprimidos oblongos) incluyen almidones, azúcares, celulosa micro-cristalina, diluyentes, agentes de granulación, lubricantes, aglutinantes, y agentes disgregantes.

Dada su facilidad de administración, los comprimidos y cápsulas representan las formas unitarias de dosificación más ventajosas en cuyo caso se emplean excipientes sólidos. Si se desea, los comprimidos pueden recubrirse por técnicas acuosas o no acuosas estándar. Dichas formas de dosificación pueden prepararse por cualquiera de los métodos de farmacia. En general, las composiciones farmacéuticas y formas de dosificación se preparan mezclando uniformemente e íntimamente los ingredientes activos con vehículos líquidos, vehículos sólidos finamente divididos, o ambos, y después se da forma al producto en la presentación deseada si es necesario.

Por ejemplo, un comprimido puede prepararse por compresión o moldeo. Los comprimidos comprimidos pueden prepararse comprimiendo en una máquina adecuada los ingredientes activos en una forma de flujo libre tal como polvo o gránulos, opcionalmente mezclado con un excipiente. Los comprimidos moldeados pueden prepararse moldeando en una máquina adecuada una mezcla del compuesto en polvo humedecido con un diluyente líquido inerte.

Los ejemplos no limitantes de excipientes que pueden usarse en formas de dosificación orales proporcionadas en la presente memoria incluyen aglutinantes, rellenos, disgregantes, y lubricantes. Los ejemplos no limitantes de aglutinantes adecuados para uso en composiciones farmacéuticas y formas de dosificación incluyen almidón de maíz, almidón de patata, u otros almidones, gelatina, gomas naturales y sintéticas tal como arábiga, alginato de

sodio, ácido algínico, otros alginatos, goma de tragacanto en polvo, goma guar, celulosa y sus derivados (por ejemplo, etil celulosa, acetato de celulosa, carboximetil celulosa de calcio, carboximetil celulosa de sodio), polivinil pirrolidona, metil celulosa, almidón pre-gelatinizado, hidroxipropil metil celulosa, (por ejemplo, Nos. 2208, 2906, 2910), celulosa microcristalina, y mezclas de éstos.

Los ejemplos no limitantes de formas adecuadas de celulosa microcristalina incluyen los materiales vendidos 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 éstos. Un aglutinante específico es una mezcla de celulosa microcristalina y carboximetil celulosa de sodio vendido como AVICEL RC-581. Los excipientes o aditivos anhidros o con bajo contenido en agua adecuados incluyen AVICEL-PH-103™ y Almidón 1500 LM.

Los ejemplos no limitantes de rellenos adecuados para uso en las composiciones farmacéuticas y formas de dosificación descritas en la presente memoria incluyen talco, carbonato de calcio (por ejemplo, gránulos o polvo), celulosa microcristalina, celulosa en polvo, dextratos, caolín, manitol, ácido silícico, sorbitol, almidón, almidón pre-gelatinizado, y mezclas de éstos. El aglutinante o relleno en las composiciones farmacéuticas está presente típicamente en de aproximadamente 50 a aproximadamente 99 por ciento en peso de la composición farmacéutica o forma de dosificación.

Los disgregantes pueden usarse en las composiciones proporcionadas en la presente memoria para proporcionar comprimidos que se disgregan cuando se exponen a un entorno acuoso. Los comprimidos que contienen demasiado disgregante pueden disgregarse en el almacenamiento, mientras aquellos que contienen demasiado poco disgregante pueden no disgregarse a una velocidad deseada o bajo las condiciones deseadas. Así, una cantidad suficiente de disgregante que no es demasiado alta ni demasiado baja para alterar perjudicialmente la liberación de los ingredientes activos debe usarse para formar formas de dosificación orales sólidas. La cantidad de disgregante usada varía sobre la base del tipo de formulación, y es fácilmente discernible para los expertos en la técnica. Las composiciones farmacéuticas típicas comprenden de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 15 por ciento en peso de disgregante, preferiblemente de aproximadamente 1 a aproximadamente 5 por ciento en peso de disgregante.

Los ejemplos no limitantes de disgregantes que pueden usarse en composiciones farmacéuticas y formas de dosificación proporcionadas en la presente memoria incluyen agar-agar, ácido algínico, carbonato de calcio, celulosa microcristalina, croscarmelosa de sodio, crospovidona, polacrilina potasio, glicolato sódico de almidón, almidón de patata o tapioca, otros almidones, almidón pre-gelatinizado, otros almidones, arcillas, otras alginas, otras celulosas, gomas, y mezclas de éstos.

Los ejemplos no limitantes de lubricantes que pueden usarse en composiciones farmacéuticas y formas de dosificación proporcionadas en la presente memoria incluyen estearato de calcio, estearato de magnesio, aceite mineral, aceite mineral ligero, glicerina, sorbitol, manitol, polietilen glicol, otros glicoles, ácido esteárico, lauril sulfato de sodio, talco, aceite vegetal hidrogenado (por ejemplo, aceite de cacahuete, aceite de semilla de algodón, aceite de girasol, aceite de sésamo, aceite de oliva, aceite de maíz, y aceite de soja), estearato de cinc, oleato de etilo, laureato de etilo, agar, y mezclas de éstos. Los lubricantes adicionales incluyen, por ejemplo, un gel de sílice siloide (AEROSIL 200, fabricado por W.R. Grace Co. de Baltimore, MD), un aerosol coagulado de sílice sintética (comercializado por Degussa Co. de Plano, TX), CAB-O-SIL (un producto de dióxido de silicio pirogénico vendido por Cabot Co. de Boston, MA), y mezclas de éstos. Si se usan, los lubricantes se usan típicamente 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 oral proporcionada en la presente memoria comprende Compuesto A, lactosa anhidra, celulosa microcristalina, polivinilpirrolidona, ácido esteárico, sílice coloidal anhidra y gelatina.

5.4.2. Formas de dosificación de liberación retardada

Los ingredientes activos pueden administrarse por medios de liberación controlada o por dispositivos de administración que son muy conocidos para los expertos en la técnica. Los ejemplos no limitantes de medios de liberación controlada o dispositivos de administración incluyen 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 y 5.733.566. Dichas formas de dosificación pueden usarse para proporcionar una liberación lenta o controlada de uno o más ingredientes activos usando, por ejemplo, hidropropilmetil celulosa, otras matrices de polímero, geles, membranas permeables, sistemas osmóticos, recubrimientos con múltiples capas, micropartículas, liposomas, microesferas, o una combinación de éstos para proporcionar el perfil de liberación deseado en proporciones variadas. Las formulaciones de liberación controlada adecuadas conocidas para los expertos en la técnica, incluyendo las descritas en la presente memoria, pueden seleccionarse fácilmente para uso con los ingredientes activos proporcionados en la presente memoria. Así, en algunas realizaciones, en la presente memoria se proporcionan formas de dosificación unitarias únicas adecuadas para administración oral tal como, pero no limitado a, comprimidos, cápsulas, perlas de gel, y comprimidos oblongos que se adaptan para liberación controlada.

Todos los productos farmacéuticos de liberación controlada tienen un objetivo común de mejorar la terapia con fármaco sobre la conseguida por sus equivalentes no controlados. Idealmente, el uso de una preparación de liberación controlada diseñada de forma óptima en el tratamiento médico se caracteriza porque se emplea un mínimo de sustancia farmacéutica para curar o controlar la afección en una cantidad de tiempo mínima. Las ventajas de las formulaciones de liberación controlada incluyen actividad prolongada del fármaco, frecuencia de dosificación reducida, y seguimiento por el paciente incrementado. Además, las formulaciones de liberación controlada pueden usarse para afectar el momento del inicio de la acción u otras características, tal como niveles sanguíneos del fármaco, y pueden así afectar la aparición de efectos secundarios (por ejemplo, adversos).

La mayor parte de las formulaciones de liberación controlada se diseñan para liberar inicialmente una cantidad del fármaco (ingrediente activo) que produce rápidamente el efecto terapéutico deseado, y gradualmente y continuamente liberan otras cantidades de fármaco para mantener este nivel de efecto terapéutico o profiláctico durante un periodo de tiempo prolongado. Con el fin de mantener este nivel constante de fármaco en el cuerpo, el fármaco debe liberarse de la forma de dosificación a una velocidad que reemplazará la cantidad de fármaco que se está metabolizando y excretando del cuerpo. La liberación controlada de un ingrediente activo puede estimularse por varias condiciones incluyendo, pero no limitado a, pH, temperatura, enzimas, agua, u otras condiciones fisiológicas o compuestos.

5.4.3. Formas de dosificación parenterales

Las formas de dosificación parenterales pueden administrarse a pacientes por varias rutas incluyendo, pero no limitado a, subcutánea, intravenosa (incluyendo inyección en bolo), intramuscular, e intraarterial. Como su administración sobrepasa típicamente las defensas naturales de los pacientes frente a contaminantes, las formas de dosificación parenterales son preferiblemente estériles o capaces de ser esterilizadas antes de la administración a un paciente. Los ejemplos no limitantes de formas de dosificación parenterales incluyen disoluciones listas para inyección, productos secos listos para ser disueltos o suspendidos en un vehículo farmacéuticamente aceptable para inyección, suspensiones listas para inyección, y emulsiones.

Los vehículos adecuados que pueden usarse para proporcionar formas de dosificación parenterales son muy conocidos para los expertos en la técnica. Los ejemplos no limitantes de vehículos adecuados incluyen Agua para Inyección USP; vehículos acuosos tales como, pero no limitado a, Inyección de Cloruro de Sodio, Inyección de Ringer, Inyección de Dextrosa, Inyección de Dextrosa y Cloruro de Sodio, e Inyección de Ringer Lactato; vehículos miscibles en agua tal como, pero no limitado a, etil alcohol, polietilen glicol, y polipropilen glicol; y vehículos no acuosos tal como, pero no limitado a, aceite de maíz, aceite de semilla de algodón, aceite de cacahuete, aceite de sésamo, oleato de etilo, miristato de isopropilo, y benzoato de bencilo.

Los compuestos que incrementan la solubilidad de uno o más de los ingredientes activos descritos en la presente memoria también pueden incorporarse en las formas de dosificación parenterales proporcionadas en la presente memoria. Por ejemplo, pueden usarse ciclodextrina y sus derivados para incrementar la solubilidad de (*S*)-*N*-(2-(1-(3-etoxi-4-metoxifenil)-2-(metilsulfonil)etil)-1,3-dioxoisoindolin-4-il)acetamida y sus derivados.

5.4.4. Formas de dosificación tópicas y mucosales

Los fármacos pueden aplicarse localmente en la piel y su anexo o en una variedad de membranas mucosas. Las rutas que pueden usarse incluyen nasal, sublingual, vaginal, cística, rectal, prepucial, ocular, bucal o aural. Se han desarrollado muchas formas de dosificación para administrar principios activos en el sitio de la aplicación para producir efectos locales. Los ejemplos no limitantes de formas de dosificación tópicas y mucosales proporcionadas en la presente memoria incluyen pulverizaciones, inhaladores, aerosoles, pomadas, cremas, geles, pastas, polvos en partículas, lociones, linimentos, emplastos, disoluciones, emulsiones, suspensiones, gotas oculares u otras preparaciones oftálmicas u otras formas conocidas para un experto en la técnica. Véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 20ª ed., Mack Publishing, Easton PA (2000). e Introduction to Pharmaceutical Dosage Forms, 4ª ed., Lea y Febiger, Filadelfia (1985). Las formas de dosificación adecuadas para tratar tejidos mucosales en la cavidad oral pueden formularse como lavados bucales o como geles orales.

Los excipientes adecuados (por ejemplo, vehículos y diluyentes) y otros materiales que pueden usarse para proporcionar formas de dosificación tópicas y mucosales son muy conocidos para los expertos en la técnica farmacéutica, y dependen del tejido particular en el que se aplicará una composición farmacéutica o forma de dosificación dada. Los ejemplos no limitantes de excipientes típicos incluyen, agua, acetona, etanol, etilen glicol, propilen glicol, butano-1,3.diol, miristato de isopropilo, palmitato de isopropilo, aceite mineral, y mezclas de éstos para formar disoluciones, emulsiones o geles, que no son tóxicos y son farmacéuticamente aceptables.

Los hidratantes tales como oclusivos, humectantes, emolientes y rejuvenecedores proteicos también pueden añadirse a composiciones farmacéuticas y formas de dosificación si se desea. Los ejemplos de dichos ingredientes adicionales son muy conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 20ª ed., Mack Publishing, Easton PA (2000).

Los oclusivos son sustancias que bloquean físicamente la pérdida de agua en el estrato córneo. Los ejemplos no limitantes de oclusivos incluyen petrolato, lanolina, aceite mineral, siliconas tal como dimeticona, óxido de cinc y combinaciones de éstos. Preferiblemente, los oclusivos son petrolato y lanolina, más preferiblemente petrolato en una concentración mínima de 5%.

Los humectantes son sustancias que atraen el agua cuando se aplican en la piel y teóricamente mejoran la hidratación del estrato córneo. Sin embargo, el agua que se vierte en la piel es agua de otras células, no agua atmosférica. Con este tipo de hidratante, la evaporación de la piel puede continuar y realmente puede hacer que empeore la sequedad. Los ejemplos no limitantes de humectantes incluyen glicerina, sorbitol, urea, alfa hidroxi ácidos, azúcares y combinaciones de éstos. Preferiblemente, los humectantes son alfa hidroxi ácidos, tales como ácido glicólico, ácido láctico, ácido málico, ácido cítrico y ácido tartárico.

Los emolientes son sustancias que suavizan la piel rellenando los espacios entre escamas de la piel con gotitas de aceite, y habitualmente no son oclusivos a no ser que se apliquen abundantemente. Cuando se combinan con un emulsionante, pueden ayudar a mantener aceite y agua en el estrato córneo. La vitamina E es un aditivo común, que parece no tener efecto, excepto como un emoliente. Asimismo, otras vitaminas, por ejemplo, A y D, también se añaden, pero su efecto es cuestionable. Los ejemplos no limitantes de emolientes incluyen aceite mineral, lanolina, ácidos grasos, colesterol, escualeno, lípidos estructurales y combinaciones de éstos.

Los rejuvenecedores proteicos son sustancias que rejuvenecen la piel reponiendo proteínas esenciales. Los ejemplos no limitantes de rejuvenecedores proteicos incluyen colágeno, queratina, elastina y combinaciones de éstos.

El pH de una composición farmacéutica o forma de dosificación también puede ajustarse para mejorar la administración de uno o más ingredientes activos. De forma similar, la polaridad de un vehículo disolvente, su fuerza iónica, o tonicidad pueden ajustarse para mejorar la administración. Por ejemplo, la absorción a través de la piel también puede aumentarse por vendajes oclusivos, unción o el uso de dimetilsulfóxido como un vehículo. Los compuestos tales como estearatos metálicos (por ejemplo, estearato de calcio, estearato de cinc, estearato de magnesio, estearato de sodio, estearato de litio, estearato de potasio, etc,) también pueden añadirse a composiciones farmacéuticas o formas de dosificación para alterar ventajosamente la hidrofilicidad o lipofilicidad de uno o más ingredientes activos de manera que se mejora la administración. A este respecto, los estearatos pueden servir como un vehículo lipídico para la formulación, como un agente emulsionante o tensioactivo, y como un agente que potencia la administración o potencia la penetración. Pueden usarse diferentes sales, hidratos o solvatos de los ingredientes activos para ajustar adicionalmente las propiedades de la composición resultante.

En determinadas realizaciones, uno o ambos de los agentes activos como se proporciona en la presente memoria se administran parenteralmente, transdérmicamente, mucosalmente, nasalmente, bucalmente, sublingualmente, tópicamente, u oralmente. En determinadas realizaciones, el primer agente activo se administra oralmente en una forma de comprimido o cápsula. En determinadas realizaciones, uno o más de los agentes activos se administran tópicamente (por ejemplo, en la forma de dosificación de una loción o un líquido).

5.4.5 Kits

Los ingredientes activos no se administran frecuentemente a un paciente al mismo tiempo o por la misma ruta de administración. En la presente memoria también se describen kits que, cuando se usan por el médico responsable, pueden simplificar la administración de cantidades apropiadas de los ingredientes activos a un paciente.

Un kit típico comprende una forma de dosificación unitaria del Compuesto A o una sal, solvato, hidrato farmacéuticamente aceptable de éste y una forma de dosificación unitaria de un segundo ingrediente activo, ciclosporina A.

Los kits pueden comprender además dispositivos que se usan para administrar el o los ingredientes activos. Los ejemplos de dichos dispositivos incluyen, pero no están limitados a, jeringas, bolsas de goteo, parches, e inhaladores.

Los kits pueden comprender además vehículos farmacéuticamente aceptables que pueden usarse para administrar uno o más ingredientes activos. Por ejemplo, si un ingrediente activo se proporciona en una forma sólida que debe reconstituirse para administración parenteral, el kit puede comprender un contenedor sellado de un vehículo adecuado en el que puede disolverse el ingrediente activo para formar una disolución estéril sin partículas que es adecuada para administración parenteral. Los ejemplos de vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no están limitados a: Agua para Inyección USP; vehículos acuosos tales como, pero no limitado a, Inyección de Cloruro de Sodio, Inyección de Ringer, Inyección de Dextrosa, Inyección de Dextrosa y Cloruro de Sodio, e Inyección de Ringer Lactato; vehículos miscibles en agua tal como, pero no limitado a, etil alcohol, polietilen glicol, y polipropilen glicol; y vehículos no acuosos tal como, pero no limitado a, aceite de maíz, aceite de semilla de algodón, aceite de cacahuete, aceite de sésamo, oleato de etilo, miristato de isopropilo, y benzoato de bencilo.

6. Ejemplos

Algunas realizaciones proporcionadas en la presente memoria se ilustran por los ejemplos no limitantes siguientes. Los ejemplos no deben considerarse como una limitación en el alcance de éstos.

6.1. Ejemplo 1: Síntesis de 2-[1-(3-etoxi-4-metoxifenil)-2-metilsulfoniletil]-4-acetilaminoisoindolina-1,3-diona

Una disolución agitada de 1-(3-etoxi-4-metoxifenil)-metilsulfoniletilamina (1,0 g, 3,7 mmoles) y anhídrido 3-acetamidoftálico (751 mg, 3,66 mmoles) en ácido acético (20 mL) se calentó a reflujo durante 15 h. El disolvente se eliminó *in vacuo* para rendir un aceite. La cromatografía del aceite resultante rindió el producto como un sólido amarillo (1,0 g, 59% de rendimiento): pf, 144°C.; ^{1}H RMN ($CDCl_3$) δ1,47 (t, J=7,0 Hz, 311, CH_3), 2,26 (s, 3H, CH_3), 2,88 (s,3H, CH_3), 3,75 (dd, J=4,4, 14,3 Hz, 1H, CHH), 3,85 (s, 3H, CH3), 4,11 (q, J= 7 Hz, 2H, CH2), 5,87 (dd, J=4,3, 10,5 Hz, 1H, NCH), 6,82-6,86 (m, 1H, Ar), 7,09-7,11 (m, 2H, Ar), 7,47 (d, J= 7 Hz, 1H,, Ar), 7,64 (t, J= 8 Hz, 1H, Ar), 8,74 (d, J= 8 Hz, 1H, Ar), 9,49 (br s, 1H, NH); ^{13}C RMN ($CDCl_3$) δ14,61, 24,85, 41,54, 48,44, 54,34, 55,85, 64,43, 111,37, 112,34, 115,04, 118,11, 120,21, 124,85, 129,17, 130,96, 136,01, 137,52, 148,54, 149,65, 167,38, 169,09, 169,40; Anal Calc'd. para $C_{22}H_{24}NO_7S$: C, 57,38; H, 5,25; N, 6,08. Encontrado: C, 57,31; H, 5,34; N, 5,83.

6.2. Ejemplo 2: Preparación de (+)-2-[1-(3-Etoxi-4-metoxifenil)-2-metilsulfoniletil]-4-acetilaminoisoindolina-1,3-diona ("Compuesto A")

6.2.1. Preparación de ácido 3-aminoftálico.

Una mezcla de 10% Pd/C (2,5 g), ácido 3-nitroftálico (75,0 g, 355 mmoles) y etanol (1,5 L) se cargó en un hidrogenador Parr de 2,5 L, bajo una atmósfera de nitrógeno. Se cargó hidrógeno en el recipiente de reacción hasta 55 psi. La mezcla se agitó durante 13 horas, manteniendo la presión de hidrógeno entre 50 y 55 psi. El hidrógeno se liberó y la mezcla se purgó con nitrógeno 3 veces. La suspensión se filtró a través de un lecho de celite y se lavó con metanol. El filtrado se concentró *in vacuo.* El sólido resultante se volvió a resuspender en éter y se aisló por filtración con vacío. El sólido se secó en *in vacuo* hasta un peso constante, rindiendo 54 g (84% de rendimiento) de ácido 3-aminoftálico como un producto amarillo. ^{1}H-RMN (DMSO-d6) δ: 3,17 (s, 2H), 6,67 (d, 1H), 6,82 (d, 1H), 7,17 (t, 1H), 8-10 (brs, 2H). ^{13}C-RMN (DMSO-d6)δ: 112,00, 115,32, 118,20, 131,28, 135,86, 148,82, 169,15, 170,09.

6.2.2. Preparación de anhídrido 3-acetamidoftálico.

Un matraz con 3 bocas de fondo redondo de 1 L se equipó con un agitador mecánico, termómetro, y condensador y se cargó con ácido 3-aminoftálico (108 g, 596 mmoles) y anhídrido acético (550 mL). La mezcla de reacción se calentó a reflujo durante 3 horas y se enfrió hasta temperatura ambiente y adicionalmente hasta 0-5°C durante 1 horas más. El sólido cristalino se recogió por filtración con vacío y se lavó con éter. El producto sólido se secó *in vacuo* a temperatura ambiente hasta un peso constante, proporcionando 75 g (61% de rendimiento) de anhídrido 3-acetamidoftálico como un producto blanco. ^{1}H-RMN ($CDCl_3$) δ: 2,21 (s, 3H), 7,76 (d, 1H), 7,94 (t, 1H), 8,42 (d, 1H), 9,84 (s, 1H).

6.2.3. Resolución de 2-(3-etoxi-4-metoxifenil)-1-(metilsulfonil)-et-2-ilamina.

Un matraz con 3 bocas de fondo redondo de 3 L se equipó con un agitador mecánico, termómetro, y condensador y se cargó con 2-(3-etoxi-4-metoxifenil)-1-(metilsulfonil)-et-2-ilamina (137,0 g, 500 mmoles), N-acetil-L-leucina (52 g, 300 mmoles), y metanol (1,0 L). La suspensión de sólidos agitada se calentó a reflujo durante 1 hora. La mezcla agitada se dejó enfriar hasta temperatura ambiente y la agitación se continuó durante 3 horas más a temperatura ambiente. La suspensión de sólidos se filtró y se lavó con metanol (250 L). El sólido se secó al aire y después se secó *in vacuo* a temperatura ambiente hasta un peso constante, proporcionando 109,5 g (98% de rendimiento) del producto crudo (85,8% ee). El sólido crudo (55,0 g) y metanol (440 mL) se llevaron a reflujo durante 1 hora, se enfriaron hasta temperatura ambiente y se agitaron durante 3 horas adicionales a temperatura ambiente. La suspensión de sólidos se filtró y la torta del filtro se lavó con metanol (200 mL). El sólido se secó al aire y después se secó *in vacuo* a 30°C hasta un peso constante, rindiendo 49,6 g (90% de recuperación) de sal de N-acetil-L-leucina de (S)-2-(3-etoxi-4-metoxifenil)-1-(metilsulfonil)-et-2-ilamina (98,4% ee). HPLC quiral (1/99 EtOH/20 mM KH_2PO_4 a pH 7,0, Ultron Quiral ES-OVS de Agilent Technologies, 150mm x 4,6 mm, 0,5 mL/min., a 240 nm): 18,4 min (isómero S, 99,2%), 25,5 min (isómero R, 0,8%).

6.2.4. Preparación de (+)-2-[1-(3-Etoxi-4-metoxifenil)-2-metilsulfoniletil]-4-acetilaminoisoindolina-1,3-diona.

Un matraz con 3 bocas de fondo redondo de 500 mL se equipó con un agitador mecánico, termómetro, y condensador. El recipiente de reacción se cargó con sal de N-acetil-L-leucina de (S)-2-(3-etoxi-4-metoxifenil)-1-(metilsulfonil)-et-2-il amina (25 g, 56 mmoles, 98% ee), anhídrido 3-acetamidoftálico (12,1 g 58,8 mmoles), y ácido acético glacial (250 mL). La mezcla se puso a reflujo toda la noche y después se enfrió hasta < 50°C. El disolvente se eliminó *in vacuo,* y el residuo se disolvió en acetato de etilo. La disolución resultante se lavó con agua (250 mL x 2), $NaHCO_3$ acuoso saturado (250 mL x 2), salmuera (250 mL x 2), y se secó sobre sulfato de sodio. El disolvente se evaporó *in vacuo,* y el residuo se recristalizó de un disolvente binario que contenía etanol (150 mL) y acetona (75 mL). El sólido se aisló por filtración con vacío y se lavó con etanol (100 mL x 2). El producto se secó *in vacuo* a 60°C hasta un peso constante, rindiendo 19,4 g (75% de rendimiento) de (*S*)-{2-[1-(3-etoxi-4-metoxifenil)-2-

metilsulfoniletil]-4-inoisoindolina-1,3-diona con 98% ee. HPLC quiral (15/85 EtOH/20 mM KH_2PO_4 a pH .5, Ultron Quiral ES-OVS de Agilent Technology, 150 mm x 4,6 mm, 0,4 mL/min., a 240 nm): 25,4 min (isómero S, 98,7%), 29,5 min (isómero R, 1,2%). ^{1}H-RMN ($CDCl_3$) δ:1,47 (t, 3H), 2,26 (s, 3H), 2,87 (s, 3H), 3,68-3,75 (dd, 1H), 3,85 (s, 3H), 4,07-4,15 (q, 2H), 4,51-4,61 (dd, 1H), 5,84-5,90 (dd, 1H), 6,82-8,77 (m, 6H), 9,46 (s, 1H). ^{13}C-RMN (DMSO-d6) δ: 14,66, 24,92, 41,61, 48,53, 54,46, 55,91, 64,51, 111,44, 112,40, 115,10,118,20, 120,28, 124,94, 129,22, 131,02, 136,09, 137,60, 148,62,149,74, 167,46, 169,14, 169,48.

Las formas cristalinas específicas del Compuesto A pueden prepararse según la Patente U.S. No. 7.893.101.

6.3. Ejemplo 3: Evaluación de la actividad anti-artrítica en el modelo artritogénico murino experimental inducido por mAB/LPS

La actividad anti-artrítica de (+)-2-[1-(3-etoxi-4-metoxifenil)-2-metilsulfoniletil]-4-acetilaminoisoindolina-1,3-diona ("isómero (+)"; Compuesto A) se evaluó en el modelo artritogénico murino experimental inducido por mAB/LPS. Se administró a los ratones 1, 5 y 25 mg/kg una vez al día por sonda oral (PO) a lo largo de cinco días de tratamiento sucesivos. Los grupos de tratamiento comprendieron *n=8* ratones macho BALB/c por grupo. Se trataron dos grupos con igual tamaño bien con dexametasona (1 mg/kg) o una suspensión de 0,5% CMC/0,25% Tween 80, sirvieron como Controles Positivo o de Vehículo, respectivamente.

La artritis experimental se indujo inicialmente en el Día 0 del estudio por inyección intravenosa (IV) de una mezcla de 4 anticuerpos monoclonales (mAB) a una dosis de 100 mg/kg, seguido de aproximadamente 72 horas después de la inyección intraperitoneal (IP) de LPS 2,5 mg/kg.

El grosor de las patas se determinó con un calibrador digital electrónico en seis ocasiones (Día 0, 4, 5, 6, 7 y 9) y se presenta como valores de grupo medios del promedio tanto para las patas posteriores izquierda y derecha. El resultado se muestra en la Figura **1.** Los datos indicaron claramente supresión altamente significativa estadísticamente ($p<0,01$ frente al Control de Vehículo) y constante de hinchazón de las patas en la dosis más alta (25 mg/kg) del grupo de tratamiento con el Compuesto A, igualando la del grupo de Control Positivo de Dexametasona. Un grado menor ($p<0,05$ frente a Control de Vehículo) se reveló en los animales a los que se administró 5 mg/kg de isómero (+) (dosis intermedia), pero se limitó a la ocasión de medida del Día 9.

En este estudio, el Compuesto A, administrado oralmente a una dosis de una vez al día de 25 mg/kg durante cinco días sucesivos, demostró una actividad anti-artrítica potencial comparable, evidente a partir de la reducción estadísticamente significativa del hinchazón de las patas como se consigue con dexametasona (1 mg/kg) aplicada por un régimen de dosificación idéntico.

6.3.1. Evaluación histopatológica

Para determinar la actividad anti-artrítica potencial de (+)-2-[1-(3-etoxi-4-metoxifenil)-2-metilsulfoniletil]-4-acetilaminoisoindolina-1,3-diona ("isómero (+)"; Compuesto A), se ensayaron 16 animales en total con Control de Vehículo ó 25 mg/kg de isómero (+) para evaluación histopatológica. Se fijaron las extremidades posteriores izquierdas en 10% formalina tamponada neutra durante 1 semana, después se transfirieron en ácido inorgánico tamponado (proceso de descalcificación durante aproximadamente 48 horas) y de nuevo en 10% formalina antes del almacenamiento. Cada extremidad desde la mitad de la tibia y distalmente, para incluir la articulación del tobillo, es decir, la articulación entre la pierna y el pie (articulación tibial-tarso), se cortó longitudinalmente a la mitad, y ambas mitades se incluyeron en parafina y las partes de 6 micrómetros de grosor se cortaron y se tiñeron con hematoxilina y eosina. Los cambios histopatológicos en las articulaciones se describieron y puntuaron, usando una gradación semicuantitativa de cinco grados (0 - 4), teniendo en consideración la gravedad de los cambios (0 = ordinario, 1 = mínimo, 2 = ligero, 3 = moderado, 4 = marcado). Los descubrimientos individuales se presentan en la Tabla 1. Los resultados indican la inducción exitosa del modelo de artritis, consiguiendo el grado 3 (moderado) de gravedad. Se observaron todos los intervalos típicos de cambios observados de forma característica en esta artritis. Todas las muestras de los animales tratados con el Compuesto A de ensayo no tenían prácticamente artritis existente, indicando una capacidad muy potente para inhibir el desarrollo de artritis.

Tabla 1: Características histopatológicas observadas en la articulación tibiotarsal de ratones artríticos tratados con vehículo (control) o Compuesto A

	Control								Compuesto A							
No. de Animal/ Histopatología	1	2	3	4	5	6	7	8	25	26	27	28	29	30	31	32
Hiperplasia sinovial	1	2	1	2	2	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0

	Control								Compuesto A							
Formación de vellosidad sinovial	1	2	1	2	2	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
Deposición de fibrina	2	3	3	3	3	2	3	3	0	0	0	0	0	1	0	1
Infiltración inflamatoria en la membrana sinovial	3	3	3	3	3	3	3	3	0	0	0	0	0	0	0	0
Formación de pannus (reflejada por la proliferación de tejido de granulación)	3	3	3	3	3	3	3	3	0	0	0	0	0	0	0	0
Disrupción de cartílago	2	2	2	2	2	2	2	3	0	0	0	0	0	0	0	0
Destrucción de cartílago hialino (reflejada por resorción/erosión en el cartílago)	2	2	2	2	2	2	3	3	0	0	0	0	0	0	0	0
Destrucción de hueso subcondral (reflejado por resorción/erosión por osteoclastos y pérdida de hueso)	3	3	2	3	2	2	2	3	0	0	0	0	0	0	0	0
Evaluación global: "determinado como artritis"	3	3	3	3	3	3	3	3	0	0	0	0	0	0	0	0

6.3.2. Artritis inducida por anticuerpos en ratones

La actividad anti-artrítica potencial se evaluó en el modelo artritogénico murino experimental inducido por mAb/LPS para (+)-2-[1-(3-etoxi-4-metoxifenil)-2-metilsulfoniletil]-4-acetilaminoisoindolina-1,3-diona ("isómero (+)"; Compuesto A), administrado a 5 y 25 mg/kg una vez al día por administraciones orales repetidas durante 11 días de tratamiento sucesivos. Los grupos tratados con el ítem de ensayo comprendieron *n=8* ratones macho BALB/c por grupo. Además, cuatro grupos de igual tamaño tratados bien con Enbrel (5 ó 6,25 mg/kg, Control Positivo), una suspensión de 0,5% CMC/0,25% Tween 80 (5 ml/kg, Control de Vehículo), o con una combinación de Enbrel y Compuesto A (cada uno 5 mg/kg, grupo Control Positivo-Ítem de Ensayo).

La artritis experimental se indujo inicialmente en el Día 0 del estudio por una única inyección intravenosa de una mezcla de 4 anticuerpos monoclonales (mAb) a un nivel de dosis de 100 mg/kg, seguido de aproximadamente 72 horas después de una única inyección intraperitoneal (IP) de LPS 2,5 mg/kg.

No se observaron reacciones adversas relacionadas con el tratamiento obvias entre todos los animales tratados con el Compuesto A a lo largo del periodo de observación completo de 14 días, excluyendo las reacciones típicas a inyección de LPS, caracterizadas por piloerección, disminución en la actividad motora espontánea y ligera diarrea.

El grosor de las patas posteriores se determinó con un calibrador digital electrónico en ocho ocasiones (en los Días 0, 4, 5, 6, 7, 9, 11 y 14) y se presenta como valores de grupo medios del promedio tanto para las patas posteriores izquierda y derecha. El resultado se muestra en la Figura 2. Los datos indicaron claramente una disminución altamente significativa ($P<0,01$ frente a Control de Vehículo) en los animales sometidos a administraciones repetidas de 5 ó 25 mg/kg de Compuesto A, igualando la de los animales tratados con Controles Positivos (5 ó 6,25 mg/kg Enbrel) o el tratamiento combinado Enbrel-Compuesto A en los días de estudio 5, 7, 9, 11 y 14.

El valor de puntuación artritogénica media del grupo de ambas patas posteriores (valor promedio de izquierda y derecha/animal) en los animales sometidos a la combinación de Enbrel-Compuesto A y en aquellos sometidos a

6,25 mg/kg de Enbrel fue altamente a extremadamente estadísticamente menor (p<0,01 y p<0,001, respectivamente) que la de aquellos registrados en el grupo de Control de Vehículo en los días de estudio 7, 9, 11 y 14. Además, en los animales sometidos a 25 mg/kg de Compuesto A, se revelaron reducciones estadísticamente a extremadamente significativas (p<0,05, p<0,01, p<0,001) frente al grupo de Control de Vehículo en los Días 9, 11 y 14, respectivamente.

El porcentaje de cambio de grupo medio en el grosor de las patas posteriores frente al inicio de la inducción de artritis (empleado en el Día 0 del estudio) se encontró que era altamente significativamente menor (P<0,01) en los animales sometidos a administraciones repetidas de 5 ó 25 mg/kg de isómero (+), 5 ó 6,25 mg/kg de Enbrel o en el grupo con tratamiento combinado con Enbrel-Compuesto A, comparado con el grupo de Control de Vehículo a lo largo del periodo de hinchazón completo en los Días 7, 9, 11, y 14.

En este estudio, el Compuesto A, administrado oralmente a una dosis de una vez al día de 5 y 25 mg/kg durante 11 días de tratamiento sucesivos, reveló una actividad anti-artrítica potencial comparable, evidente a partir de la reducción estadísticamente significativa del hinchazón de las patas como se consigue con Enbrel tanto a 5 ó 6,25 mg/kg aplicada por un régimen de dosificación idéntico.

6.4. Ejemplo 4: Actividad anti-inflamatoria de Compuesto A frente a células T in vitro y en el modelo en ratón de artritis inducida por anticuerpo colágeno y en combinación

La actividad anti-inflamatoria del Compuesto A en células T se midió solo y en combinación con otros agentes anti-reumáticos incluyendo etanercept (ETN), ciclosporina A (CsA), y metotrexato (MTX). El Compuesto A se ensayó solo y en combinación en el modelo en ratón de artritis inducida por colágeno anticuerpo (CAIA).

6.4.1. Métodos

Se aislaron células T totales de sangre periférica humana de donantes sanos (n = 5) por selección negativa en lechos magnéticos y se estimularon a 1,25 x. 10e6 células/mL con anticuerpo anti-CD3 durante 2 días. Los niveles de proteína citoquina y quimioquina se analizaron por matriz de lecho citométrico en un Luminex 100. Modelo CAIA: Se inyectó intravenosamente a ratones macho BALB/c (n = 10 por grupo) una mezcla de 4 anticuerpos monoclonales a una dosis de 100 mg/kg, y 3 días después se les inyectó intraperitonealmente (IP) LPS a 2,5 mg/kg. El Compuesto A y ETN se administraron una vez al día en los días 3-13. El Compuesto A se dosificó oralmente como una suspensión de 1, 5, ó 25 mg/kg cd. ETN se inyectó IP a 5 ó 6,25 mg/kg. Ambas patas posteriores (izquierda y derecha) de cada animal se examinaron para signos de respuestas artritogénicas de forma ciega. Las reacciones artríticas se puntuaron y registraron según una escala de 0-4 en orden ascendente de gravedad. El grosor de las patas posteriores se midió en mm usando un Calibrador Digital Electrónico Mitutoyo. Ambas patas posteriores se diseccionaron libres justo por encima del tobillo, se fijaron en 10% formalina tamponada neutra, y se analizaron para histopatología.

6.4.2. Resultados

El Compuesto A inhibió la producción de todas las citoquinas y quimioquinas de células T medidas (IL-2, IL-4, IL-13, IFN-γ, TNF-α, CXCL10, CCL3, y CCL4) con concentraciones inhibidoras del 50% (CI_{50}) de 15-360 ng/mL. CsA también inhibió todos los analitos, con CI_{50} de 4,7-140 ng/mL. Por el contrario, ETN inhibió potentemente TNF-α (CI_{50} = 1,5 ng/mL), y en menor medida IL-13 e IP-10 (16-62 ng/mL), pero las CI_{50} para todos los demás analitos fueron >1.600 ng/mL. Las CI_{50} de MTX fueron todas >1.600 ng/mL. Se observó inhibición sinérgica para las combinaciones de Compuesto A + ETN y Compuesto A + CsA. En el modelo de CAIA, las puntuaciones de reacción artrítica y grosores de las patas posteriores se redujeron significativamente (p<0,01) con el Compuesto A a 5 y 25 mg/kg, y con ETN a ambas dosis ensayadas. A la dosis alta, el Compuesto A inhibió la hiperplasia sinovial, formación de vellosidad sinovial, deposición de fibrina, infiltración inflamatoria en la membrana sinovial, formación de pannus, disrupción de cartílago, y destrucción de hueso subcondral (reflejado por resorción/erosión por osteoclastos y pérdida de hueso). La combinación de Compuesto A + etanercept a 5 mg/kg cada uno fue aditiva a sinérgica en el modelo de artritis.

El tratamiento de células T humanas con Compuesto A resultó en la inhibición de IL-2, IL-4, IL-13, IFN-γ, TNF-α, CXCL10, CCL3, y CCL4. En combinación con ETN o CsA, el Compuesto A inhibió sinérgicamente varias de las citoquinas y quimioquinas. En el modelo CAIA, el Compuesto A redujo la hinchazón de las patas y las puntuaciones de reacción artrítica, y a 25 mg/kg no tenían prácticamente artritis existente por análisis histopatológico. El Compuesto A y etanercept se combinaron favorablemente en este modelo de artritis.

6.5 Ejemplo de referencia 5: Preparación de {2-[(*1S*)-1-(3-etoxi-4-metoxi-fenil)-2-metano-sulfonil-etil]-3-oxo-2,3-dihidro-1 *H*-isoindol-4-il}-amida del ácido ciclopropanocarboxílico ("Compuesto B")

6.5.1. Preparación de 2-metil-6-nitrobenzoato de metilo

Una mezcla de ácido 2-metil-6-nitrobenzoico (300,0 g, 1,66 moles, de Acros Organics, Morris Plains, NJ) y ortoacetato de trimetilo (298,3 g, 2,48 moles, de Aldrich Chemicals, Milwaukee, WI) se cargó en un matraz de 3 bocas de 3 L a aproximadamente 20-25°C bajo nitrógeno. La mezcla de reacción se calentó gradualmente y los

componentes de bajo punto de ebullición generados durante la reacción se retiraron por destilación a una temperatura interna de 95-100°C. Después de 2 horas, la mezcla de reacción se enfrió hasta 20-25°C durante 1-2 horas. Después, se cargó heptano (1,50 L, de Aldrich Chemicals) en la mezcla de reacción durante 1,0-1,5 horas, la mezcla de reacción se sembró con 2-metil-6-nitrobenzoato de metilo (0,5 g) cuando se volvió turbia. La suspensión se enfrió hasta 0-5°C durante 0,5-1 hora y se mantuvo a 0-5°C durante otras 1,5-2 horas. El sólido se recogió por filtración en vacío, se lavó con heptano (3x300 mL), y se secó hasta un peso constante en una bandeja a 30-35°C bajo un vacío a 100-120 torr. El rendimiento de 2-metil-6-nitrobenzoato de metilo fue 292,0 g (91%), sobre la base de 300,0 g de ácido 2-metil-6-nitrobenzoico. Se encontró que el producto tenía una pureza de >99% medida por HPLC sobre la base de porcentaje de área, y un contenido de agua de <0,1 % medido por titulación de Karl Fisher.

6.5.2. Preparación de 2-bromometil-6-nitrobenzoato de metilo

Una mezcla de 2-metil-6-nitrobenzoato de metilo (200,0 g, 1,02 moles, preparado previamente), 1,3-dibromo-5,5-dimetilhdantoína (DBH, 162,0 g, 0,57 moles, de Aldrich Chemicals) y acetato de metilo (1,20 L, de Aldrich Chemicals) se cargó en un matraz de tres bocas de 3 L a aproximadamente 20-25°C bajo nitrógeno. Después, de que la mezcla de reacción se sometiera a reflujo durante 0,5-1 hora, se cargó una disolución de 2,2'-azobisisobutironitrilo (AIBN, 8,6 g, 52 mmoles, de Aldrich Chemicals) en 100 mL de acetato de metilo durante 15-30 minutos. La mezcla de reacción se sometió a reflujo durante 6,5-8 horas hasta que la cantidad de 2-metil-6-nitrobenzoato que no había reaccionado fue menor del 5-10%. La mezcla de reacción se enfrió hasta 15-18°C y se mantuvo a 15-18°C durante 50-60 minutos. El sólido se filtró, se lavó con acetato de metilo (2x100 mL) frío (es decir, 5-10°C) hasta que hubo menos del 3% de 2-bromometil-6-nitrobenzoato de metilo remanente en el sólido. A continuación, después de cargar heptano (1,00 L) en el filtrado, la capa superior de fase orgánica se lavó con 2% de salmuera (2x500 mL) y agua desionizada (1-2 x 500 mL) hasta que hubo menos del 0,5% (porcentaje de área a 210 nm) de 5,5-dimetilhidantoína que no había reaccionado según medida por HPLC. Después de que la disolución se concentrara bajo presión reducida para eliminar aproximadamente 1,80-1,90 L de acetato de metilo, se cargó metil terc-butil éter (MTBE, 300 mL). Después de que la mezcla de reacción se sometiera a reflujo a 65-70°C durante 10-15 minutos, la disolución se enfrió hasta 50-55°C durante 0,5-1 hora y se sembró con 500 mg de 2-bromometil-6-nitrobenzoato de metilo a 45-50°C. La suspensión se enfrió hasta 20-25°C y se mantuvo a 20-25°C durante 2-3 horas. Los sólidos se recogieron por filtración, se lavaron con una mezcla fría a 5-10°C de heptano y MTBE en una relación de volumen de 1:2 (2x100 mL), y se secaron hasta un peso constante a 20-25°C bajo un vacío de 100-120 torr. El rendimiento de 2-bromometil-6-nitrobenzoato de metilo fue 185,2 g (66%), sobre la base de una introducción de 200,0 g de 2-metil-6-nitrobenzoato de metilo. Se encontró que el producto tenía una pureza de >98% medida por HPLC sobre la base de porcentaje de área, y un contenido de agua de <0,1 % medido por titulación de Karl Fisher.

6.5.3. Preparación de (1S)-1-(3-etoxi-4-metoxifenil)-2-metanosulfonil-etilamina

Después de que se cargara una mezcla de sal de N-acetil-L-Leucina de (1S)-1-(3-etoxi-4-metoxifenil)-2-metanosulfonil-etilamina (1,10 kg, 2,46 moles), agua desionizada (4,40 L), y diclorometano (DCM, 5,50 L) en un recipiente de reacción, se cargó una disolución de hidróxido de sodio (196,0 g, 4,90 moles) en 1,00 L de agua desionizada en el recipiente de reacción durante aproximadamente 5 minutos a 15-25°C. La mezcla resultante se agitó durante al menos 10 minutos a 15-25°C y se dejó que las fases acuosa y orgánica se separaran. El pH de la fase acuosa superior se mantuvo o ajustó a pH 13-14. Las fases se separaron y la fase acuosa superior se extrajo con DCM (2x4,4 L). El pH de la fase acuosa se mantuvo a pH 13-14 a lo largo de las extracciones. Los extractos de DCM se combinaron y se lavaron con agua desionizada (3,3 L) hasta que el pH de la fase acuosa alcanzó 11 o menos. El DCM se eliminó bajo vacío por debajo de 35°C. El contenido de agua del sólido residual debe ser <0,1% p/p según se mide por titulación de Karl Fisher. El sólido residual se secó azeotrópicamente con más DCM. El sólido se secó hasta un peso constante *in vacuo* a 30-35°C para proporcionar (1S)-1-(3-etoxi-4-metoxifenil)-2-metanosulfonil-etilamina como un polvo blanco (639,0-672,0 g, 95-100% de rendimiento).

6.5.4. Preparación de (1S)-7-nitro-2-[1-(3-etoxi-4-metoxifenil)-2-(metilsulfonil)etil]isoindolin-1-ona

Se preparó (1*S*)-7-nitro-2-[1-(3-etoxi-4-metoxifenil)-2-(metilsulfonil)etil)isoindolin-1-ona por el procedimiento siguiente. Una mezcla de 2-bromometil-6-nitrobenzoato de metilo (100,0 g, 365 mmoles, preparado previamente en el Ejemplo 6.5.2.), (1S)-1-(3-etoxi-4-metoxifenil)-2-metanosulfoniletilamina (104,7 g, 383 mmoles, preparado previamente en el Ejemplo 6.5.3.), hidrógeno carbonato de sodio (67,5 g, 8,03 moles, de Aldrich Chemicals) y dimetil formamida (500 mL) se cargó en un matraz de 3 bocas de 1 L a temperatura ambiente bajo nitrógeno. La mezcla de reacción se calentó gradualmente hasta una temperatura interna de 70-75°C durante dos horas hasta que hubo menos del <2% de 2-bromometil-6-nitrobenzoato de metilo que no había reaccionado. La mezcla de reacción se calentó gradualmente hasta una temperatura interna de 95-100°C durante 18 horas. La mezcla de reacción se enfrió hasta 20-25°C y se transfirió a un embudo de adición de 1 L. Después de cargar agua purificada (1.500 mL) en un matraz de 3 bocas de 5 L, la mezcla de reacción en el embudo de adición se añadió en agua en el matraz de 3 bocas de 5 L a temperatura ambiente durante 1-2 horas manteniendo una temperatura interna por debajo de 30°C. La mezcla de reacción se agitó durante 2 horas a temperatura ambiente. El sólido se retiró por filtración en vacío, se lavó con agua (3x300 mL) y metanol (2x400 mL), y se cargó en un matraz de 3 bocas de 2 L seguido de metanol (1.000 mL). La mezcla se sometió a reflujo durante 1 hora. La mezcla se enfrió hasta temperatura ambiente. El sólido se recogió por filtración en vacío, se lavó con 200 mL de metanol (2 vol), y se secó hasta un peso constante a 40-45°C en un vacío de 100-120 torr. El rendimiento de (1*S*)-7-nitro-2-[1-(3-etoxi-4-

metoxifenil)-2-(metilsulfonil)etil]isoindolin-1-ona fue 123,0 g (78 %), sobre la base de una introducción de 100,0 g de 2-bromometil-6-nitrobenzoato de metilo. Se encontró que el producto tenía una pureza de >99% medida por HPLC sobre la base de porcentaje de área, y un contenido de agua de <0,1 % medido por titulación de Karl Fisher.

6.5.5. Preparación alternativa de (1S)-7-nitro-2-[1-(3-etoxi-4-metoxifenil)-2-(metilsulfonil)etil]isoindolin-1-ona

Se preparó (1*S*)-7-nitro-2-[1-(3-etoxi-4-metoxifenil)-2-(metilsulfonil)etil]isoindolin-1-ona también por el procedimiento siguiente. Una mezcla de 2-bromometil-6-nitrobenzoato de metilo (100,0 g, 365 mmoles, preparado previamente en el Ejemplo 6.5.2.), (1S)-1-(3-etoxi-4-metoxifenil)-2-metanosulfonil-etilamina (104,7 g, 383 mmoles, preparado previamente en el Ejemplo 6.5.3.), y polvo de carbonato de potasio (100,8 g, 730 mmoles, de Aldrich Chemicals) se suspendió en acetonitrilo (500 mL) a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se sometió a reflujo a 81-83°C durante aproximadamente dos horas hasta que hubo menos del 2% de 2-bromometil-6-nitrobenzoato de metilo que no había reaccionado. Después de enfriar la mezcla de reacción hasta 45-50°C, se cargó metanol (200 mL) durante 5-10 minutos. Después de dejar que la mezcla se enfriara hasta 20-25°C y agitarla durante 2 horas, se cargó agua desionizada (1,40 L) durante 0,5-1 hora y se agitó a 20-25°C durante 30 minutos y a 0-5°C durante 1-2 horas. El sólido se filtró, se lavó con agua desionizada (3x300 mL), y se secó hasta <10% de contenido de agua según se mide por titulación de Karl Fisher. El sólido se suspendió en metanol (750 mL) y se sometió a reflujo durante 1-1,5 horas. La suspensión se enfrió hasta 0-5°C durante 1,5-2 horas y se mantuvo a 0-5°C durante 1-1,5 horas. El sólido se filtró, se lavó con metanol a 0-5°C (2x200 mL) y heptano (200 mL), y se secó a 40-45°C en vacío hasta un peso constante. El rendimiento de (1*S*)-7-nitro-2-[1-(3-etoxi-4-metoxifenil)-2-(metilsulfonil)etil]isoindolin-1-ona fue 148,0 g (93 %), sobre la base de la introducción de 100,0 g de 2-bromometil-6-nitrobenzoato de metilo. Se encontró que el producto tenía una pureza de >99% medida por HPLC sobre la base de porcentaje de área, y un contenido de agua de <1,0% medido por titulación de Karl Fisher.

6.5.6. Preparación del Compuesto B

Una mezcla de (1*S*)-7-nitro-2-[1-(3-etoxi-4-metoxifenil)-2-(metilsulfonil)etil]isoindolin-1-ona (60 g, 138 mmoles, preparado previamente en el Ejemplo 6.5.5.), 10% Pd/C (50% húmedo, 2,4 g, 4% en peso, de Johnson Matthey, Londres, Reino Unido), acetato de etilo (780 mL) se cargó en un recipiente Parr a temperatura ambiente bajo nitrógeno. Después de que la mezcla se purgara con nitrógeno tres veces y con hidrógeno tres veces, la mezcla de reacción se calentó hasta 40°C y después el calentamiento de retiró. La mezcla de reacción se agitó con hidrógeno a una presión entre 40-45 psi durante 4-6 horas hasta que hubo ≤3% del intermedio hidroxilamina. La mezcla de reacción se enfrió hasta 20-25°C. La mezcla de reacción se filtró a través de un lecho de celite (grosor de 2,54 cm) y después se lavaron los lechos con acetato de etilo (120 mL). El filtrado se transfirió a un matraz de 3 bocas de 3 L equipado con un embudo de adición de 50 mL. Después de cargar N,N-diisopropiletilamina (29 mL, 165 mmoles) en el matraz, el embudo de adición se cargó con cloruro de ciclopropilcarbonilo (13,0 mL, 145 mmoles, de Aldrich Chemicals). El cloruro de ciclopropilcarbonilo se añadió a temperatura ambiente durante 1-2 horas a una temperatura interna por debajo de 30°C. La mezcla de reacción se agitó durante 2-4 horas a temperatura ambiente. Después de añadir heptano (300 mL), la mezcla de reacción se agitó durante 4-6 horas. El sólido se recogió por filtración en vacío, se lavó con 2N HCl (2x300 mL), agua (2x300 mL) y después heptano (2x300 mL). El producto crudo se secó a 40-45°C bajo un vacío de 100-120 torr hasta un peso constante. El rendimiento del Compuesto B crudo fue 58 g (88%), sobre la base de una introducción de 60,0 g de (1*S*)-7-nitro-2-[1-(3-etoxi-4-metoxifenil)-2-(metilsulfonil)etil]-isoindolin-1-ona.

6.5.7. Recristalización del Compuesto B

Una mezcla de Compuesto B crudo (95,2 g, preparado previamente en el Ejemplo 6.5.6.) y tetrahidrofurano (THF, 1,43 L) se cargó en un matraz de 3L a 20-25°C bajo nitrógeno. La suspensión se calentó hasta 60-65°C hasta que se consiguió la disolución. La suspensión se filtró a 45-50°C y el sólido se lavó con 95 mL de THF precalentado a 45-55°C. Después de retirar por destilación aproximadamente 950-1.150 mL de THF a presión normal durante 30-60 minutos, se cargó etanol absoluto (950 mL) a 55-60°C durante 5-10 minutos. Aproximadamente 350-400 mL de disolventes se eliminaron a presión normal hasta que la temperatura interna se elevó hasta 72-74°C. La suspensión resultante se sometió a reflujo a 72-75°C durante 30-60 minutos, se enfrió hasta 20-25°C durante 1-2 horas y se mantuvo a 20-25°C durante otras 1-2 horas. El sólido se recogió por filtración en vacío, se lavó con etanol absoluto (240-280 mL) y heptano (240-280 mL), y después se secó en bandeja a 50-55°C *in vacuo* a 130-140 torr hasta un peso constante. El rendimiento del producto cristalino blanquecino fue (88,0-91,0 g, 92-96 %).

Los compuestos descritos en la presente memoria también pueden prepararse según el proceso descrito en la Publicación de Patente U.S. No. 2010/0168475.

6.6. Ejemplo 6: Efectos de los inhibidores de PDE4 Compuesto A y Compuesto B en combinación con ciclosporina A, metotrexato, y Etanercept en la producción de citoquinas asociada a artritis reumatoide y psoriasis en células T estimuladas (combinación de Compuesto A y ciclosporina A según la invención)

6.6.1. Procedimiento para el ensayo múltiple en células mononucleares de sangre periférica

Purificación de células mononucleares de sangre periférica humana

Cincuenta mililitros (50 mL) de capa leuco-plaquetaria humana se dividieron en dos alicuotas de 25 mL en dos tubos cónicos de 50 mL que contenían 25 mL de Disolución Salina Tamponada de Hank (HBSS) estéril. Los tubos se mezclaron suavemente mediante inversión varias veces. Quince mililitros (15 mL) de Ficoll-Paque Plus a temperatura ambiente (Amersham Bioscience; cat# 17-1440-02) se alicuotaron en cuatro tubos cónicos de 50 mL. Después, 25 mL de la mezcla capa leuco-plaquetaria/HBSS se pusieron en capas suavemente y lentamente en la parte superior del Ficoll. Las muestras se centrifugaron (Centrífuga Eppendorf 5810R) a 450 rpm (Rotor A-4-81) durante 35 minutos. La capa superior que contenía plasma se desechó. La interfase que contenía células mononucleares se transfirió en dos tubos cónicos de 50 mL. Ambos tubos cónicos se rellenaron hasta un volumen total (50 mL) con HBSS y se centrifugaron a 1.200 rpm durante 10 minutos. Las células se lavaron de nuevo en HBSS y se centrifugaron a 1.000 rpm durante 10 minutos. Se añadió tampón de lisis de células sanguíneas rojas humanas (5 mL) (Boston Bioproducts cat# IBB-197) a los sedimentos celulares y se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente. Se añadió disolución salina tamponada con fosfato (PBS; 45 mL) a los tubos cónicos y se centrifugó a 1.200 rpm durante 10 minutos. Los sedimentos celulares se combinaron y se resuspendieron en 20 mL de medio completo del Roswell Park Memorial Institute (RPMI) (RPMI/5% suero humano/1x penicilina/estreptomicina [pen/strep]/L-glutamina [L-gln]) y las células se contaron.

Para PBMC tratadas con enterotoxina B estafilocócica (SEB)

Las PBMC aisladas se plaquearon en placas de 96 pocillos y se añadió compuesto (empezando a 1.600 ng/ml y diluido 1:4) durante 1 hora a 37°C. Se añadió entonces la enterotoxina B estafilocócica (Sigma) a una concentración final de 100 ng/ml y las células se incubaron durante 18 horas a 37°C.

Los sobrenadantes se recogieron para ensayo luminex.

6.6.2. Procedimiento para el ensayo múltiple de células T estimuladas con anticuerpo monoclonal anti-CD3

Purificación y tratamiento de células T humanas

Se recubrieron placas de cultivo tisular (de fondo plano de 96 pocillos) con mAb anti-CD3 (2,5 µg/mL) y se incubaron a 37°C durante 4 horas. Las placas se lavaron 3 veces con 100 µl/pocillo de Medio Completo (RPMI 1640 con 10% suero bovino fetal inactivado con calor (FBS), 1% pen/strep/1% L-gln) justo antes de añadir las células T. Se sembraron células mononucleares de sangre periférica (5 x 10^8 células; preparadas como se ha descrito anteriormente) en cinco placas de cultivo tisular de 10 cm (10 mL cada una). La parte de monocitos adherentes se deplecionó por incubación durante 30 - 60 minutos a 37°C. Las placas se lavaron con medio para eliminar todas las PBMC no adherentes. Las PBMC no adherentes se contaron y se retiraron 2 x 10^8 células, se centrifugaron durante 10 minutos a 1.200 rpm, y el volumen se ajustó a 4,0 mL usando Medio Completo. La mezcla de anticuerpos siguiente se preparó mezclando en un agitador a temperatura ambiente (RT) durante 30 minutos en un tubo Falcon (5 mL):

- lechos de IgG anti-ratón de oveja (600 µl; Dynal Cat. No 110.31),
- anti-CD16 (30 µl; BD Pharmingen Cat. No. 555404),
- anti-CD33 (30 µl; BD Pharmingen Cat. No. 555449),
- anti-CD56 (30 µl; BD Pharmingen Cat. No. 555514).

Después de la finalización, se añadieron lechos anti-CD19 (460 µl; Dynal Cat. No. 111.43) y lechos anti-CD14 (112 µl; Dynal Cat. No. 111.49) a la mezcla de tubo Falcon/anticuerpo. La mezcla se lavó 3 veces con Medio Completo usando un imán y aspiración con pipeta. Las PBMC no adherentes (2 x 10^8 células en 4,0 mL) se añadieron y el tubo se rotó a 4°C durante 30 minutos. Las células se separaron de los lechos usando un imán para selección negativa. Las células T se recogieron, se contaron, y se resuspendieron en Medio Completo. La concentración de células T se ajustó a 2,5 x 10^5 células/180 µl (1,39 x 10^6 células/mL) y se añadieron a los pocillos de la placa (180 µl/pocillo). El compuesto de ensayo (20 µl de una concentración 10x) se añadió inmediatamente a los pocillos que contenían las células T. Se ensayaron Compuesto A, Compuesto B, ciclosporina A (Sigma), metotrexato (Sigma) y Enbrel (obtenido por prescripción) empezando a 400 ng (1.600 ng/ml y diluidos 1:4). Las concentraciones de fármaco usadas en el ensayo se determinaron según los estudios farmacocinéticos realizados en pacientes con RA (Tabla 2). Las placas de células T se incubaron durante 2 días a 37°C a 5% CO_2. Cincuenta µl de sobrenadante de cada pocillo se transfirieron a 3 nuevas placas de fondo redondeado de 96 pocillos y se almacenaron a -20°C para análisis Luminex. Se realizaron pocillos en duplicado para cada muestra. Véase. Fox et al., "Combined oral cyclosporin and methotrexate therapy in patients with rheumatoid arthritis elevates methotrexate levels and reduces 7-hydroxymethotrexate levels when compared with methotrexate alone." Rheumatology (Oxford). 2003;42(8):989-94.

Tabla 2: Datos farmacocinéticos para los fármacos del estudio

Fármacos	**Cmáx (ng/ml)**	**Cmin (ng/ml)**	**Comentario**
Ciclosporina A	800	250 - 350	Pacientes RA
Metotrexato	300-1.040		Dependiendo de pacientes RA
Etanercept (Enbrel)	Paciente RA 6 meses 25-mg bisemanalmente: 3.000 (1.700 a 5.600)		Biodisponibilidad 76%
	Pacientes RA 50-mg semanalmente: 2.400 ± 1.500	1.200 ± 700	
Compuesto A	419	4,9	20-mg; día-7
Compuesto B	195	40	200-mg día-7
RA = artritis reumatoide.			

6.6.3. Análisis Luminex

Las citoquinas IFN-γ, IL-2, IL-4, IL-10, IL-13, IP-10, MIP-1α, MIP1β y TNF-α se analizaron en un formato nueve-plex usando sobrenadantes sin disolvente. El análisis de los datos se realizó usando software Upstate Beadview. Los datos se representaron gráficamente como % del control (DMSO) usando Prism v5 (GraphPad). La sinergia potencial de la combinación de fármacos se identificó en primer lugar por inspección visual de los datos representados a lo largo de la parte lineal de la curva. Después de la identificación de la sinergia, los datos representados se introdujeron en el Programa Compusyn (Combosyn, Inc.) que calculó el índice de combinación (IC) para cada punto de datos a lo largo de la curva de concentración (Tabla 3).

Tabla 3: Significado de los valores del índice de combinación

IC	Descripción
< **1,0**	sinergia
= 1,0	aditivo
> 1,0	no aditivo
IC = índice de combinación; < = menos de; > = mayor de	

6.6.4. Inhibidor de fosfodiesterasa 4 en combinación con ciclosporina, Etanercept o metotrexato en células T humanas estimuladas con anticuerpo monoclonal anti-CD3: Respuestas del donante con altos niveles de citoquinas

En las células T estimuladas con mAb anti-CD3 derivadas de un donante con altos niveles de citoquinas, el efecto de la combinación de Compuesto A bien con CsA o ETC inhibió sinérgicamente la producción de IFN-γ (Figura 3A), IL-13 (Figura 7A), IP-10 (Figura 8A), MIP-1α (Figura 9A), MIP-1β Figura 10A), y TNF-α (Figura 11A) a un mínimo de una de las concentraciones ensayadas (Tabla 4). El efecto inhibidor combinado de Compuesto A y MTX para las citoquinas mencionadas anteriormente fue no aditivo con la excepción de INF-γ que no se pudo determinar (ND) (Tabla 4). La inhibición sinérgica también se observó para la producción de IL-10 con la combinación del Compuesto A y CsA o MTX a una de las concentraciones ensayadas, pero fue ND para la combinación Compuesto

A/ETC (Figura 6 y Tabla 4). A las máximas concentraciones de ensayo (1.600 ng/ml), la combinación del Compuesto A/MTX inhibió sinérgicamente la producción de IL-2; sin embargo, el Compuesto A en combinación con ETC o CsA fue no aditivo para la inhibición de la producción de IL-2. Notablemente, la combinación del Compuesto A/CsA fue realmente antagonista (Figura 4A y Tabla 4). La inhibición de la producción de IL-4 fue no aditiva en respuesta a las combinaciones del Compuesto A y ETC o MTX pero fue aditiva para la combinación del Compuesto A/CsA (Figura 5A y Tabla 4).

El Compuesto B en combinación con CsA, ETC o MTX en las células T estimuladas derivadas de donantes con altos niveles de citoquinas y a un mínimo de una de las concentraciones ensayadas inhibió sinérgicamente la producción de MIP-1α (Figura 9B) (Tabla 4). La combinación del Compuesto B/CsA también fue sinérgica para la inhibición de la producción de IFN-γ (Figura 3B), IL-4 (Figura 5B), IL-10 (Figura 6B), e IL-13 (Figura 7B), IP-10 (Figura 8B), MIP-1β (Figura 10B), y TNF-α (Figura 11B) al menos a una de las concentraciones ensayadas pero el efecto fue no aditivo para la producción de IL-2 Figura 4B) (Tabla 4). Adicionalmente, la combinación del Compuesto B/MTX inhibió sinérgicamente la producción de IL-2 (Figura 4B), IL-4 (Figura 5B), y MIP-1β (Figura 10B) (Tabla 4) pero los efectos de esta combinación fueron no aditivos para la inhibición de la producción de IL-10 (Figura 6B), IL-13 (Figura 7B), IP-10 (Figura 8B), y TNF-α (Figura 11B), pero fue ND para la producción de IFN-γ (Figura 3B) (Tabla 4). El Compuesto B/ETC no se ensayó para las citoquinas perfiladas en este estudio con la excepción de MIP-α (mencionado anteriormente; Figura 9B) (Tabla 4).

Tabla 4: Resumen de los efectos para inhibidores de fosfodiesterasa 4 en combinación con ciclosporina, Etanercept, o metotrexato: células T de donantes con altos niveles

Citoquina	**Compuesto A**			**Compuesto B**		
	CsA	**ETC**	**MTX**	**CsA**	**ETC**	**MTX**
IFN-γ	**Sinergia** (25 ng/mL; IC = 0,31)	**Sinergia** (25 - 1.600 ng/mL; IC = 0,0066 - 0,038)	ND	**Sinergia** (25 ng/mL; IC = 0,28)	No ensayado	ND
IL-2	No aditivo (antagonista)	No aditivo	**Sinergia** (1.600 ng/mL; IC = 0,39)	No aditivo	No ensayado	**Sinergia** (1.600 ng/mL; IC = 0,0013)
IL-4	Aditivo (25 ng/mL; IC = 1,01)	No aditivo	No aditivo	**Sinergia** (25 ng/mL; IC = 0,88)	No ensayado	**Sinergia** (25 - 400 ng/mL; IC = 0,17 - 0,76)
IL-10	**Sinergia** (6,25 - 25 ng/mL; IC = 0,27 - 0,43)	ND	**Sinergia** (25 - 400 ng/mL; IC = 0,11 - 0,62)	**Sinergia** (6,25 - 25 ng/mL; IC = 0,26 - 0,39)	No ensayado	No aditivo
IL-13	**Sinergia** (25 ng/mL; IC = 0,77)	**Sinergia** (6,25 - 1.600 ng/mL; IC = 0,088 - 0,39)	No aditivo	**Sinergia** (25 ng/mL; IC = 0,85)	No ensayado	No aditivo
IP-10	**Sinergia** (100 ng/mL; IC = 0,095)	**Sinergia** (25 - 1.600 ng/mL; IC = 0,039 0,27)	No aditivo	**Sinergia** (100 ng/mL; IC = 0,055)	No ensayado	No aditivo
MIP-1α	**Sinergia** (25 - 100 ng/mL; IC = 0,27 - 0,59)	**Sinergia** (25 - 100 ng/mL; IC = 0,18 - 0,55)	No aditivo	**Sinergia** (6,25 - 100 ng/mL; IC = 0,12 - 0,38)	**Sinergia** (25 - 100 ng/mL; IC = 0,22 - 0,65)	**Sinergia** (6,25 - 100 ng/mL; IC = 0,041 - 0,44)
MIP-1β	**Sinergia** (100 ng/mL; IC =	**Sinergia** (1.600 ng/mL; IC =	No aditivo	**Sinergia** (25 - 100 ng/mL; IC =	No ensayado	**Sinergia** (1.600 ng/mL; IC =

	0,35)	0,35)		0,25 - 0,88)		0,14)
TNF-α	**Sinergia** (6,25 - 25 ng/mL; IC = 0,80 - 0,87)	**Sinergia** (0,39 - 25 ng/mL; IC = 0,11 - 0,16)	No aditivo	**Sinergia** (25 ng/mL; IC = 0,74)	No ensayado	No aditivo
IC = índice de combinación; IL = interleuquina; INF-γ = interferón-gamma; IP-10 = proteína 10 inducible por interferón; MIP-1α(β) = proteína 1 alfa (beta) inflamatoria de macrófagos; ND = no determinable; TNF-α = factor de necrosis tumoral alfa. No aditivo: el porcentaje de inhibidor de PDE4 en combinación con otro agente ≤ cualquiera de los fármacos actuando solo; IC > 1. Aditivo: [(100 - % inhibidor de PDE4) + (100 - % agente de combinación)] = (100 - % inhibidor de PDE4 con agente de combinación); IC = 1,0. Sinergia: [(100 - % inhibidor de PDE4) + (100 - % otro agente)] < (100 - % inhibidor de PDE4 con agente de combinación); IC < 1.						

6.6.5. Inhibidor de fosfodiesterasa 4 en combinación con ciclosporina, Etanercept o metotrexato en células T humanas estimuladas con anticuerpo monoclonal anti-CD3: Respuestas del donante con bajos niveles de citoquinas

En las células T estimuladas con mAb anti-CD3 de donantes con bajos niveles (n = 5), el efecto de la combinación del Compuesto A bien con CsA inhibió sinérgicamente la producción de IFN-γ (Figura 12A), IL-4 (Figura 14A), IL-10 (Figura 15A), IL-13 (Figura 16A), IP-10 (Figura 17A), MIP-1α (Figura 18A), MIP-1β (Figura 19A), y TNF-α (Figura 20A) a un mínimo de una de las concentraciones ensayadas, y fue no aditivo para la inhibición de la producción de IL-2 (Figura 13A) (Tabla 5). El Compuesto A en combinación con ETC también inhibió sinérgicamente la producción de IL-4 (Figura 14A), IL-10 (Figura 15A), IL-13 (Figura 16A), IP-10 (Figura 17A), y MIP-1α (Figure 18A) a un mínimo de una de las concentraciones ensayadas, y fue no aditivo para la inhibición de la producción de IFN-γ (Figura 12A), IL-2 (Figura 13A), MIP-1β (Figura 19A) y TNF-α (Figura 20A) (Tabla 5). La combinación de Compuesto A/MTX fue no aditiva para la inhibición de todas las citoquinas perfiladas (Tabla 5).

El Compuesto B en combinación con CsA, ETC o MTX en las muestras de células T estimuladas de donantes con bajos niveles (n = 5) y a un mínimo de una de las concentraciones ensayadas inhibió sinérgicamente la producción de MIP-1α (Figura 18B) (Tabla 5). La combinación del Compuesto A/CsA presentó una sinergia inhibidora a una de las concentraciones ensayadas para la producción de IFN-γ (Figura 12B), IL-2 (Figura 13B), IP-10 (Figura 17B), y MIP-1β (Figura 19B) (Tabla 5). Se obtuvo una respuesta no aditiva para la producción de TNF-α (Figura 20B) con la combinación del Compuesto A/CsA e IL-4, IL-10, e IL-13 no se ensayaron. El Compuesto B en combinación con ETC también demostró respuestas inhibidoras sinérgicas al menos para una de las concentraciones ensayadas para la producción de IFN-γ (Figura 12B), IL-4 (Figura 14B), IL-10 (Figura 15B), e IP-10 (Figura 17B) (Tabla 5), y presentó respuestas inhibidoras no aditivas para la producción de IL-2 (Figura 13B), IL-13 (Figura 16B), MIP-1β (Figura 179B), y TNF-α (Figura 20B) (Tabla 5). La combinación del Compuesto B/MTX demostró una respuesta inhibidora no aditiva para todas las citoquinas perfiladas excepto MIP-1α (mencionado anteriormente; Tabla 5).

Tabla 5: Resumen de los efectos para inhibidores de fosfodiesterasa 4 en combinación con ciclosporina, Etanercept, o metotrexato: células T de donantes con bajos niveles

Citoquina	**Compuesto A**			**Compuesto B**		
	CsA	**ETC**	**MTX**	**CsA**	**ETC**	**MTX**
IFN-γ	**Sinergia** (6,25 ng/mL; IC = 0,81)	No aditivo	No aditivo	**Sinergia** (6,35 - 100 ng/mL; IC = 0,0012 - 0,68)	**Sinergia** (25 - 100 ng/mL; IC = 0,13 - 39)	No aditivo

Citoquina	Compuesto A			Compuesto B		
	CsA	**ETC**	**MTX**	**CsA**	**ETC**	**MTX**
IL-2	No aditivo	No aditivo	No aditivo	**Sinergia** (6,25 - 25 ng/mL; IC = 0,0015 - 0,060)	No aditivo	No aditivo
IL-4	**Sinergia** (6,25 ng/mL; IC = 0,069)	**Sinergia** (100 ng/mL; IC = 0,15)	No aditivo	No ensayado	**Sinergia** (6,25 - 400 ng/mL; IC = 0,16 - 0,63)	No aditivo
IL-10	**Sinergia** (25 - 100 ng/mL; IC = 0,085 - 0,17)	**Sinergia** (25 y 100 ng/mL; IC = 0,038 - 0,10)	No aditivo	No ensayado	**Sinergia** (100 ng/mL; IC = 0,14)	No aditivo
IL-13	**Sinergia** (6,25 ng/mL; IC = 0,040)	**Sinergia** (25 - 100 ng/mL; IC = 0,025 - 0,033)	No aditivo	No ensayado	No aditivo	No aditivo
IP-10	**Sinergia** (25 - 100 ng/mL; IC = 0,20 - 0,35)	**Sinergia** (6,25 - 25 ng/mL; IC = 0,075 -0,13)	No aditivo	**Sinergia** (6,25 ng/mL; IC = 0,094)	**Sinergia** (1,56 - 25 ng/mL; IC = 0,027 - 0,14)	No aditivo
MIP-1α	**Sinergia** (25 - 100 ng/mL; IC = 0,28 - 0,71)	**Sinergia** (625 - 100 ng/mL; IC = 0,089 - 0,58)	No aditivo	**Sinergia** (25 - 100 ng/mL; IC = 0,27 - 0,65)	**Sinergia** (6,25 - 100 ng/mL; IC = 0,25 - 0,65)	**Sinergia** (1,5625 - 100 ng/mL; IC = 0,012 - 0,38)
MIP-1β	Sinergia (25 ng/mL; IC = 0,40)	No aditivo	No aditivo	**Sinergia** (25 - 100 ng/mL; IC = 0,27 - 0,37)	No aditivo	No aditivo
TNF-α	**Sinergia** (25 - 100 ng/mL; IC = 0,4 - 0,61)	No aditivo	No aditivo	No aditivo	No aditivo	No aditivo

IC = índice de combinación; IL = interleuquina; INF-γ = interferón-gamma; IP-10 = proteína 10 inducible por interferón; MIP-1α(β) = proteína 1 alfa (beta) inflamatoria de macrófagos; TNF-α = factor de necrosis tumoral alfa.
No aditivo: el porcentaje de inhibidor de PDE4 en combinación con otro agente ≤ cualquiera de los fármacos actuando solo; IC > 1.
Aditivo: [(100 - % inhibidor de PDE4) + (100 - % agente de combinación)] = (100 - % inhibidor de PDE4 con agente de combinación); IC = 1,0.
Sinergia: [(100 - % inhibidor de PDE4) + (100 - % otro agente)] < (100 - % inhibidor de PDE4 con agente de combinación); IC < 1.

6.6.6. Inhibidor de fosfodiesterasa 4 en combinación con ciclosporina, Etanercept o metotrexato: respuesta en células mononucleares de sangre periférica tratadas con enterotoxina B estafilocócica

En las muestras de PBMC tratadas con SEB (n = 6), el Compuesto A o Compuesto B en combinación con CsA inhibieron sinérgicamente la producción de IL-10 (Figura 21A y B), IP-10 (Figura 22A y B), MIP-1α (Figura 23A y B), MIP-1β (Figura 24A y B) y TNF-α (Figura 25A y B) para al menos una de las concentraciones ensayadas (Tabla 6). También, el Compuesto A o Compuesto B combinados con ETC para al menos una de las concentraciones ensayadas inhibieron sinérgicamente la producción de IL-10 (Figura 21A y B), IP-10 (Figura 22A y B), y MIP-1α (Figura 23A y B) y presentaron efectos no aditivos para la inhibición de la producción de MIP-1β (Figura 24A y B) y TNF-α (Figura 25A y B) (Tabla 6). La combinación de Compuesto A/MTX mostró inhibición no aditiva para todas las citoquinas perfiladas en este ensayo; sin embargo, la combinación del Compuesto B/MTX demostró inhibición no aditiva para todas las citoquinas perfiladas excepto la producción de TNF-α que mostró sinergia inhibidora a la concentración de 400 ng/ml (Figura 25B y Tabla 6).

6.6.7. El Compuesto A inhibe la expresión génica de la citoquina IL-7 reguladora en células T

La citoquina IL-7 reguladora en células T, producida por condrocitos y sinoviocitos, juega un papel en las enfermedades inflamatorias de las articulaciones tales como artritis y en el daño óseo. Long, D. et al. Arthritis Res Ther., 2008, 10(1): R23. En particular, el ácido ribonucleico mensajero (ARNm) de IL-7 y los niveles de proteína estaban incrementados en fluido sinovial de pacientes con espondilartritis y artritis reumatoide (RA). Rihl, M. et al., Arthritis Rheum., 2008, 58(11): 3430-3435. En condrocitos humanos primarios normales estimulados con IL-1, IL-6 y receptor de IL-6 (IL-6R), el Compuesto A (0,1 - 10 μM) inhibió significativamente la expresión génica de IL-7 de una manera dependiente de la dosis. En este ensayo, el Compuesto A fue un inhibidor más efectivo de la expresión génica de IL-7 que metotrexato y etanercept en intervalos de dosis que englobaban sus concentraciones plasmáticas máximas respectivas ($C_{máx}$- MTX = 400 y ETC = 1.600 ng/ml). En condrocitos normales humanos primarios estimulados, el Compuesto A inhibió la expresión de los biomarcadores en tejido sinovial molécula 1 de adhesión intercelular (ICAM-1) y la expresión de alfa-v-beta-3 (αvβ3) integrina. De forma similar, en fibroblastos sinoviales de artritis reumatoide estimulados con IL-1, IL-6 e IL-6R, el Compuesto A (0,1 - 10 μM) inhibió significativamente la expresión génica de IL-7 de una manera dependiente de la dosis, mientras MTX y ETC no tuvieron efectos significativos.

Tabla 6: Resumen de los efectos para los inhibidores de fosfodiesterasa 4 en combinación con ciclosporina, Etanercept o metotrexato en células mononucleares de sangre periférica tratadas con enterotoxina B estafilocócica

Citoquina	**Compuesto A**			**Compuesto B**		
	CsA	**ETC**	**MTX**	**CsA**	**ETC**	**MTX**
IL-10	**Sinergia** (6,25 - 100 ng/mL; IC = 0,056 - 0,17)	**Sinergia** (25 - 100 ng/mL; IC = 0,04 - 0,11)	No aditivo	**Sinergia** (25 - 100 ng/mL; IC = 0,010 - 0,040)	**Sinergia** (100 ng/mL; IC = 0,17)	No aditivo
IP-10	**Sinergia** (25 - 100 ng/mL; IC = 0,31 - 0,47)	**Sinergia** (6,25 - 25 ng/mL; IC = 0,12 - 0,17)	No aditivo	**Sinergia** (100 ng/mL; IC = 0,61)	**Sinergia** (1,56 - 6,25 ng/mL; IC = 0,03 - 0,14)	No aditivo
MIP-1α	**Sinergia** (6,25 - 100 ng/mL; IC = 0,14 - 0,63)	**Sinergia** (6,25 - 25 ng/mL; IC = 0,070 - 0,15)	No aditivo	**Sinergia** (6,25 - 100 ng/mL; IC = 0,15 - 0,33)	**Sinergia** (25 ng/mL; IC = 0,22)	No aditivo
MIP-1β	**Sinergia** (100 ng/mL; IC = 0,86)	No aditivo	No aditivo	**Sinergia** (25 - 100 ng/mL; IC = 0,24 - 0,42)	No aditivo	No aditivo

Citoquina	Compuesto A			Compuesto B		
	CsA	**ETC**	**MTX**	**CsA**	**ETC**	**MTX**
TNF-α	**Sinergia** (25 ng/mL; IC = 0,79)	No aditivo	No aditivo	**Sinergia** (25 - 100 ng/mL; IC = 0,75 - 0,77)	No aditivo	**Sinergia** (400 ng/mL; IC = 0,24)

IC = índice de combinación; IL = interleuquina; IP-10 = proteína 10 inducible por interferón; MIP-1α(β) = proteína 1 alfa (beta) inflamatoria de macrófagos; TNF-α = factor de necrosis tumoral alfa.
No aditivo: el porcentaje de inhibidor de PDE4 en combinación con otro agente ≤ cualquiera de los fármacos actuando solo; IC > 1.
Aditivo: [(100 - % inhibidor de PDE4) + (100 - % agente de combinación)] = (100 - % inhibidor de PDE4 con agente de combinación); IC = 1,0.
Sinergia: [(100 - % inhibidor de PDE4) + (100 - % otro agente)] < (100 - % inhibidor de PDE4 con agente de combinación); IC < 1.

6.6.8. Compuesto A en combinación con Etanercept, metotrexato y prednisona: respuesta en el ensayo de citoquina IL-7 reguladora en células T

Ensayo de expresión génica de IL-7: El efecto del Compuesto A en combinación con Etanercept, metotrexato y prednisona frente a la producción de IL-7 se ensayó en fibroblastos sinoviales derivados de pacientes con artritis reumatoide. Se descongelaron condrocitos humanos primarios normales y fibroblastos sinoviales de artritis reumatoide adquiridos en Asterand (Detroit, MI) en un matraz T-75 y se cultivaron durante 2 - 3 semanas hasta alcanzar la confluencia. El medio fue 20% FBS-DMEM/F-12 premium no inactivado con calor (Invitrogen 11330-032) + 1% pen/strep y 1% L-Glutamina. Las células (1,5 a 2,0 x 105 células) se plaquearon en placas de 6 pocillos que contenían 2 ml de medio completo. Después de alcanzar un 90% de confluencia (habitualmente en 1 - 2 días después de plaquear), se quitó el suero a las células durante 20 horas reemplazando el medio completo con 2 ml de medio sin suero. Las células se trataron con los compuestos de ensayo durante 1 hora a 37°C (0,25% concentración final de DMSO). Después del tratamiento con los fármacos, las células se incubaron durante 18 horas a 37°C con citoquinas estimuladoras IL-1β (10 ng/ml), IL-6 (10 ng/ml), e IL-6R (20 ng/ml). Las células se lavaron con PBS frío. Se aisló ácido ribonucleico (ARN) añadiendo 600 µl de tampón de lisis RLT (Qiagen kit RNAEasy cat# 74104), pasando las células a través de Qiashredder (Qiagen cat# 23800) seguido de aislamiento de ARN según las instrucciones del fabricante (Qiagen kit RNAEasy). El ARN purificado se transcribió de forma inversa en ADNc con ciclador térmico para análisis por reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa en tiempo real (RTPCR). Los ensayos de la expresión génica de interleuquina-7 se llevaron a cabo usando el sistema de PCR 7500 Real Time. Se operó un control de ensayo de expresión génica de GAPDH para cada muestra y se usó como un control de normalización. Para cada gen, las muestras en cada experimento se normalizaron a tratamiento con 0,25% DMSO.

Ensayo de expresión de proteínas en la superficie celular: Se descongelaron condrocitos humanos primarios normales en un matraz T-75 y se crecieron durante 2 - 3 semanas hasta alcanzar la confluencia en 20% FBS-DMEM/F-12 premium no inactivado con calor (Invitrogen 11330-032) + 1% pen/strep y 1% L-Glutamina. Las células se plaquearon (1,0 x 106 células/10 ml de medio completo) en una placa de cultivo tisular de 100 x 20 mm. Al día siguiente, el medio se reemplazó con 10 ml de medio sin suero durante 20 min para quitar el suero a las células. Se añadió el Compuesto A (0,1 - 10 µM) durante 1 hora a 37°C (0,25% DMSO final). Además, se añadieron las citoquinas IL-1β (10 ng/ml), IL-6 (10 ng/ml), e IL-6R (20 ng/ml) y se continuó la incubación de las células toda la noche (18 horas) a 37°C. Las células se recogieron con una disolución de disociación celular no enzimática (Millipore S-004-B) después se lavaron una vez en tampón de tinción frío (BD Pharmigen 554656) a 300 x g durante 5 minutos. Las células se resuspendieron y alicuotaron en tres tubos de fondo redondeado de 5 ml más dos alicuotas adicionales para control. Las células se lavaron de nuevo en tampón de tinción frío a 300 x g durante 5 minutos. Las células se tiñeron con PE anti-CD54 humana de ratón: (ICAM-1) (BD Pharmigen 555511) e integrina αVβ3anti (Millipore MAB1976H). Las muestras se agitaron con vórtex y se incubaron durante 30 minutos a 4°C mientras se protegían de la luz. También se ensayaron dos controles de isotipo, PE IgG1 k de ratón (BD Pharmigen 555749) e IgG1 (Millipore CBL600P) en la muestra no tratada-DMSO. Las muestras se lavaron dos veces en

tampón de tinción a 300 x g durante 5 minutos. Después de un lavado final, se añadieron 500 µl de tampón de tinción a cada muestra y se analizó por citometría de flujo.

Se descongelaron condrocitos humanos primarios normales en un matraz T-75 en 20% FBS-DMEM/F-12 premium no inactivado con calor (Invitrogen 11330-032) + 1% pen/strep y 1% L-Glutamina. Las células se plaquearon (1,0 x 106 células/10 ml ó 5.000 células/100µL de medio completo) en una placa de cultivo tisular de 100 x 20 mm o placa de 96 pocillos respectivamente. Al día siguiente, el medio se reemplazó con 10 ml o 100µl de medio sin suero durante 20 minutos para quitar el suero a las células. Se añadió el Compuesto A durante 1 hora a 37°C (0,25% DMSO final). Además, se añadieron las citoquinas IL-1β (10 ng/ml), IL-6 (10 ng/ml), e IL-6R (20 ng/ml) y se continuó la incubación de las células toda la noche (18 horas) a 37°C. Los sobrenadantes se recogieron a las 24 y 48 horas y se congelaron a -20°C. Al día siguiente, se realizó un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA) de CXCL8/TL-8 humana MMP-3 humana y pro-MMP-13. Los resultados se muestran en las Figuras 26-28.

Tomados conjuntamente, estos datos demuestran que la combinación bien de los inhibidores de PDE4 Compuesto A o Compuesto B con opciones de tratamiento aprobadas para artritis reumatoide y psoriasis CsA, ETC, o MTX, particularmente CsA o ETC, tiene un amplio rango de efectos inhibidores incluyendo sinergia, dependiendo de la concentración de la combinación, además de bloquear varias citoquinas inflamatorias y relacionadas con la enfermedad.

6.6.9. El Compuesto A inhibe la osteoclastogénesis y producción de osteoblastos de RANKL

Se trataron células de médula ósea humana con el Compuesto A y con 10 nM dexametasona y 10 nM Vitamina D para diferenciar las células en osteoclastos. Se añadieron cada 3 días medio fresco y Compuesto A. En el día 7, se recogió el sobrenadante y se aislaron las células adherentes para obtener ARN. Las células del Día 7 se tiñeron con TRAP5 y se contó el número de osteoclastos.

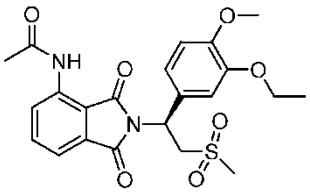
Resultados: se encontró que el Compuesto A inhibía la formación de osteoclastos, lo que proporciona evidencia de que el Compuesto A puede contrarrestar el efecto catabólico en el hueso de los corticosteroides. Esto proporciona una ventaja potencial como un tratamiento para la artritis, incluyendo la artritis reumatoide.

El Compuesto A también inhibe significativamente la osteoclastogénesis inducida por el tratamiento con vitamina D y corticosteroides de las células mononucleares de la médula ósea. Se plaquearon células de osteoblasto humanas normales (nHOST, fuente: Lonza) en placas de 6 pocillos y se incubaron toda la noche para que las células se adhieran. Las células se trataron durante 7 días con el Compuesto A y con 10 nM dexametasona y 10 nM Vitamina D. El Compuesto y el medio se repusieron frescos cada 3-4 días. En el Día 7, se recogió el sobrenadante para RANKL y OPG por ELISA.

Resultados: se encontró que el Compuesto A causaba una disminución significativa en sRANKL después de tratamiento de células de osteoblasto humanas normales a concentraciones de 1 µM y 10 µM Compuesto A. También se observó un incremento en OPG después de tratamiento con el Compuesto A. El Compuesto A inhibió significativamente la relación RANKL/OPG en células de osteoblasto humanas normales.

REIVINDICACIONES

1. Un primer agente activo y un agente activo adicional para uso en un método para tratar artritis reumatoide, en el que el primer agente activo es de fórmula (I):



(I)

o una sal farmacéuticamente aceptable de éste, y el agente activo adicional es ciclosporina A, en el que el método comprende administrar a un paciente que necesita dicho tratamiento una cantidad terapéuticamente efectiva del primer agente activo y una cantidad terapéuticamente efectiva del agente activo adicional.

2. El primer agente activo y el agente activo adicional para uso de la reivindicación 1, en el que la cantidad terapéuticamente efectiva del primer agente activo es entre aproximadamente 10 mg y aproximadamente 200 mg al día.

3. El primer agente activo y el agente activo adicional para uso de la reivindicación 1, en el que uno o más de los agentes activos se administran oralmente.

4. El primer agente activo y el agente activo adicional para uso de la reivindicación 3, en el que el primer agente activo se administra oralmente en una forma de comprimido o cápsula.

5. El primer agente activo y el agente activo adicional para uso de la reivindicación 1, en el que uno o más de los agentes activos se administran tópicamente.

6. El primer agente activo y el agente activo adicional para uso de la reivindicación 5, en el que la administración tópica es en la forma de una loción o un líquido.

7. El primer agente activo y el agente activo adicional para uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que la cantidad terapéuticamente efectiva del primer agente activo es de aproximadamente 0,01 mg a aproximadamente 100 mg por kg de peso corporal del paciente al día.

8. El primer agente activo y el agente activo adicional para uso de la reivindicación 2, en el que la cantidad terapéuticamente efectiva del primer agente activo es aproximadamente 10, 20, 30, 50 ó 100 mg al día.

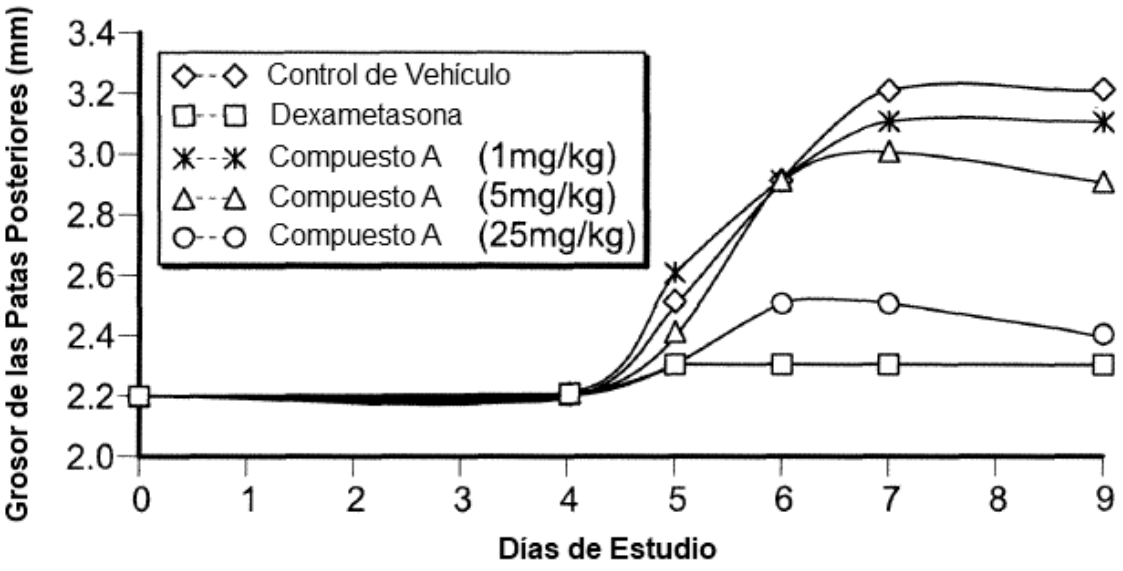

Grosor de las Patas Posteriores (mm)
3.4
3.2
3.0
2.8
2.6
2.4
2.2
2.0
Control de Vehículo
Dexametasona
Compuesto A (1mg/kg)
Compuesto A (5mg/kg)
Compuesto A (25mg/kg)
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9
Días de Estudio

FIG. 1

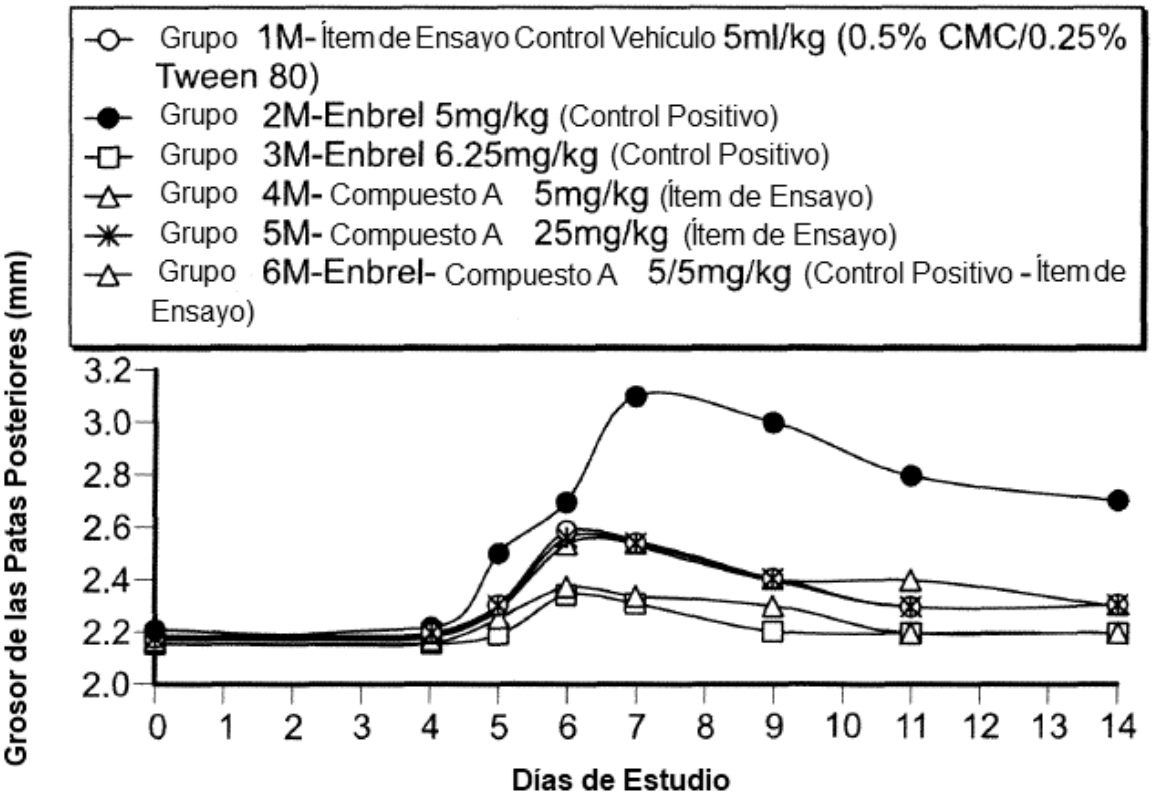

Grupo 1M- Ítem de Ensayo Control Vehículo 5ml/kg (0.5% CMC/0.25% Tween 80)
Grupo 2M-Enbrel 5mg/kg (Control Positivo)
Grupo 3M-Enbrel 6.25mg/kg (Control Positivo)
Grupo 4M- Compuesto A 5mg/kg (Ítem de Ensayo)
Grupo 5M- Compuesto A 25mg/kg (Ítem de Ensayo)
Grupo 6M-Enbrel- Compuesto A 5/5mg/kg (Control Positivo - Ítem de Ensayo)
Grosor de las Patas Posteriores (mm)
3.2
3.0
2.8
2.6
2.4
2.2
2.0
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14
Días de Estudio

FIG. 2

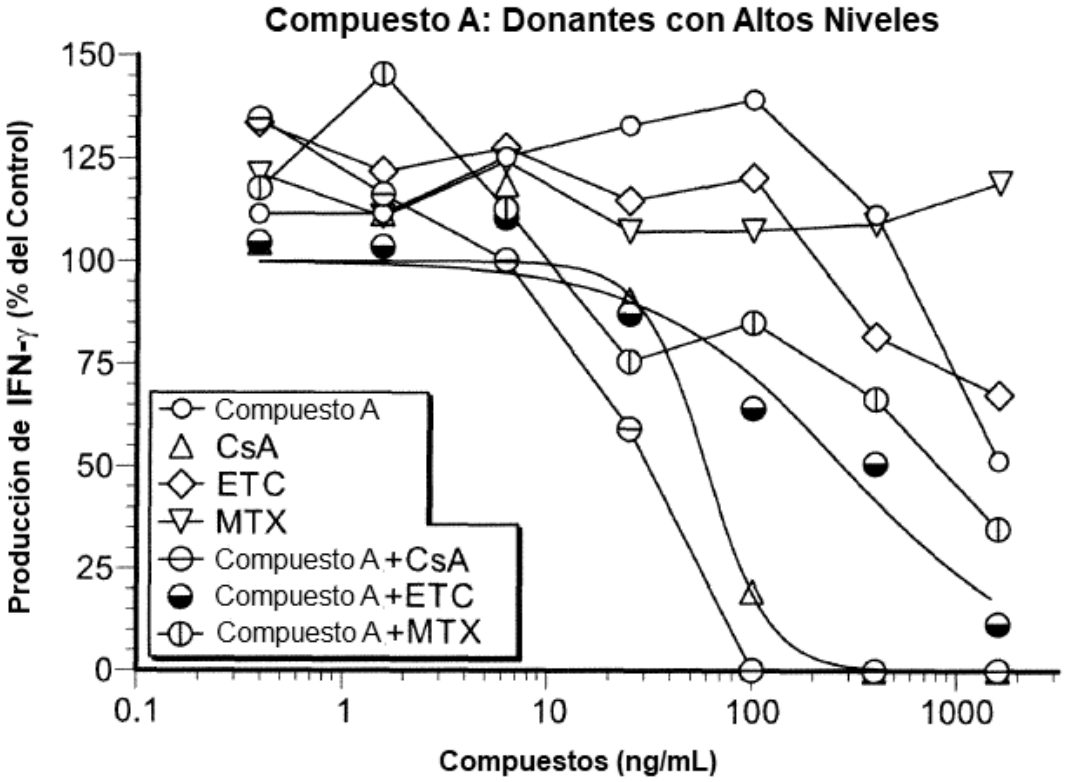

Compuesto A: Donantes con Altos Niveles
Producción de IFN-γ (% del Control)
150
125
100
75
50
25
0
0.1
1
10
100
1000
Compuestos (ng/mL)
Compuesto A
CsA
ETC
MTX
Compuesto A +CsA
Compuesto A +ETC
Compuesto A +MTX

FIG. 3A

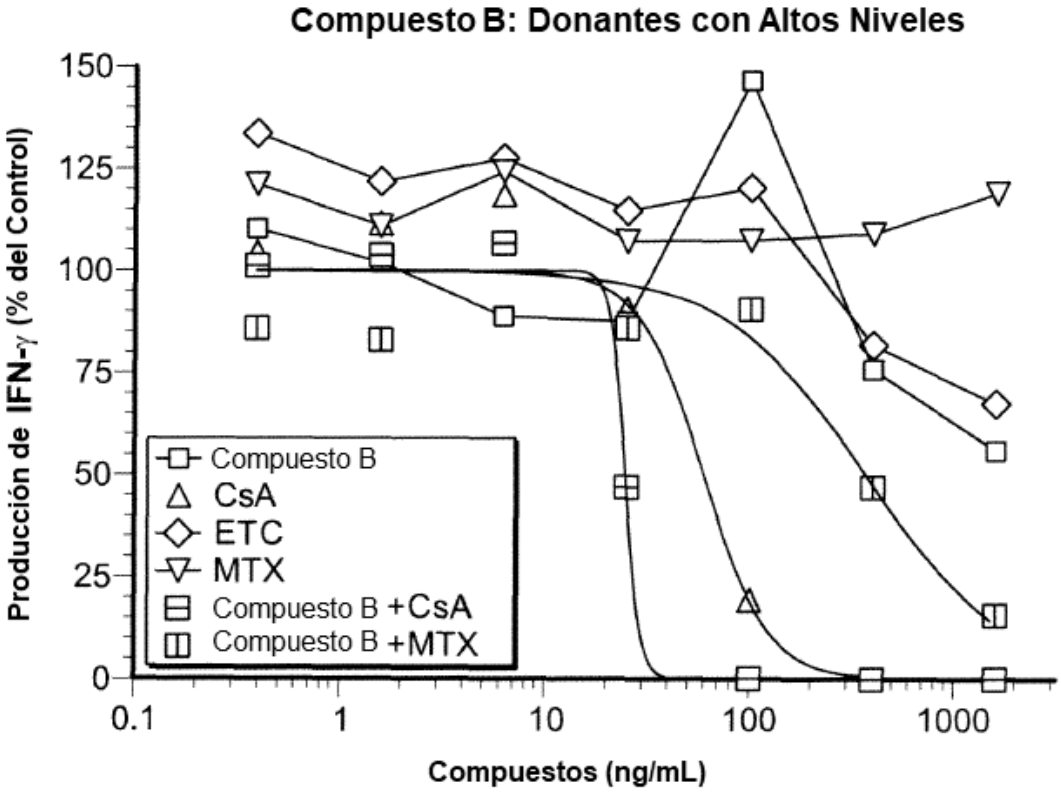

Compuesto B: Donantes con Altos Niveles
Producción de IFN-γ (% del Control)
150
125
100
75
50
25
0
0.1
1
10
100
1000
Compuestos (ng/mL)
Compuesto B
CsA
ETC
MTX
Compuesto B +CsA
Compuesto B +MTX

FIG. 3B

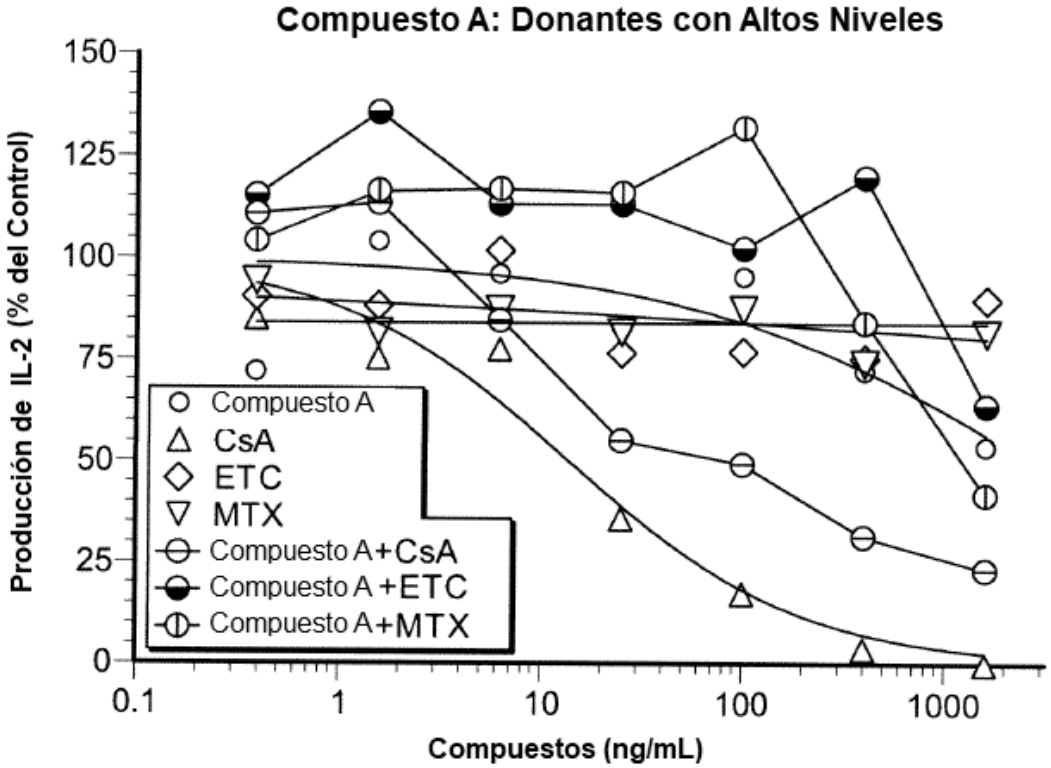

Compuesto A: Donantes con Altos Niveles
Producción de IL-2 (% del Control)
150
125
100
75
50
25
0
0.1
1
10
100
1000
Compuestos (ng/mL)
Compuesto A
CsA
ETC
MTX
Compuesto A+CsA
Compuesto A +ETC
Compuesto A+MTX

FIG. 4A

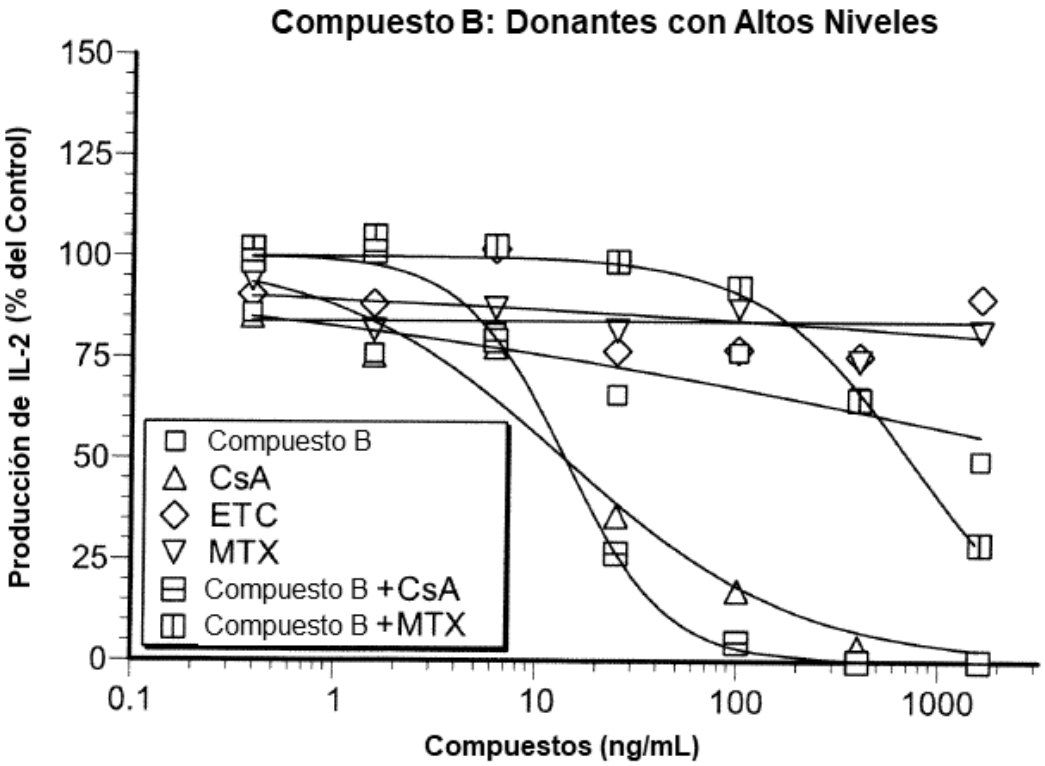

Compuesto B: Donantes con Altos Niveles
Producción de IL-2 (% del Control)
150
125
100
75
50
25
0
0.1
1
10
100
1000
Compuestos (ng/mL)
Compuesto B
CsA
ETC
MTX
Compuesto B +CsA
Compuesto B +MTX

FIG. 4B

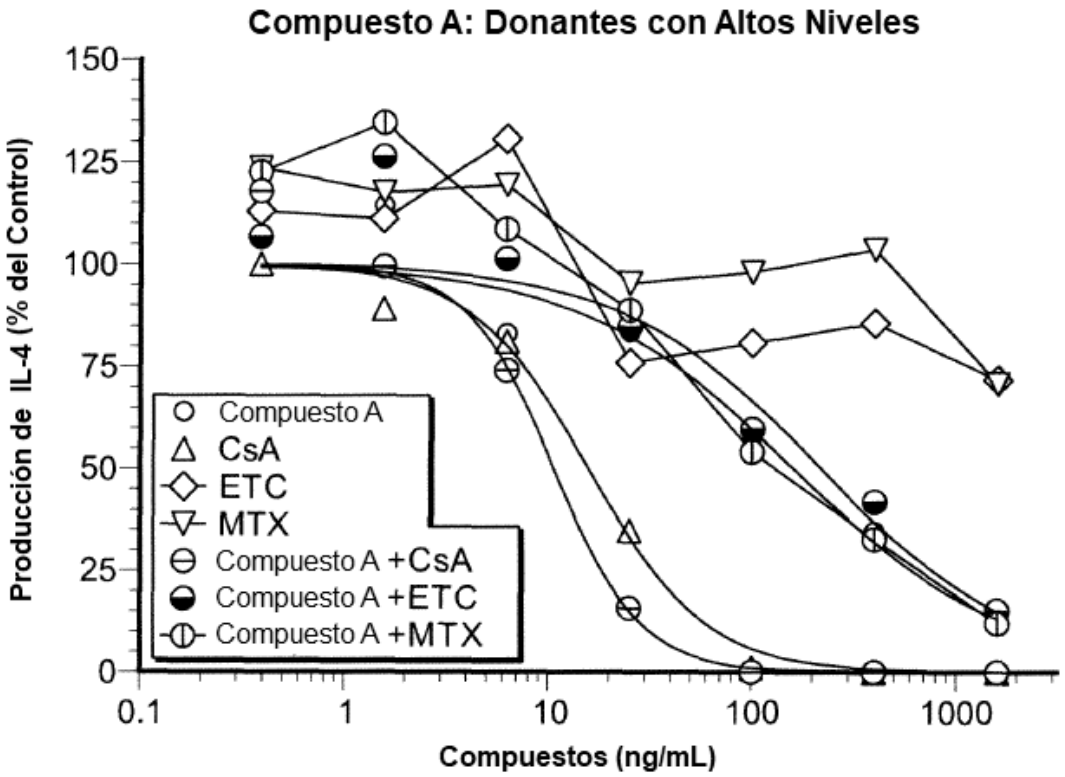

Compuesto A: Donantes con Altos Niveles
Producción de IL-4 (% del Control)
150
125
100
75
50
25
0
0.1
1
10
100
1000
Compuestos (ng/mL)
Compuesto A
CsA
ETC
MTX
Compuesto A +CsA
Compuesto A +ETC
Compuesto A +MTX

FIG. 5A

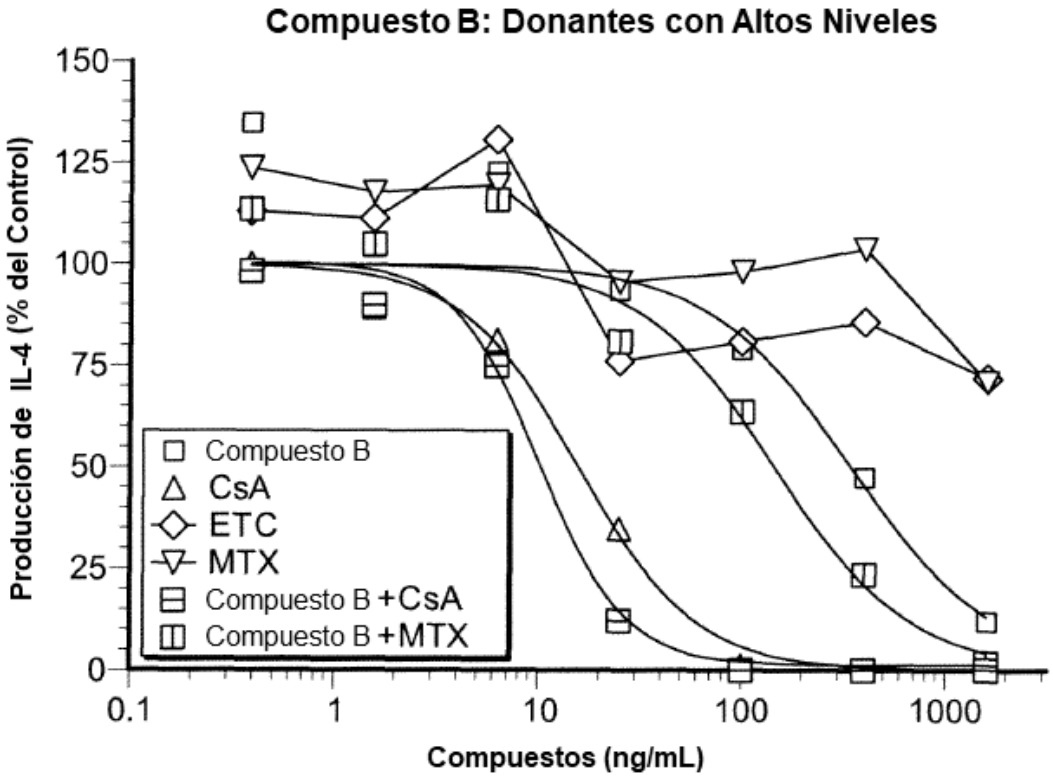

Compuesto B: Donantes con Altos Niveles
Producción de IL-4 (% del Control)
150
125
100
75
50
25
0
0.1
1
10
100
1000
Compuestos (ng/mL)
Compuesto B
CsA
ETC
MTX
Compuesto B +CsA
Compuesto B +MTX

FIG. 5B

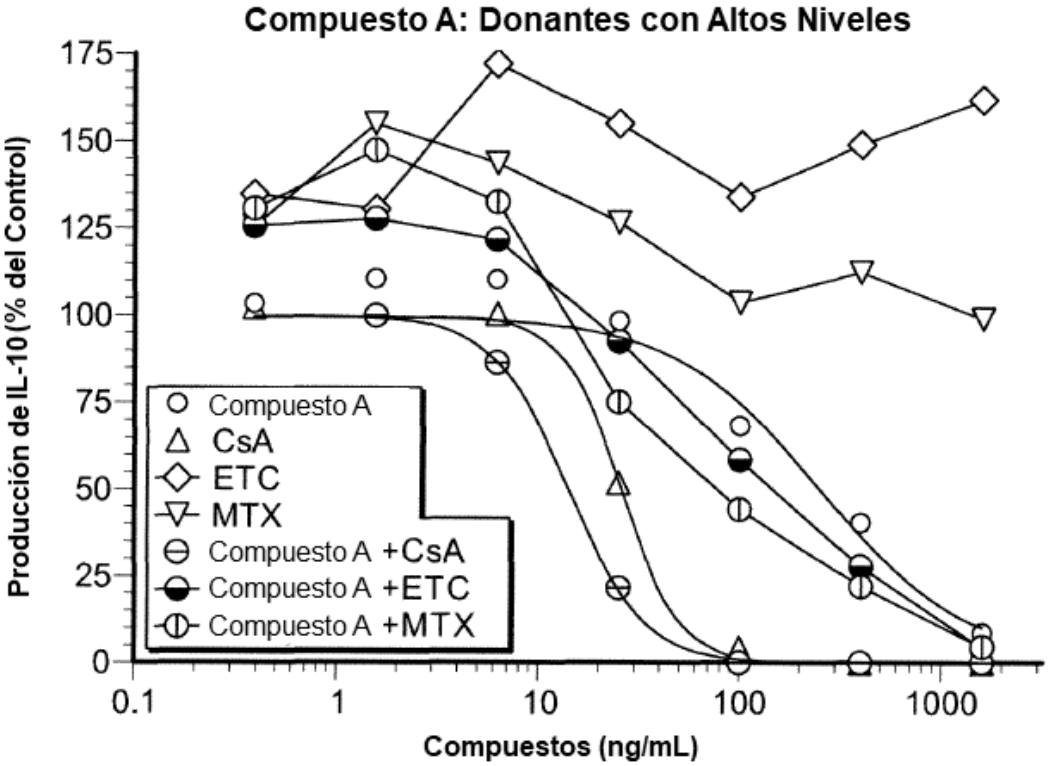

Compuesto A: Donantes con Altos Niveles
Producción de IL-10 (% del Control)
175
150
125
100
75
50
25
0
0.1
1
10
100
1000
Compuestos (ng/mL)
Compuesto A
CsA
ETC
MTX
Compuesto A +CsA
Compuesto A +ETC
Compuesto A +MTX

FIG. 6A

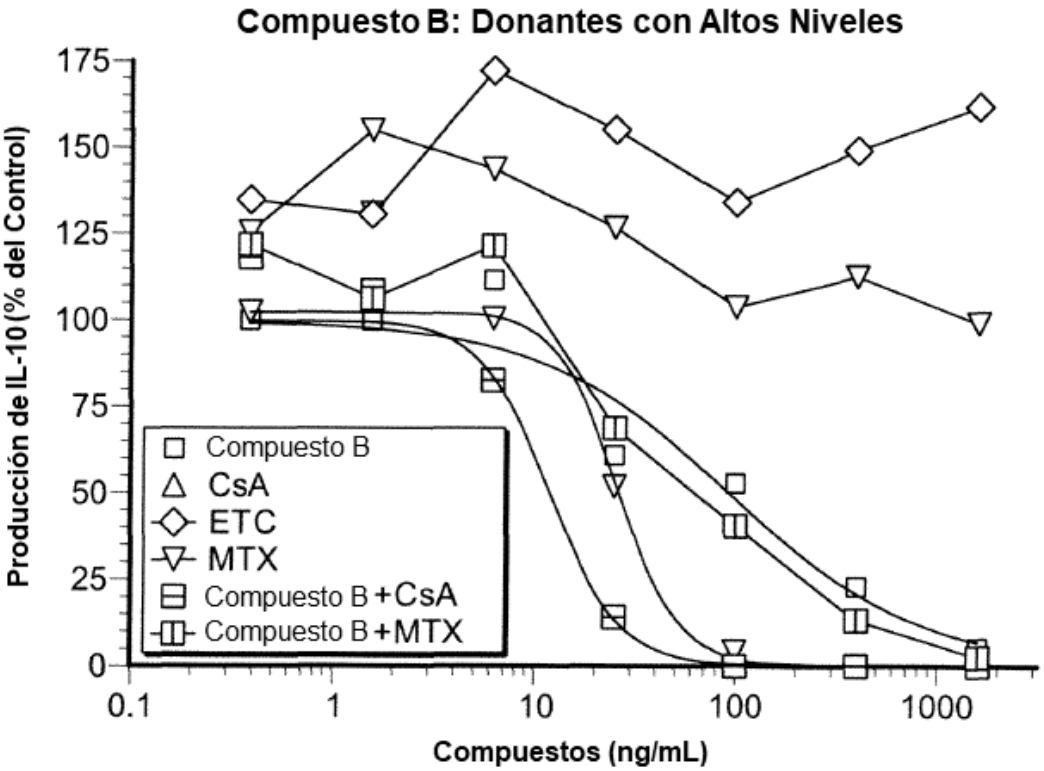

Compuesto B: Donantes con Altos Niveles
Producción de IL-10 (% del Control)
175
150
125
100
75
50
25
0
0.1
1
10
100
1000
Compuestos (ng/mL)
Compuesto B
CsA
ETC
MTX
Compuesto B +CsA
Compuesto B +MTX

FIG. 6B

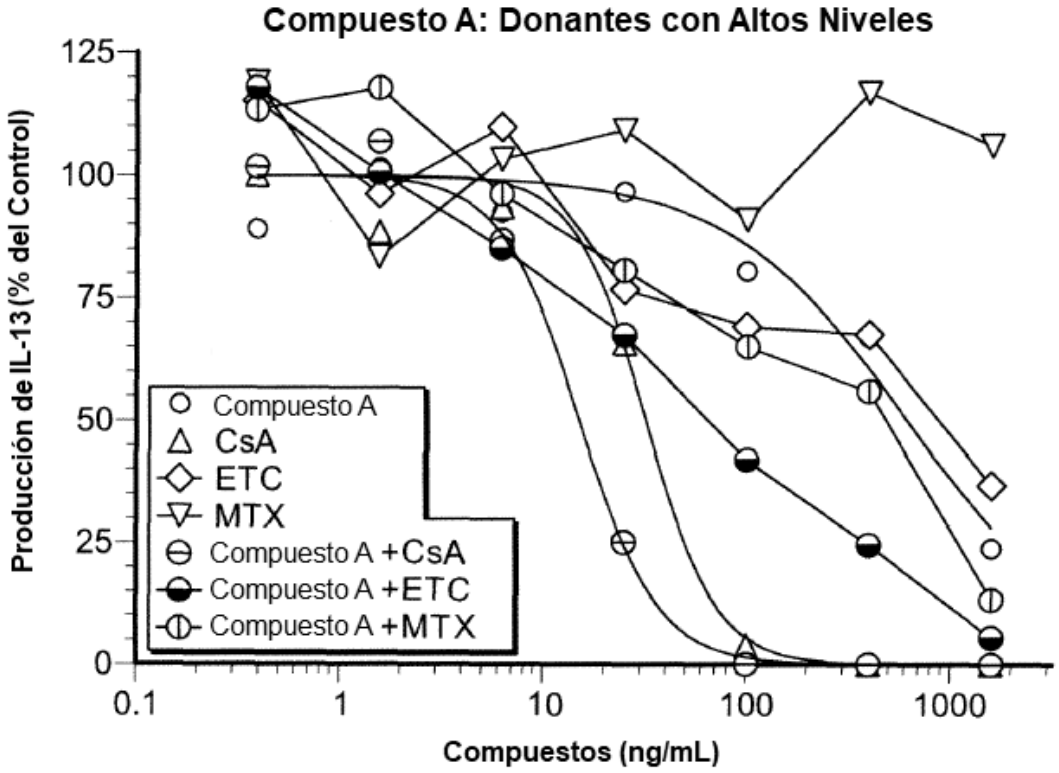

Compuesto A: Donantes con Altos Niveles
Producción de IL-13 (% del Control)
125
100
75
50
25
0
0.1
1
10
100
1000
Compuestos (ng/mL)
Compuesto A
CsA
ETC
MTX
Compuesto A +CsA
Compuesto A +ETC
Compuesto A +MTX

FIG. 7A

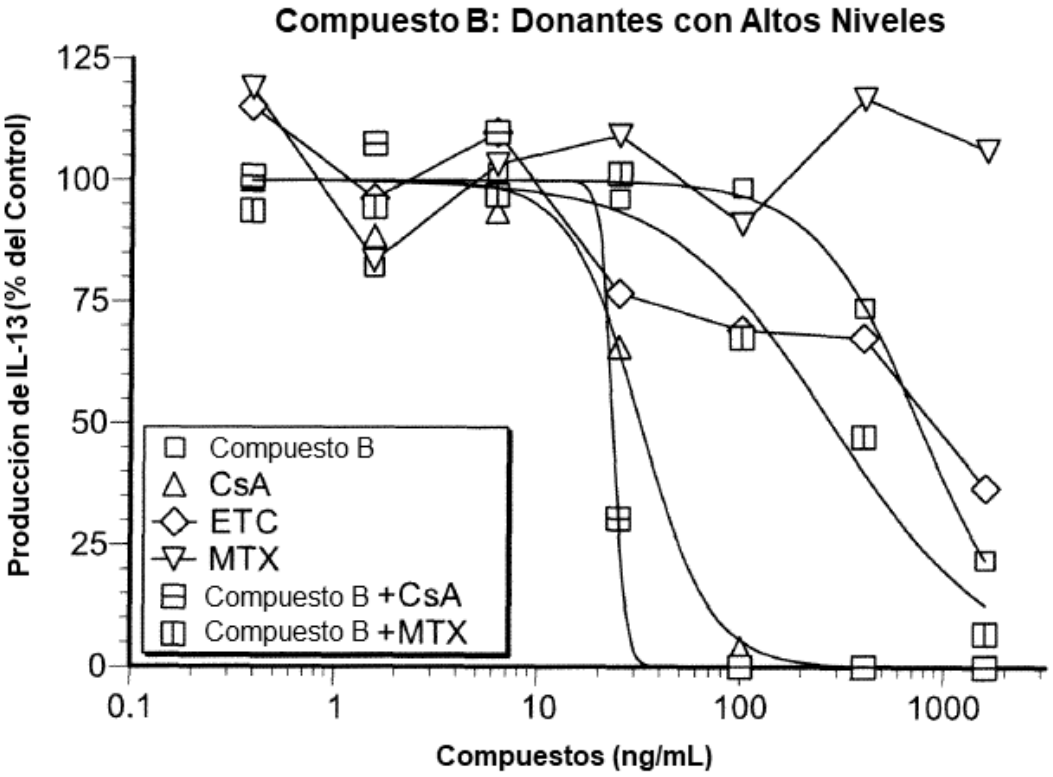

Compuesto B: Donantes con Altos Niveles
Producción de IL-13 (% del Control)
125
100
75
50
25
0
0.1
1
10
100
1000
Compuestos (ng/mL)
Compuesto B
CsA
ETC
MTX
Compuesto B +CsA
Compuesto B +MTX

FIG. 7B

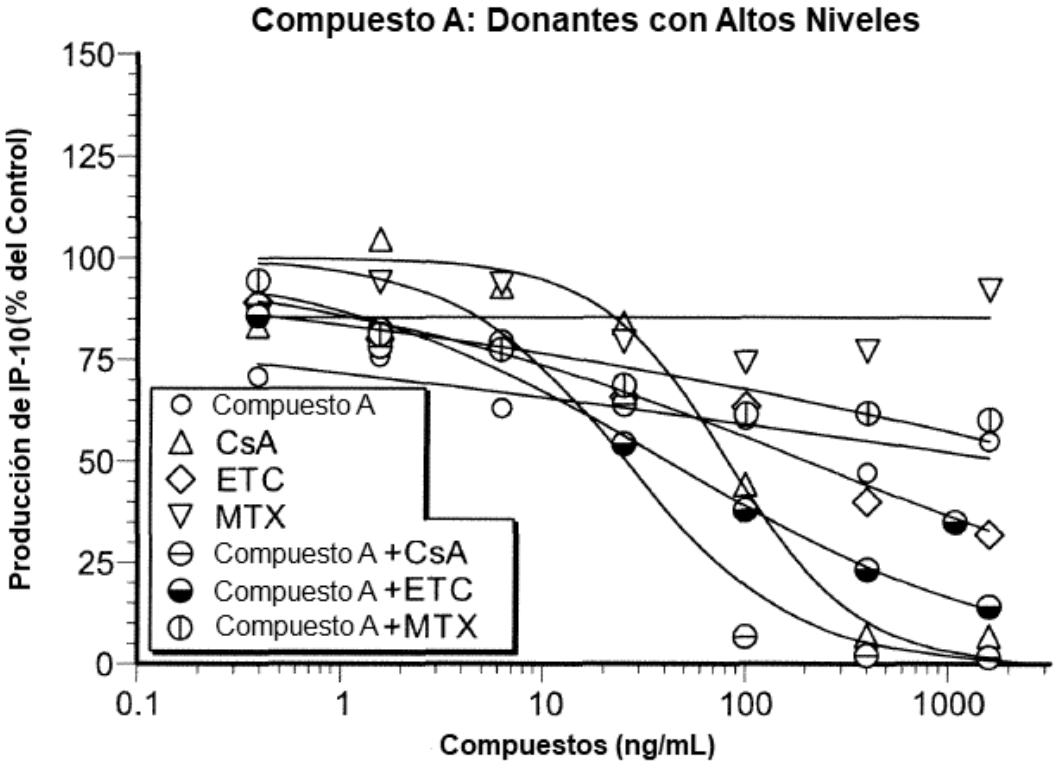

Compuesto A: Donantes con Altos Niveles
Producción de IP-10(% del Control)
150
125
100
75
50
25
0
0.1
1
10
100
1000
Compuestos (ng/mL)
Compuesto A
CsA
ETC
MTX
Compuesto A +CsA
Compuesto A +ETC
Compuesto A +MTX

FIG. 8A

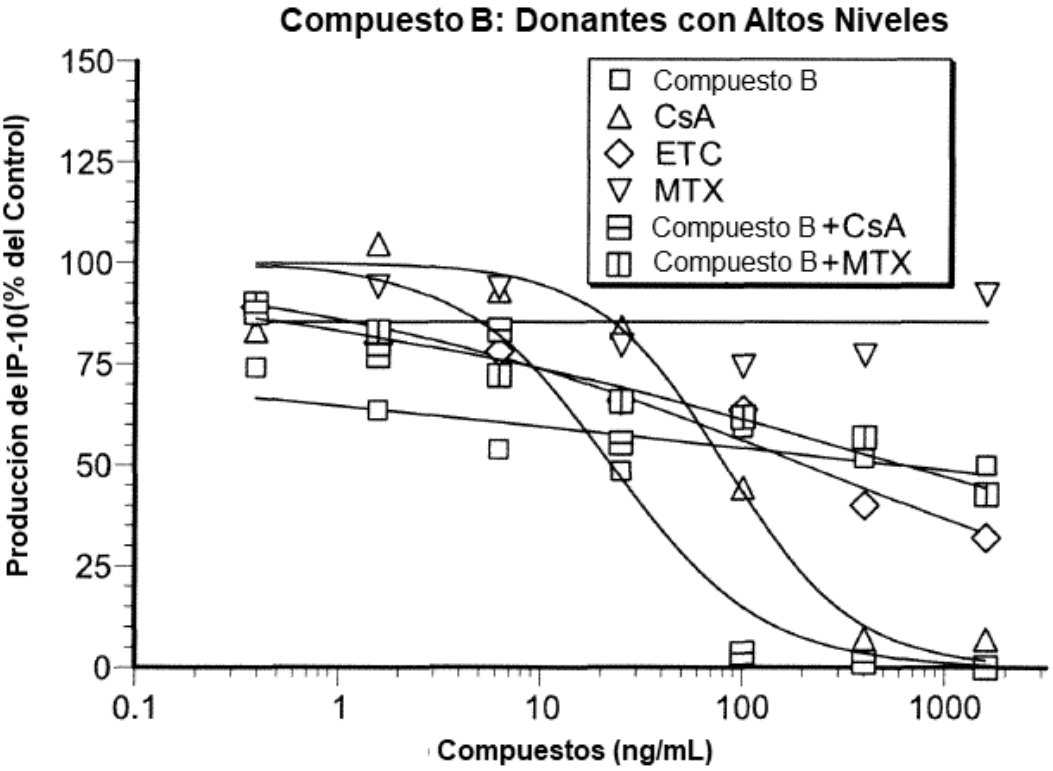

Compuesto B: Donantes con Altos Niveles
Producción de IP-10(% del Control)
150
125
100
75
50
25
0
0.1
1
10
100
1000
Compuestos (ng/mL)
Compuesto B
CsA
ETC
MTX
Compuesto B +CsA
Compuesto B +MTX

FIG. 8B

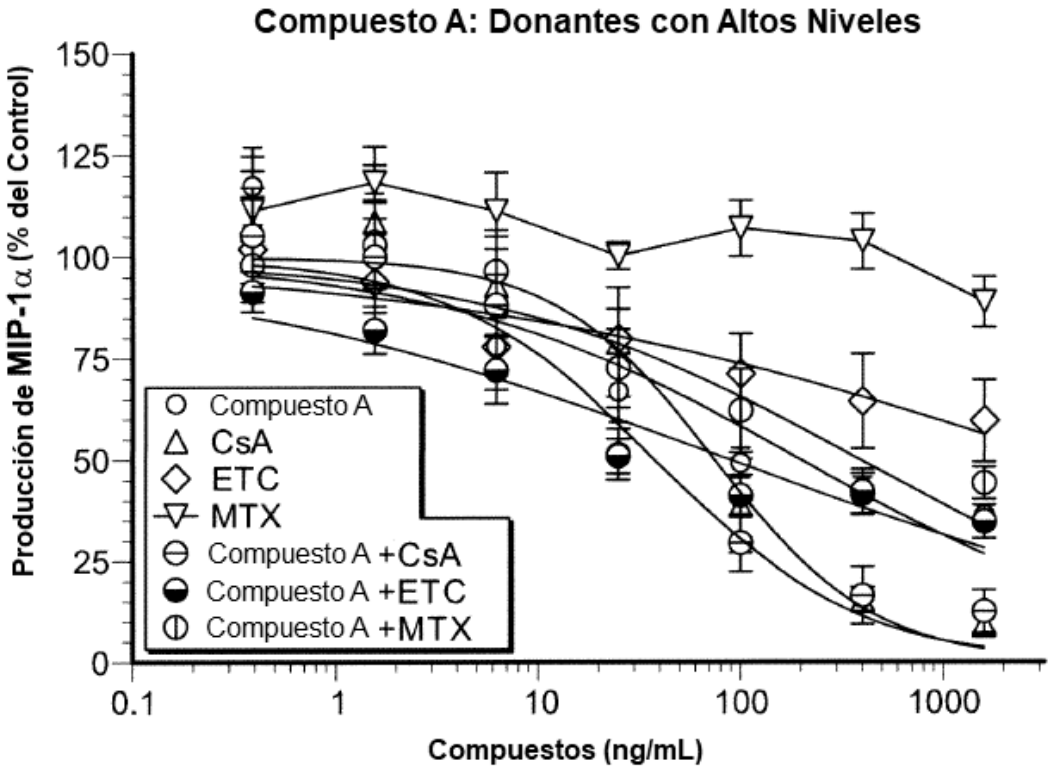

Compuesto A: Donantes con Altos Niveles
Producción de MIP-1α (% del Control)
150
125
100
75
50
25
0
0.1
1
10
100
1000
Compuestos (ng/mL)
Compuesto A
CsA
ETC
MTX
Compuesto A +CsA
Compuesto A +ETC
Compuesto A +MTX

FIG. 9A

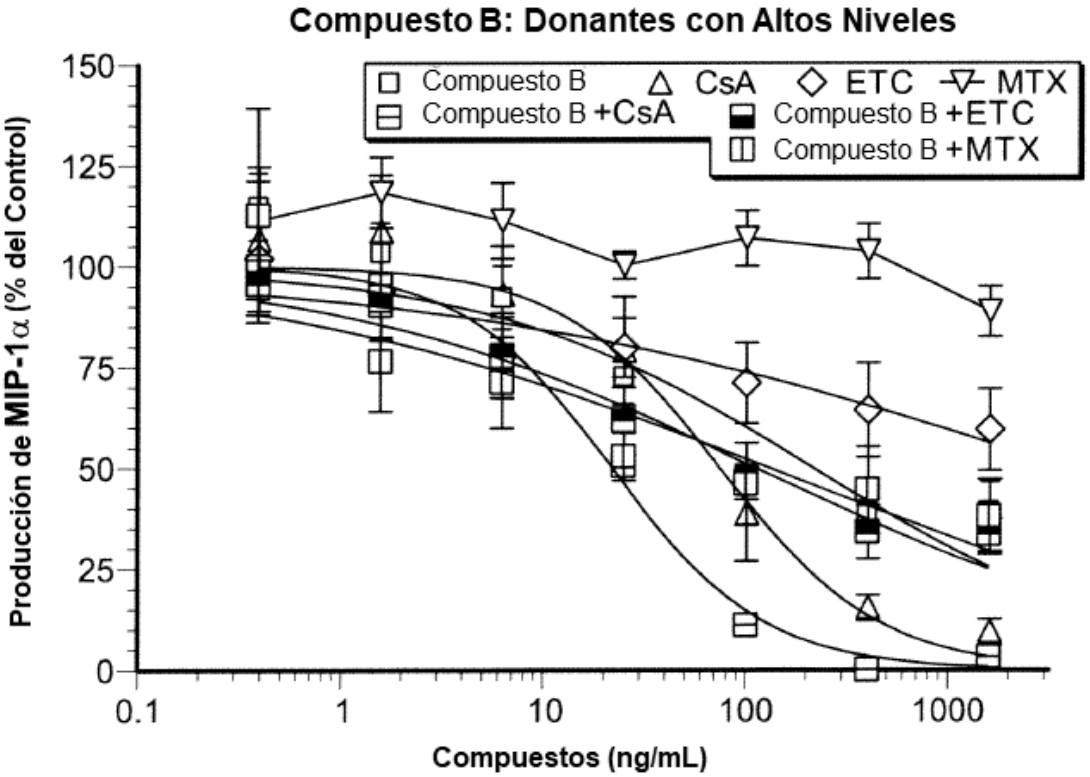

Compuesto B: Donantes con Altos Niveles
Producción de MIP-1α (% del Control)
150
125
100
75
50
25
0
0.1
1
10
100
1000
Compuestos (ng/mL)
Compuesto B
CsA
ETC
MTX
Compuesto B +CsA
Compuesto B +ETC
Compuesto B +MTX

FIG. 9B

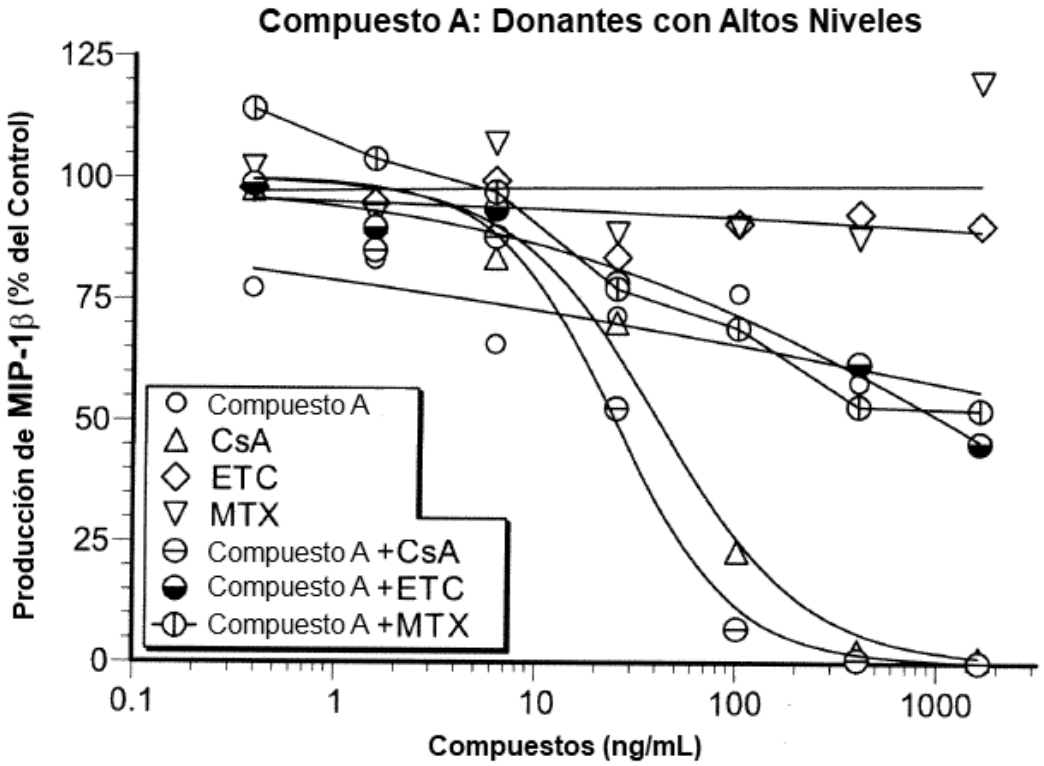


FIG. 10A

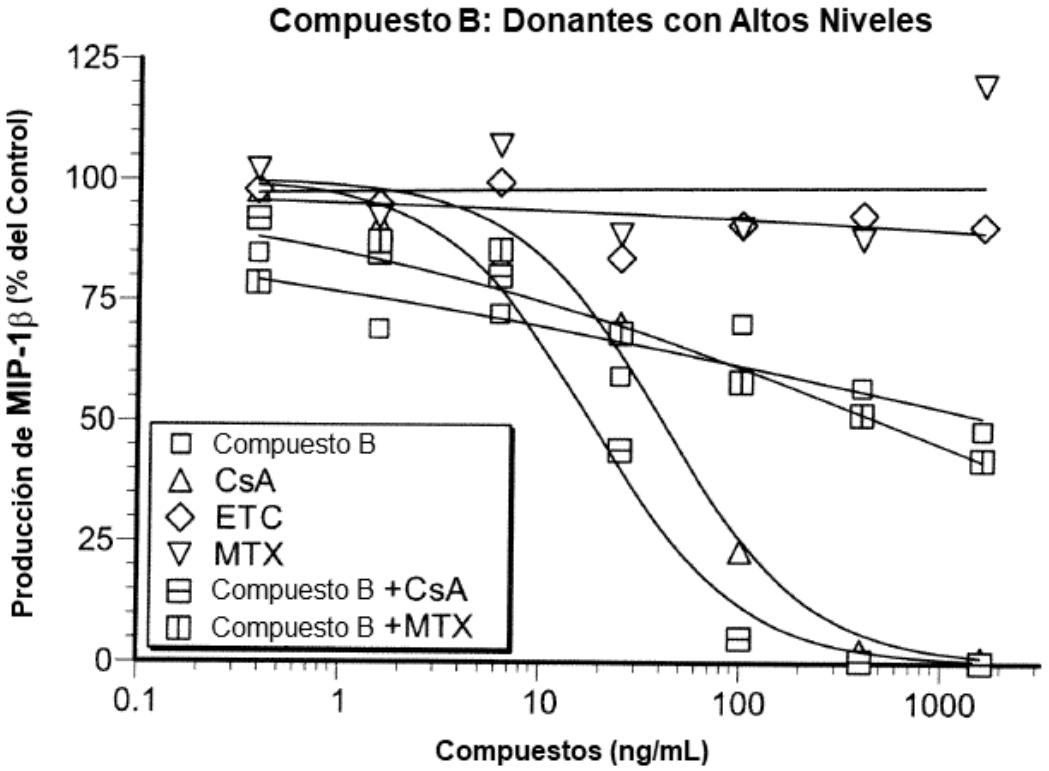


FIG. 10B

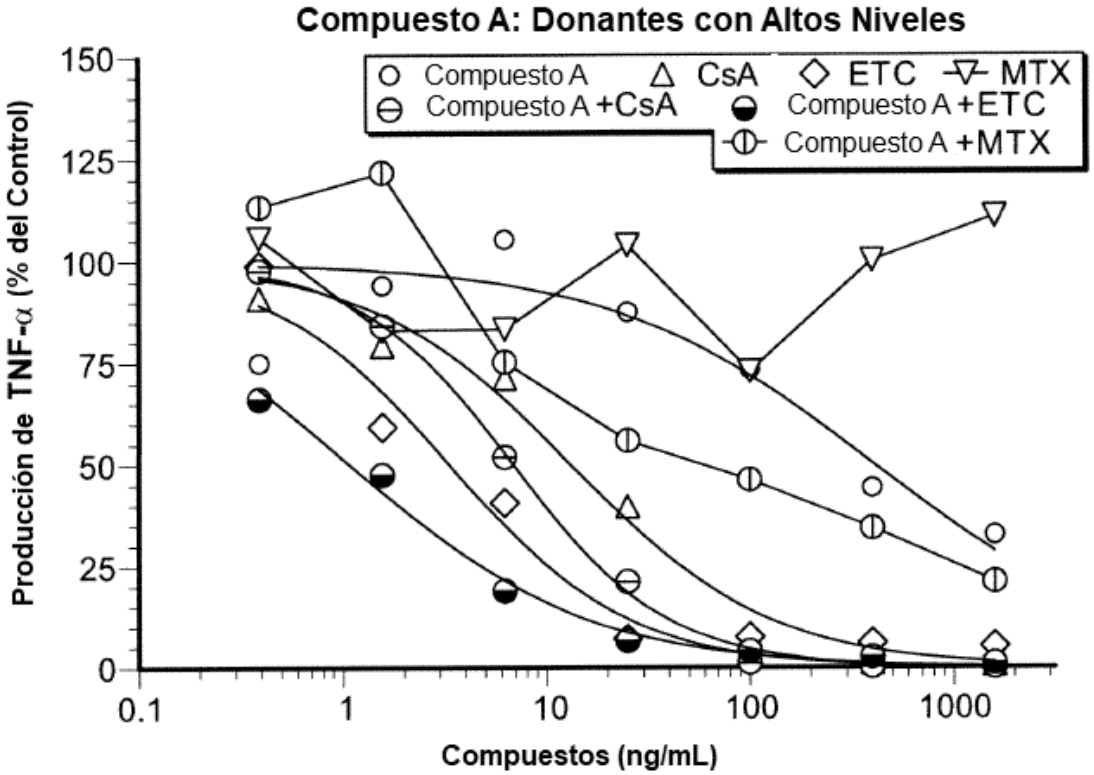


FIG. 11A

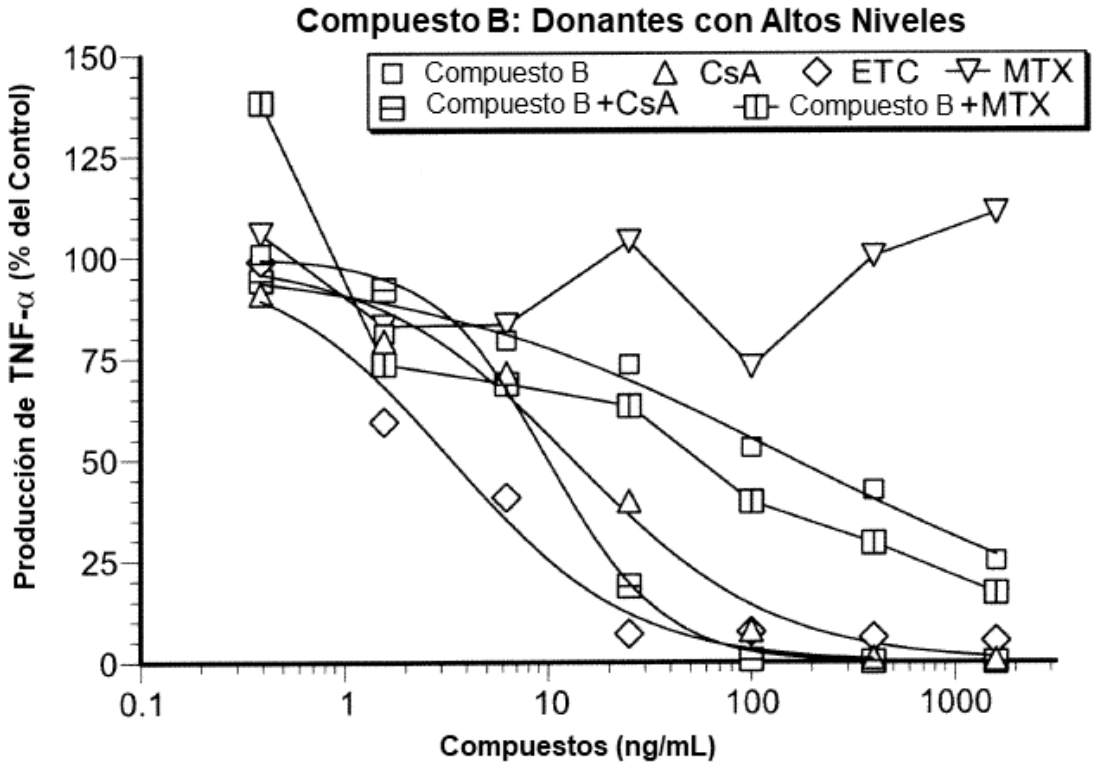


FIG. 11B

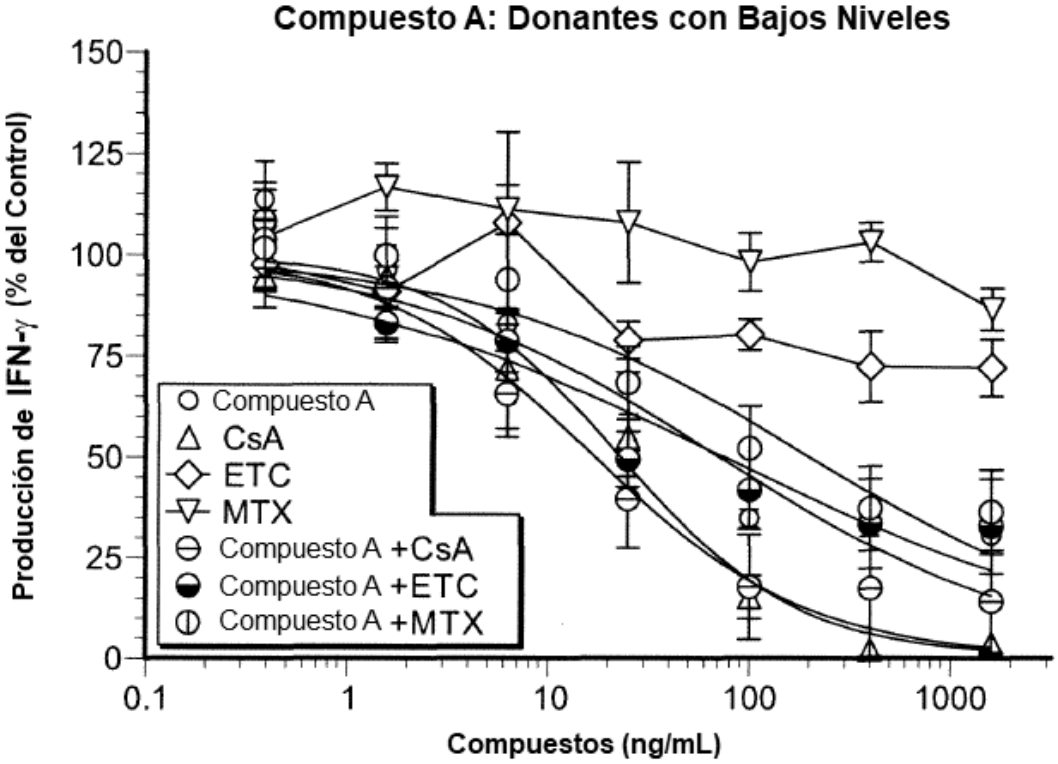


FIG. 12A

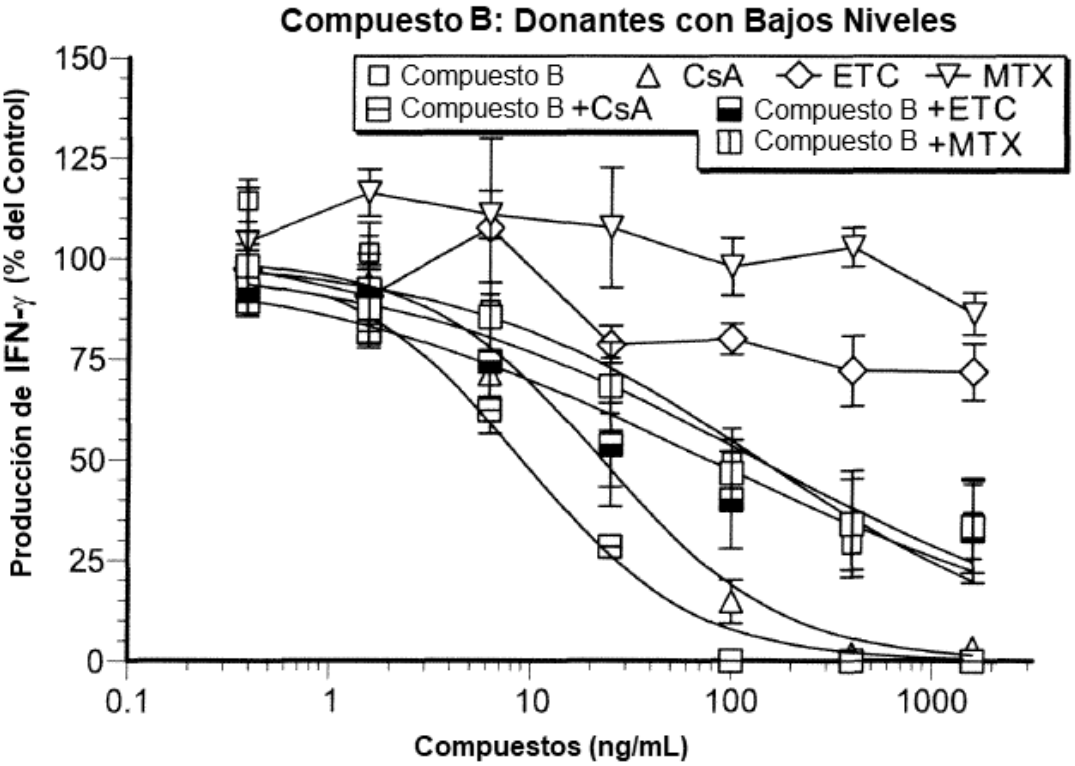


FIG. 12B

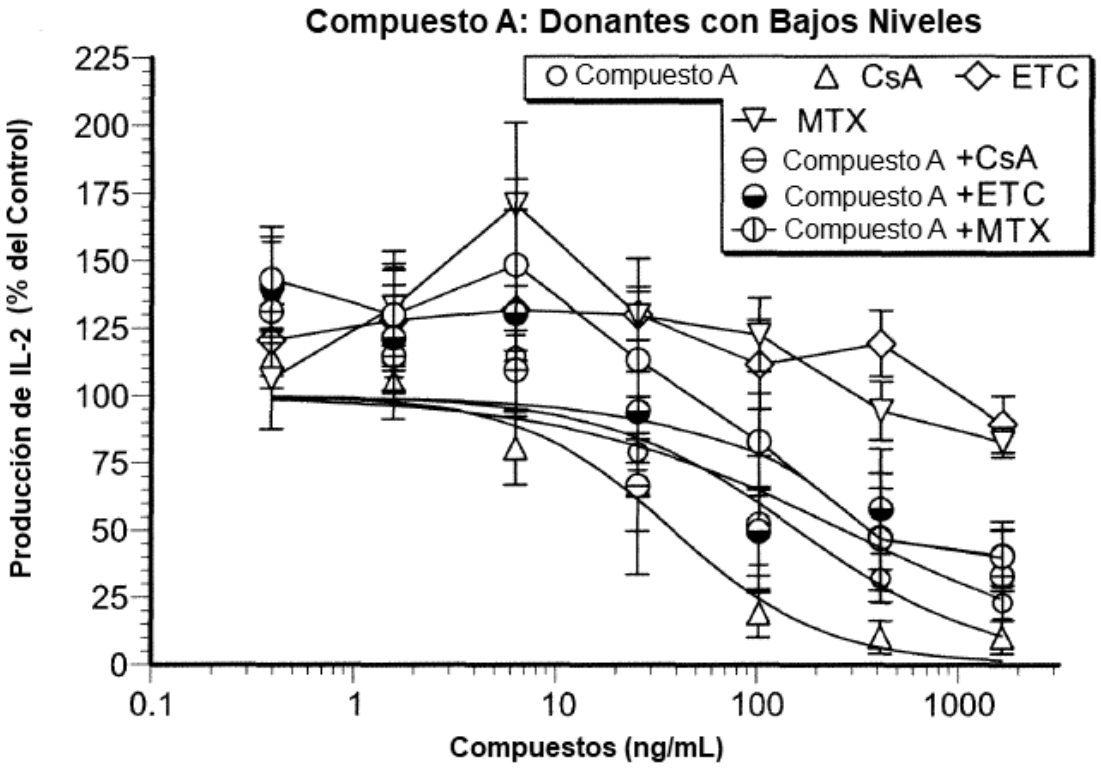


FIG. 13A

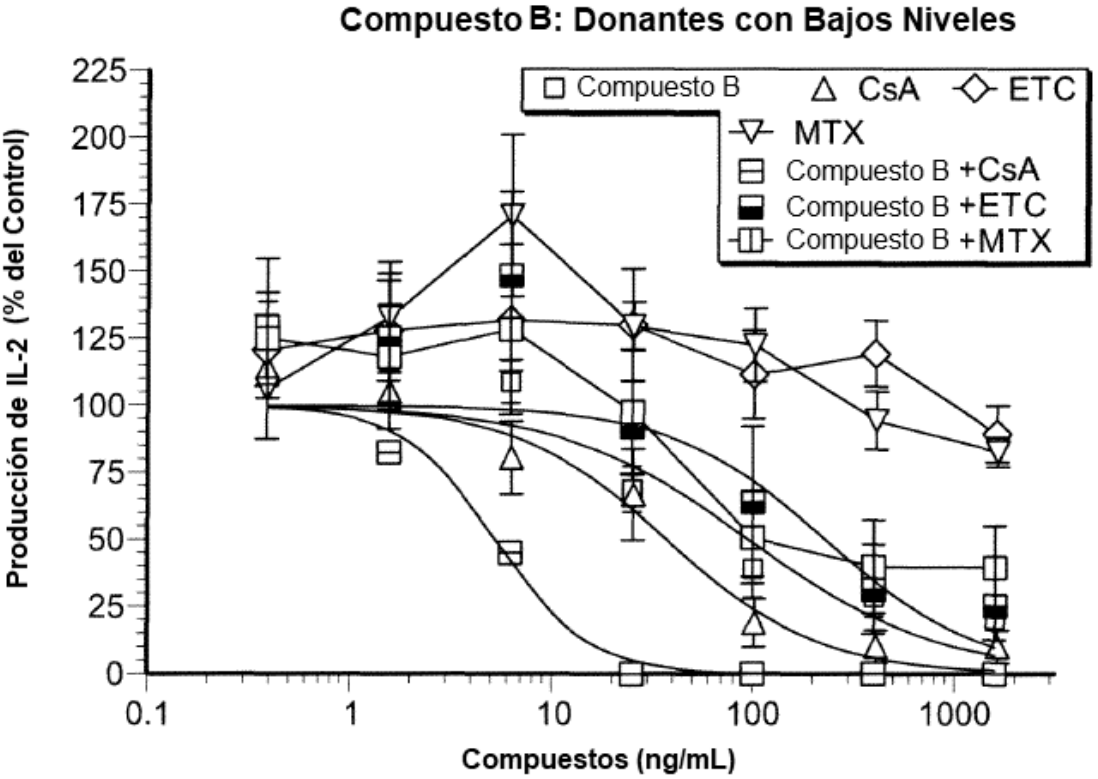


FIG. 13B

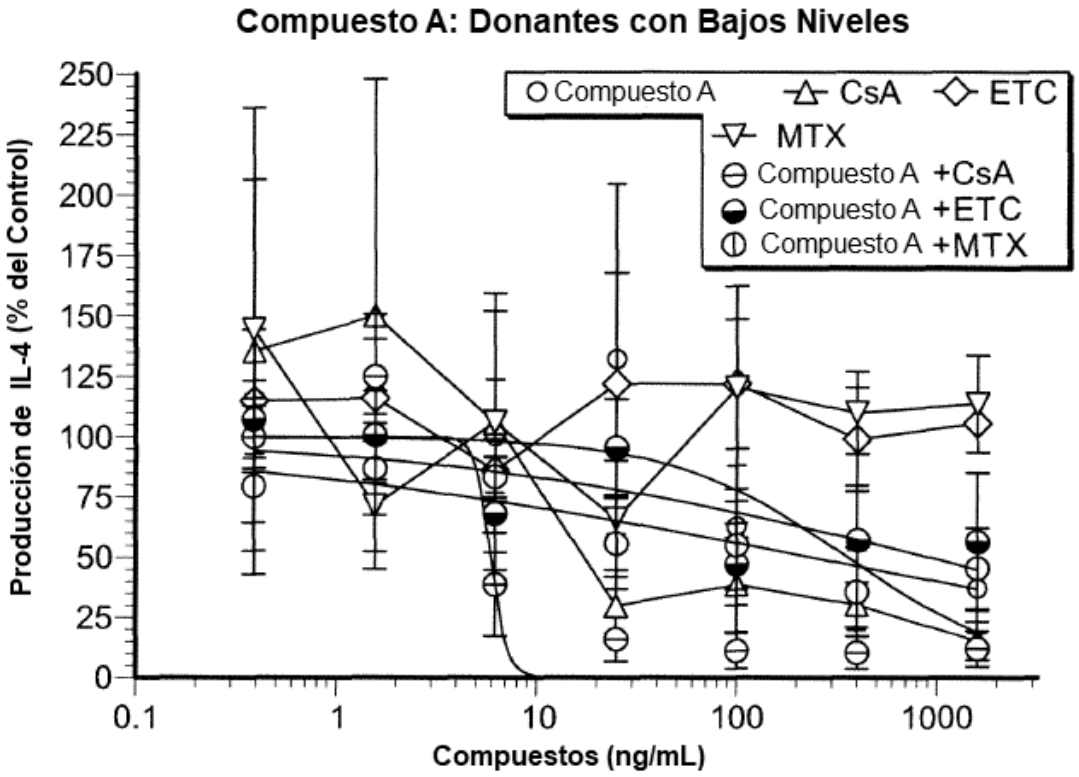


FIG. 14A

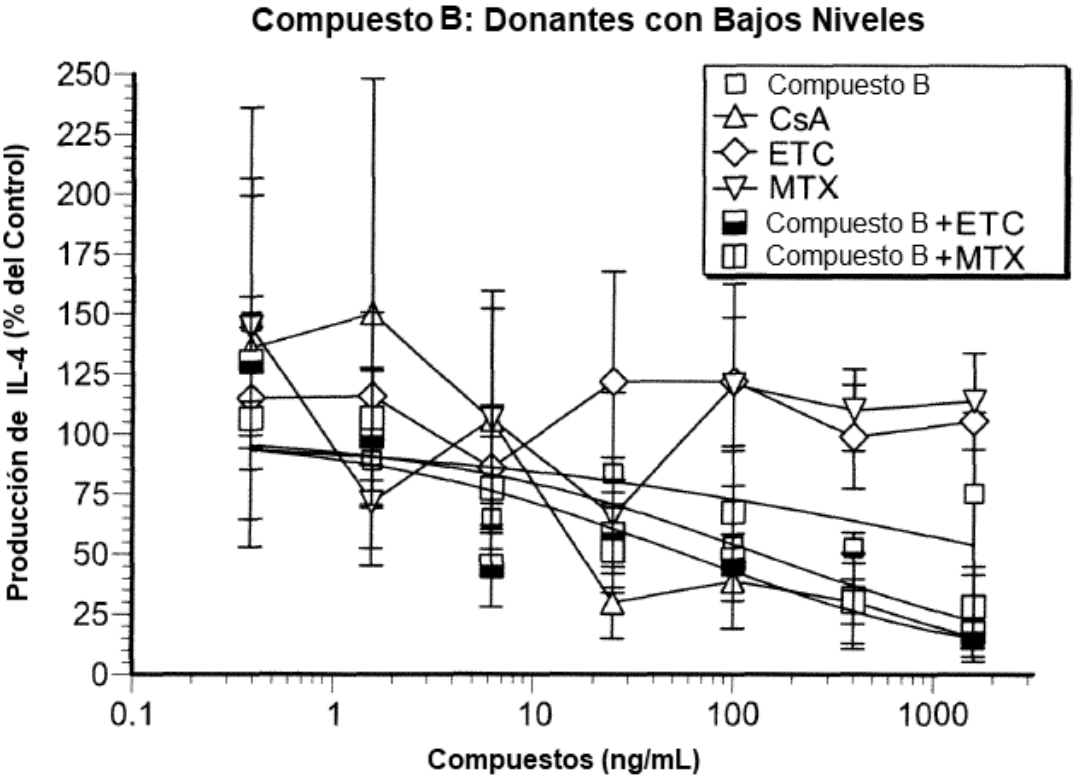


FIG. 14B

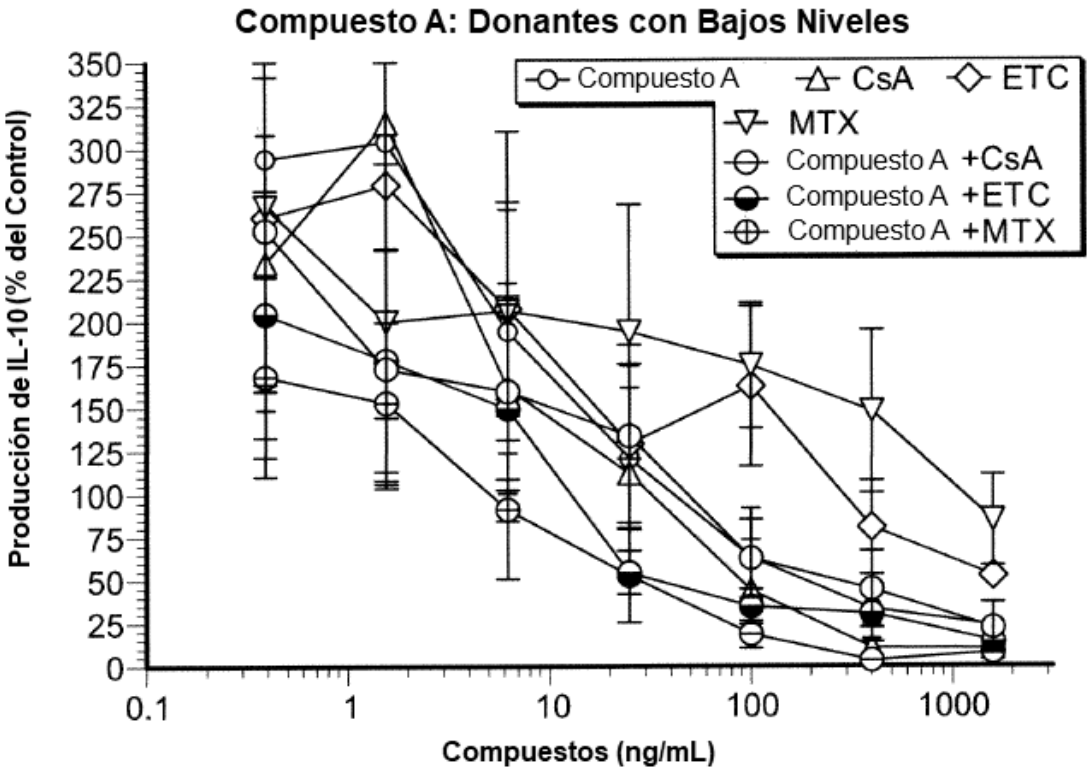


FIG. 15A

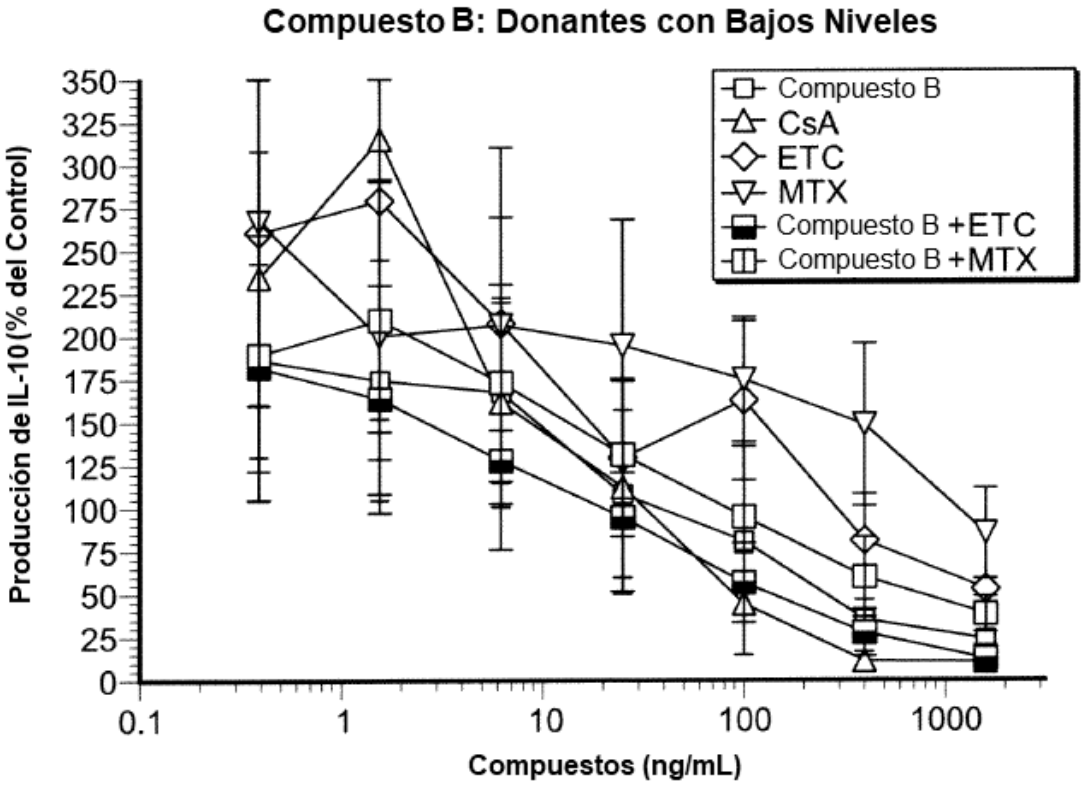


FIG. 15B

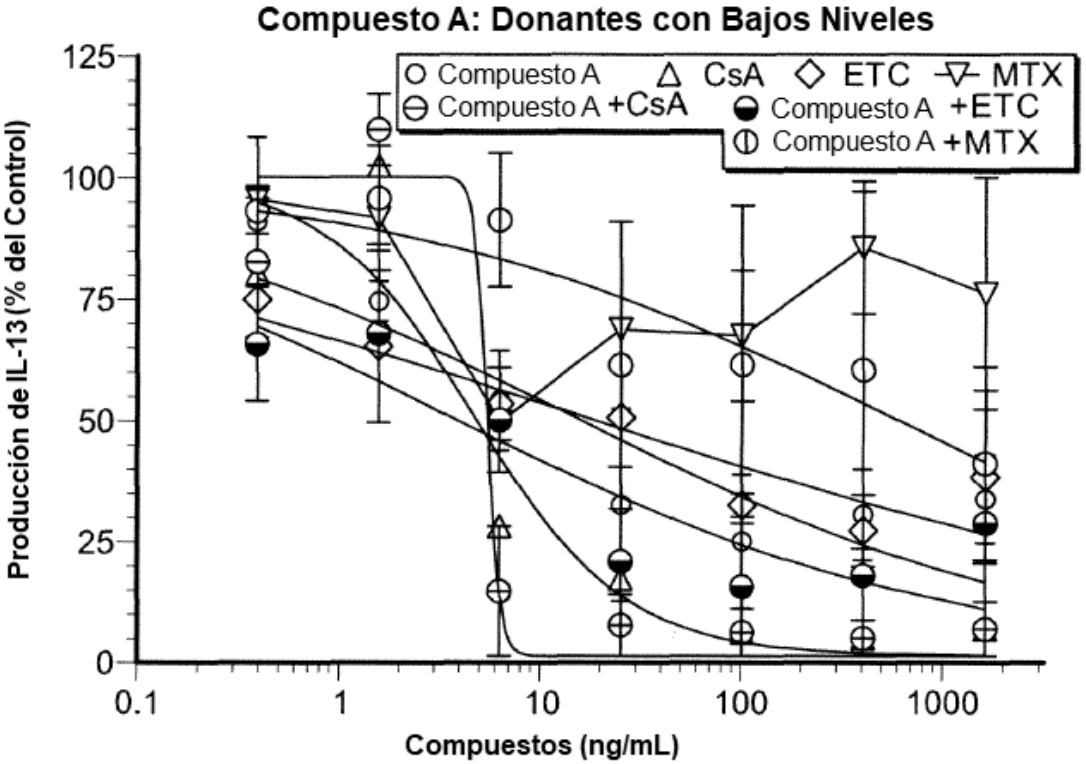


FIG. 16A

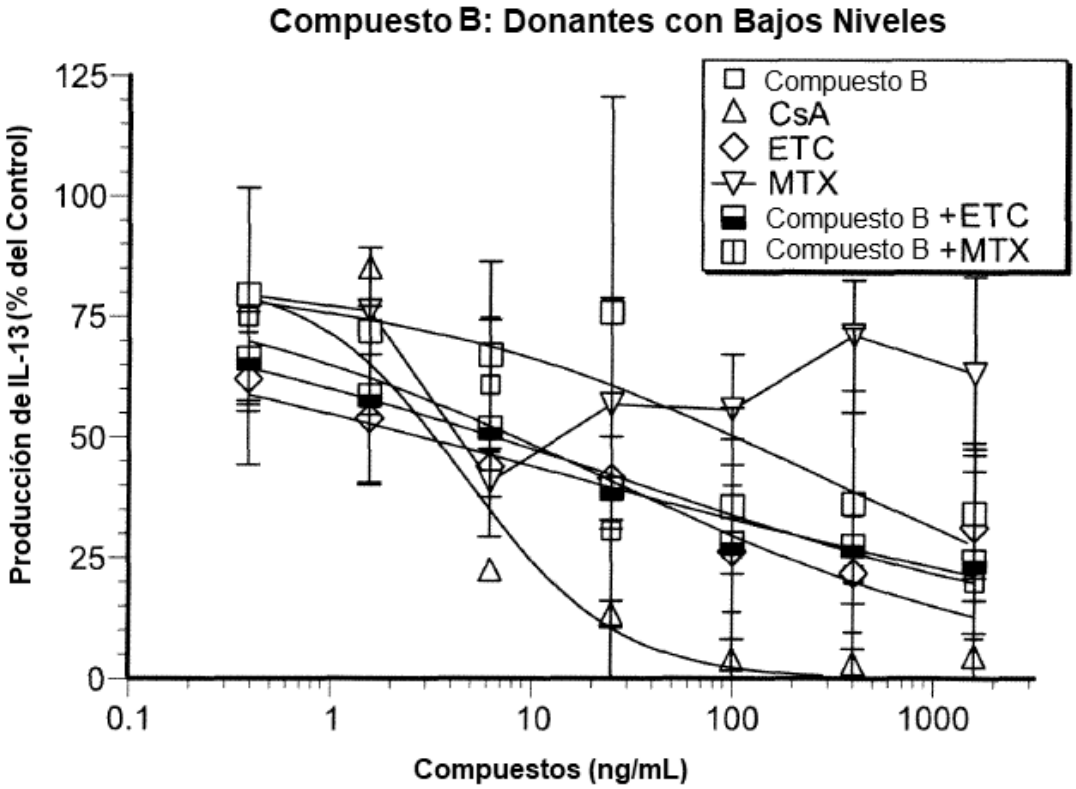


FIG. 16B

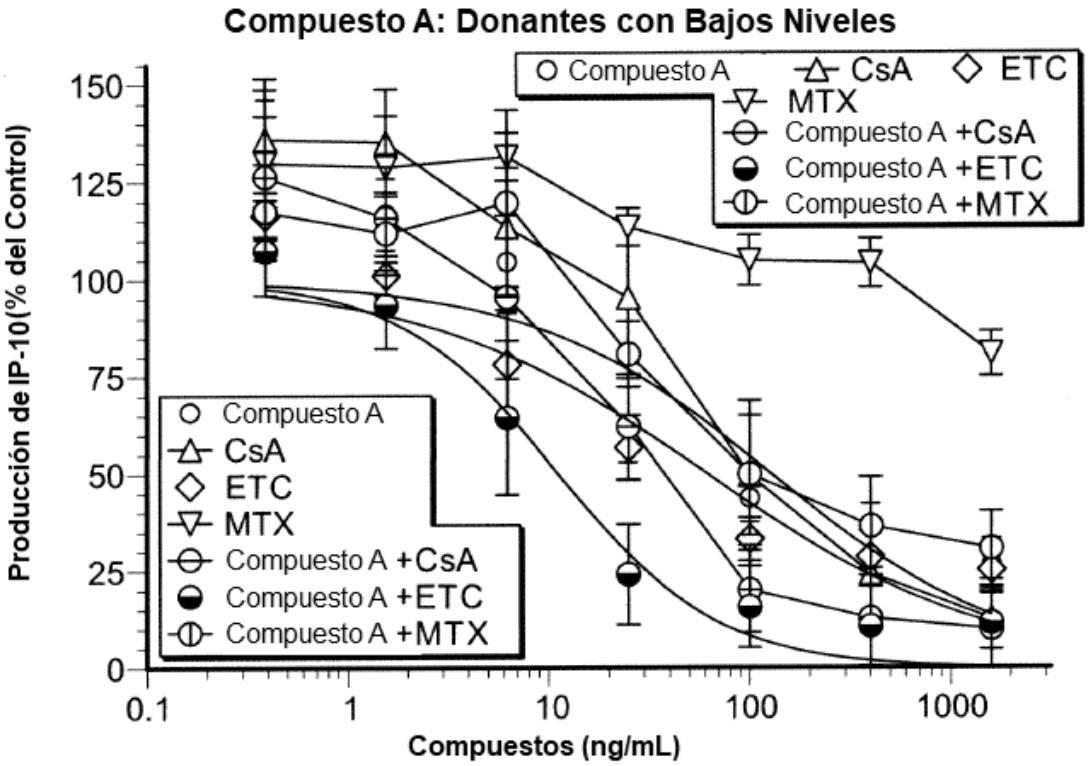


FIG. 17A

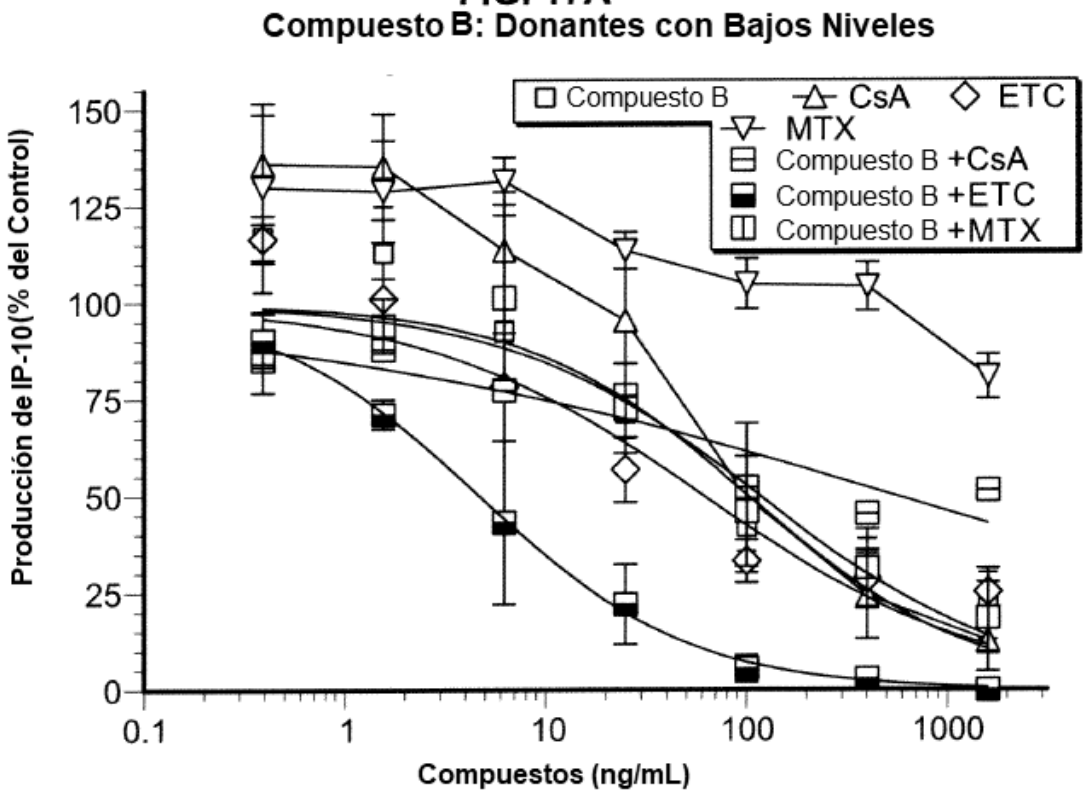


FIG. 17B

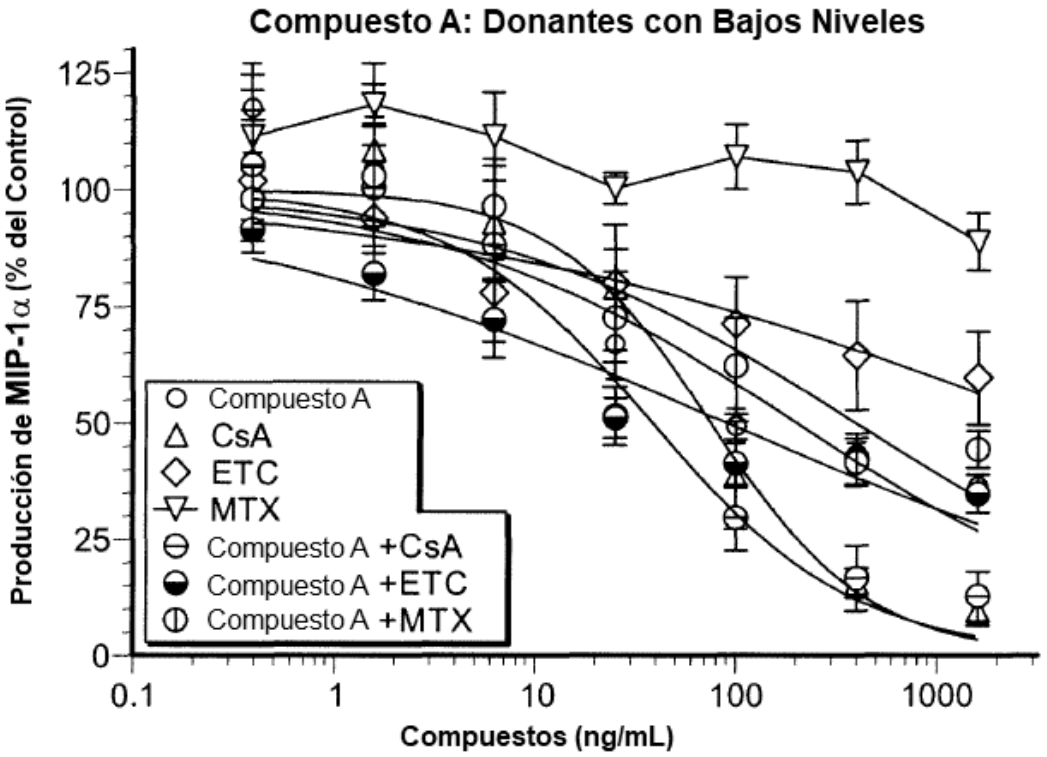


FIG. 18A

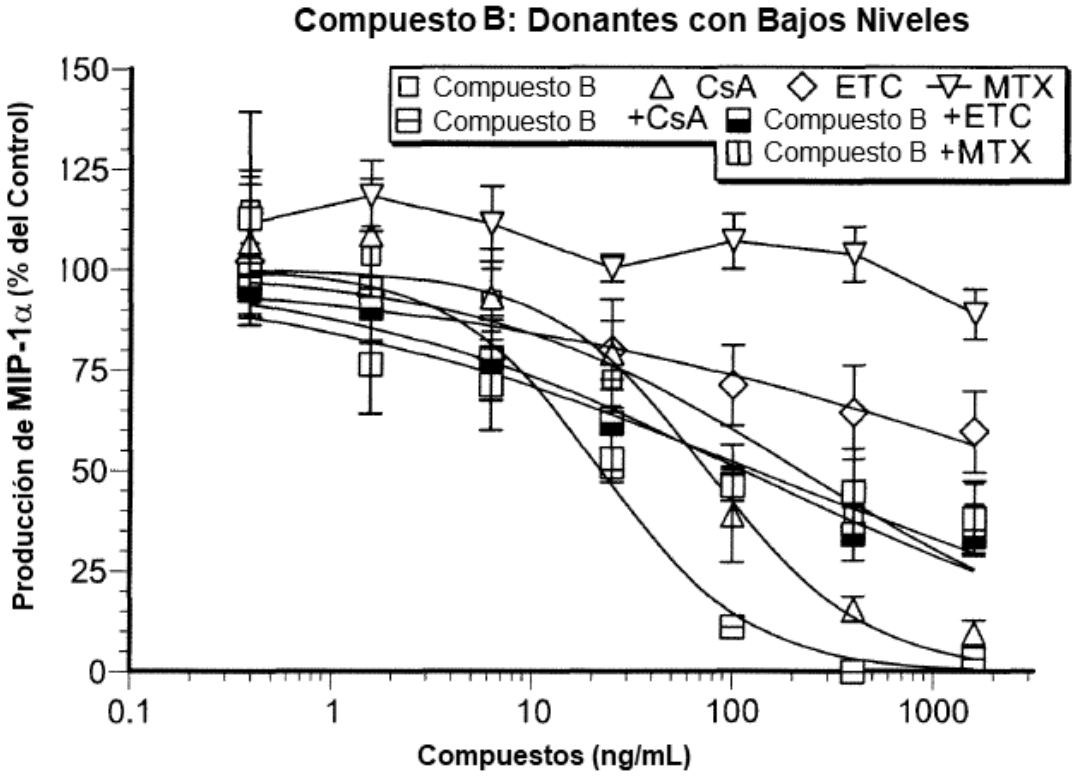


FIG. 18B

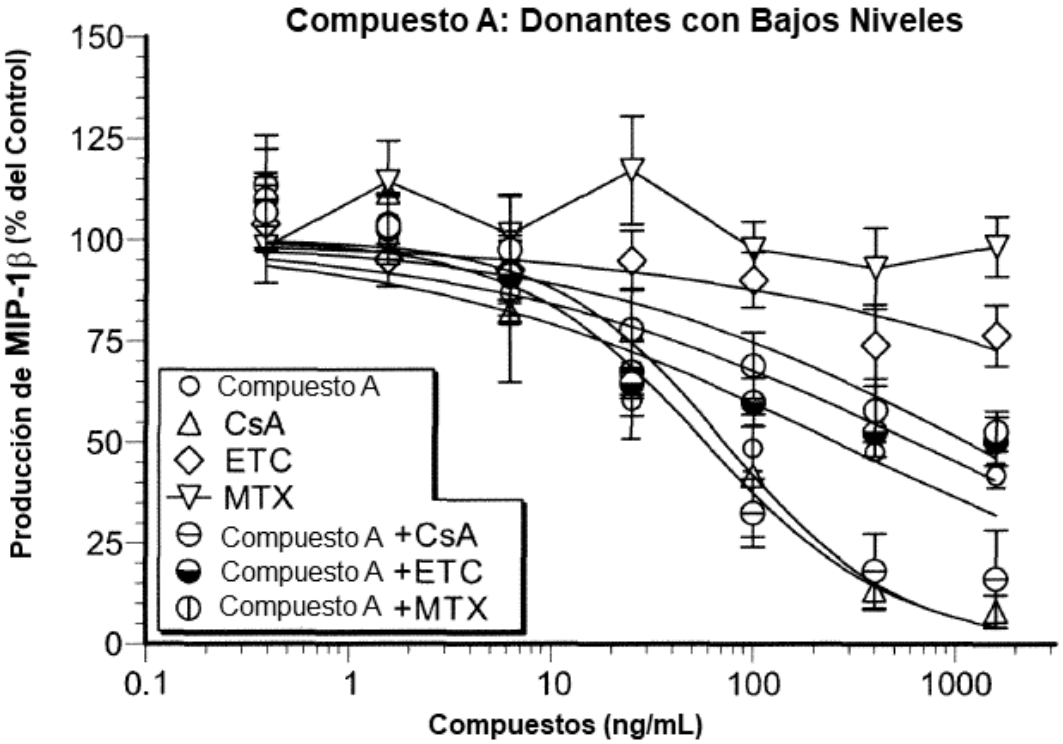


FIG. 19A

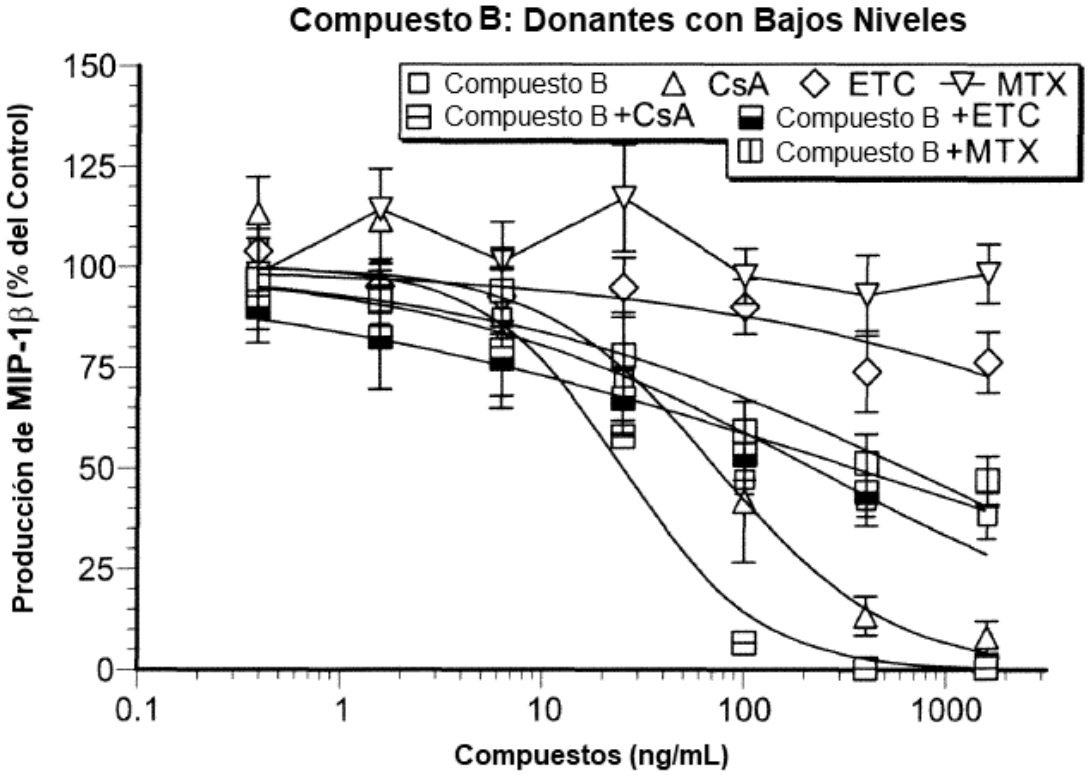


FIG. 19B

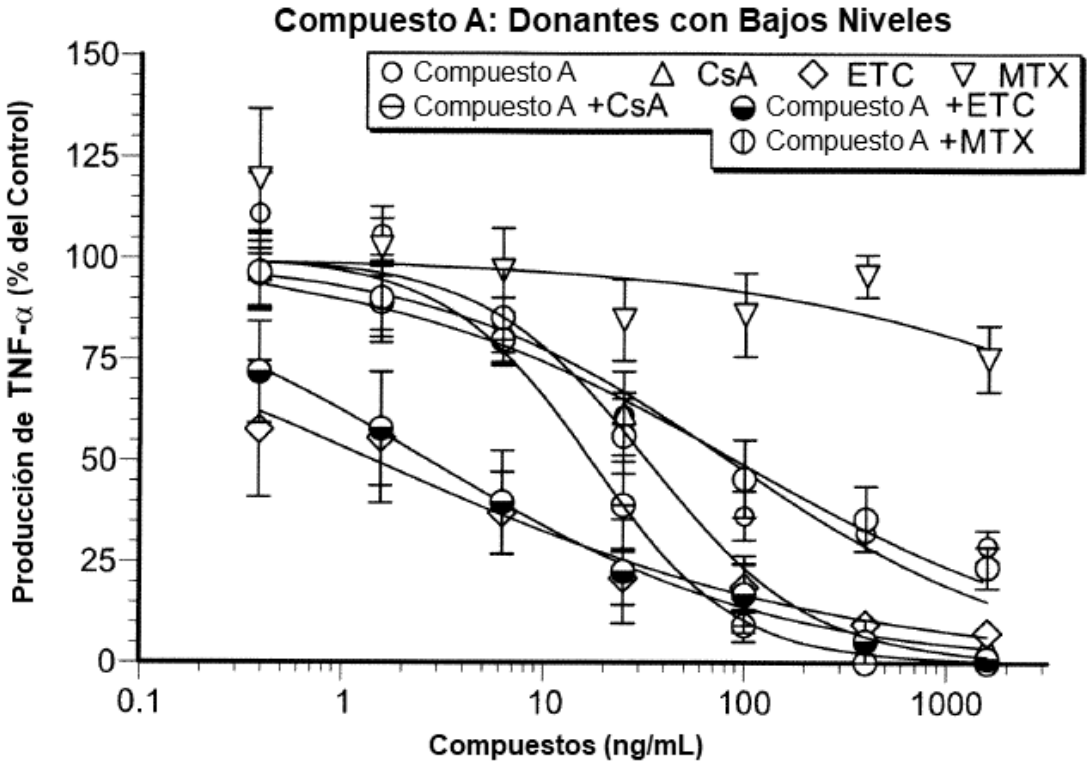


FIG. 20A

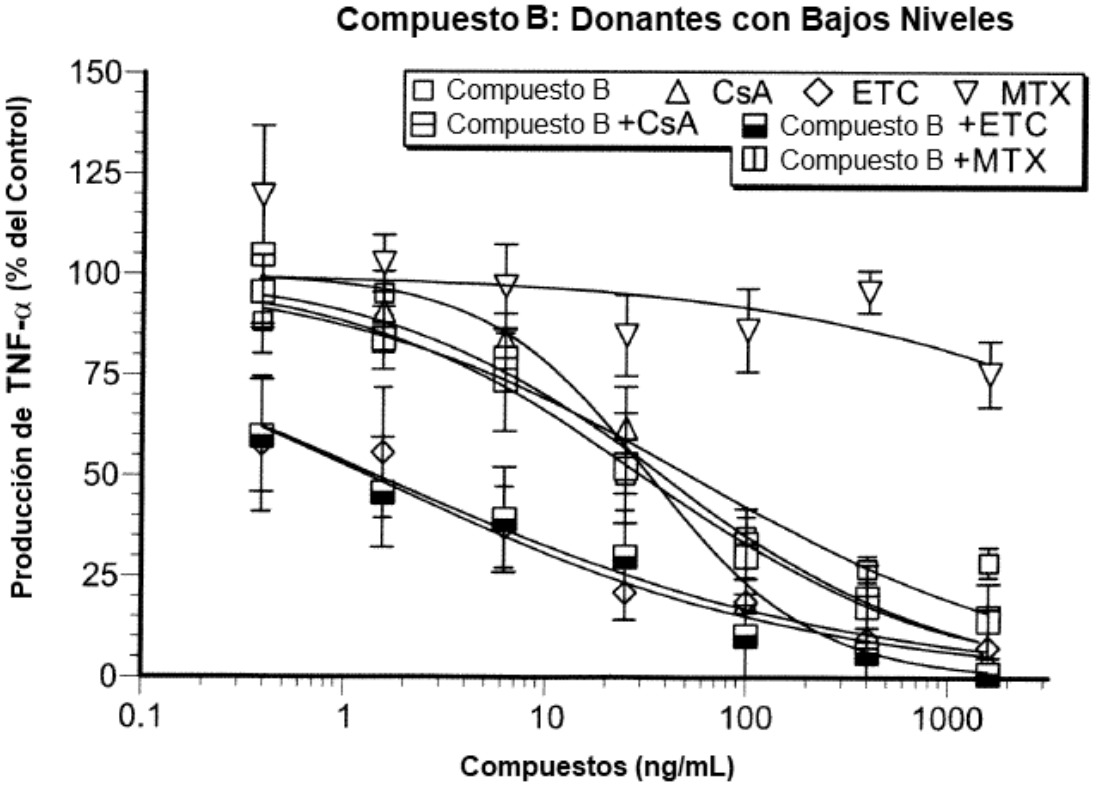


FIG. 20B

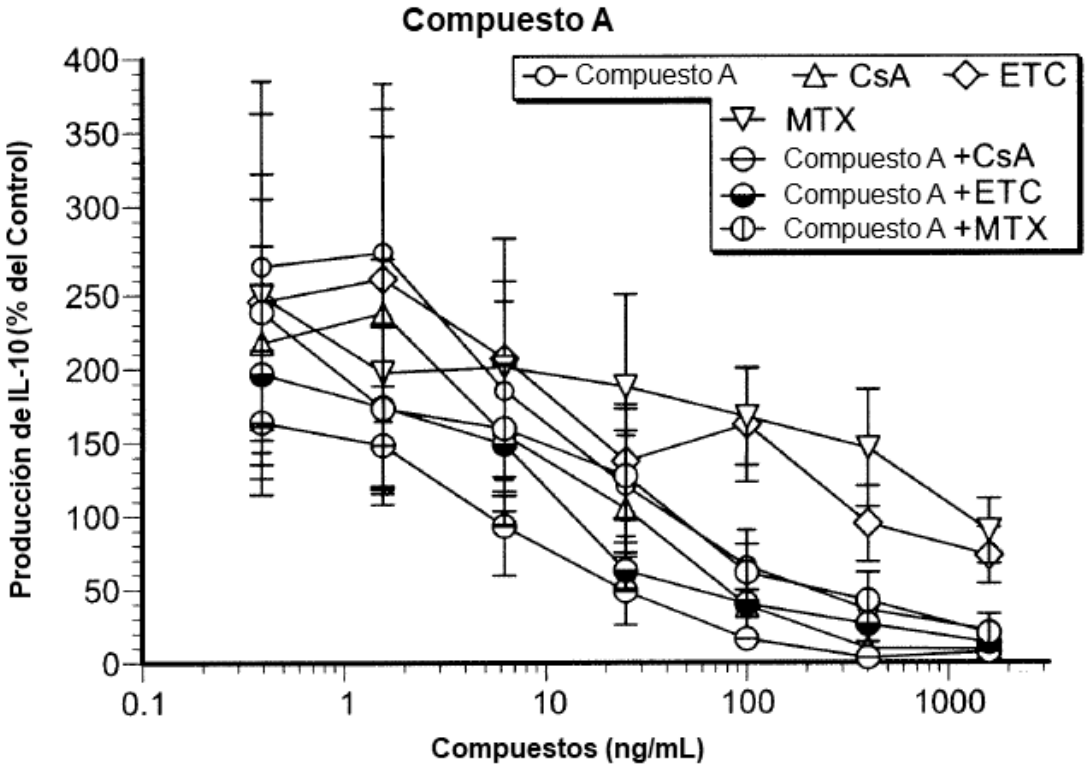


FIG. 21A

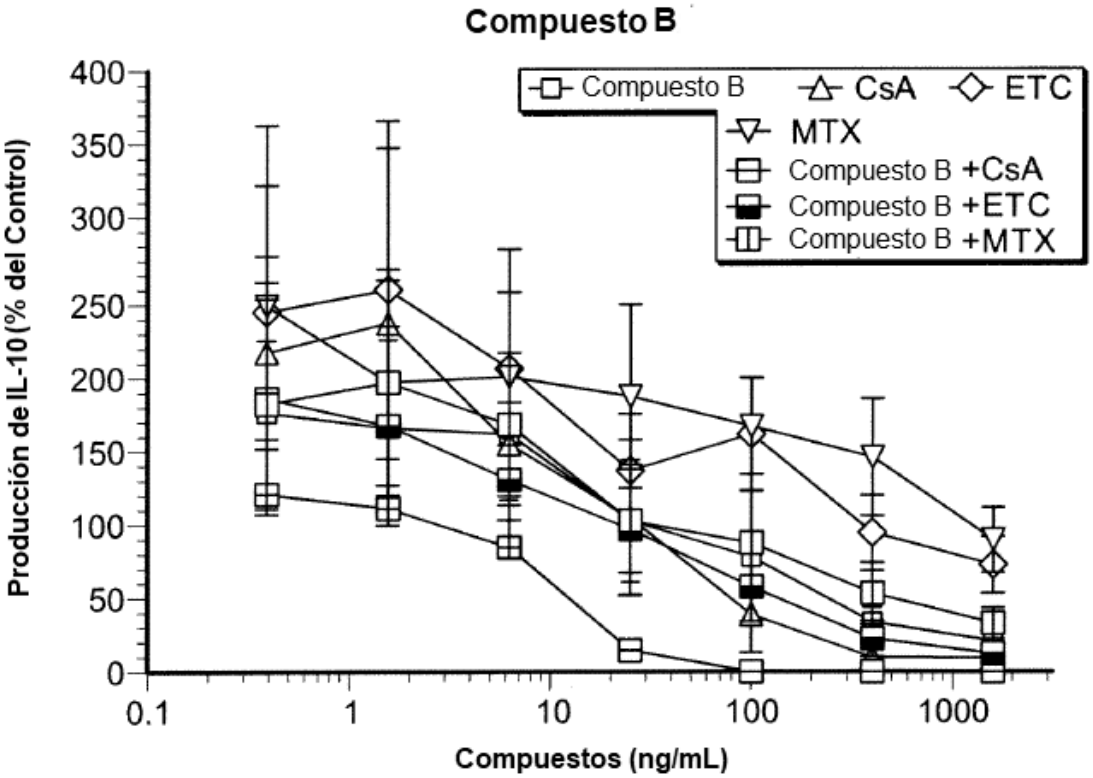


FIG. 21B

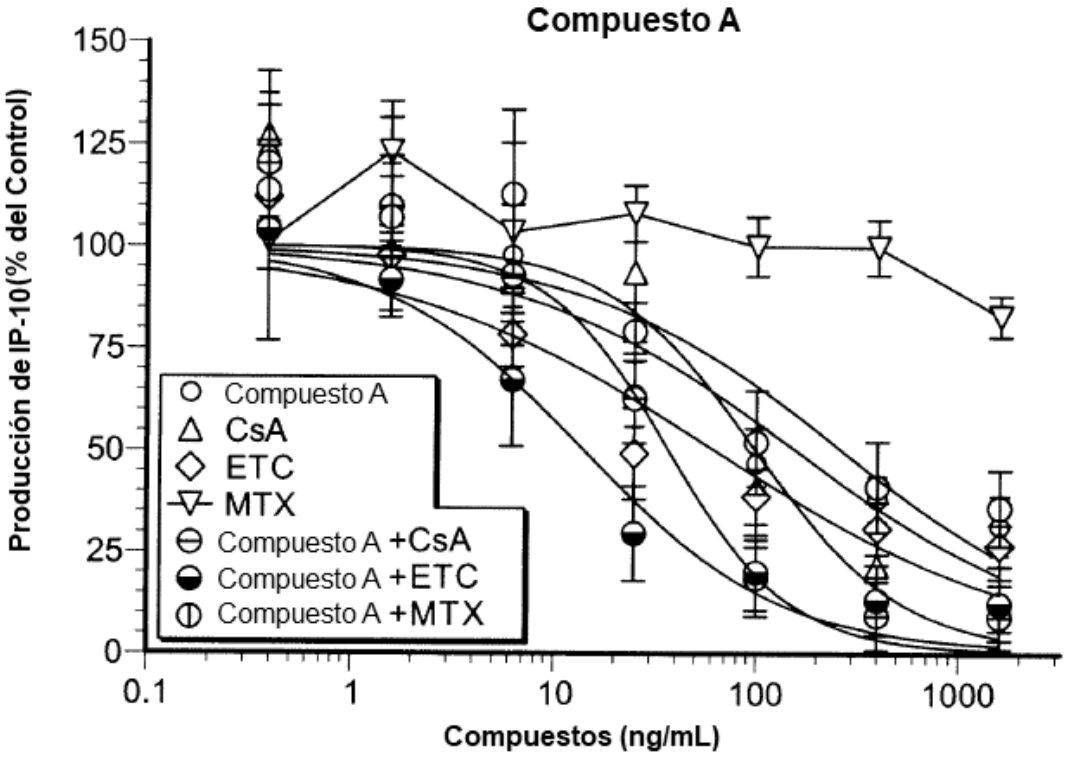


FIG. 22A

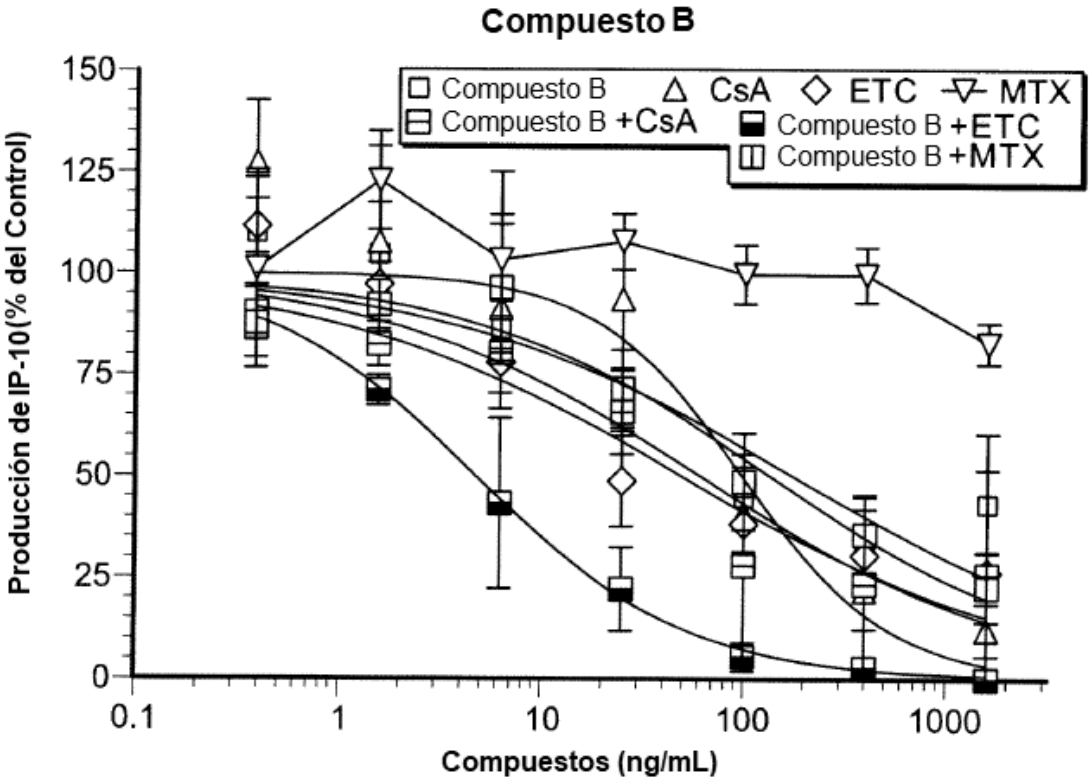


FIG. 22B

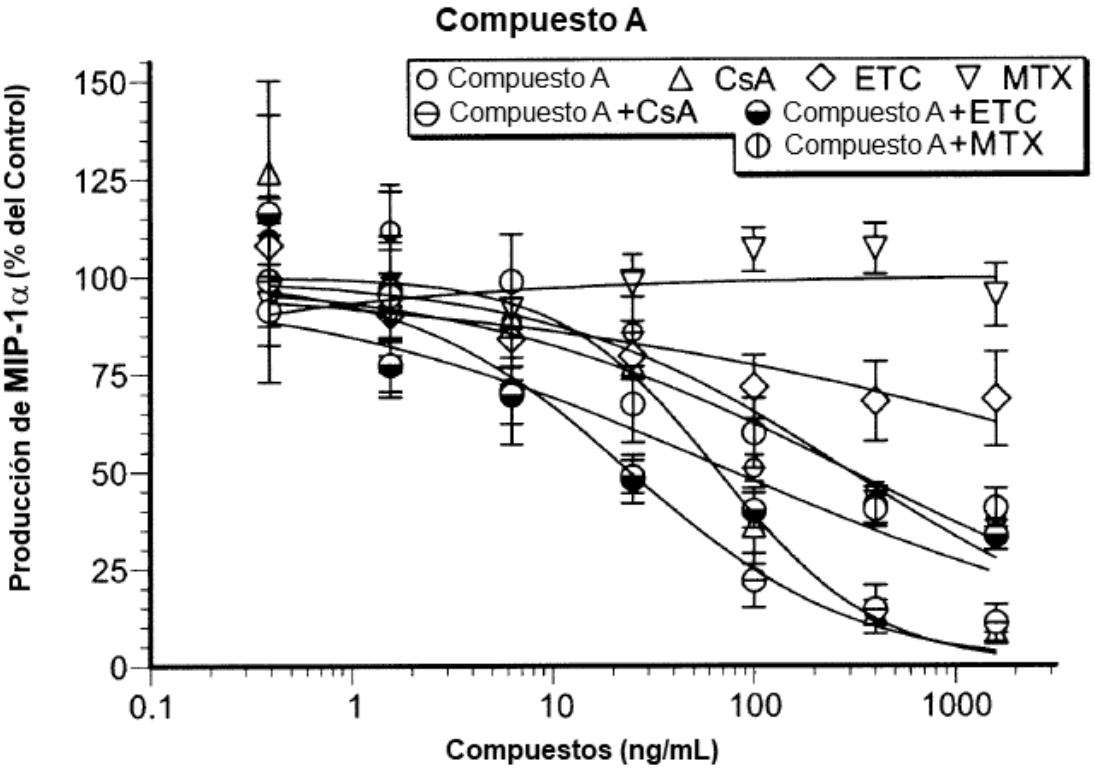


FIG. 23A

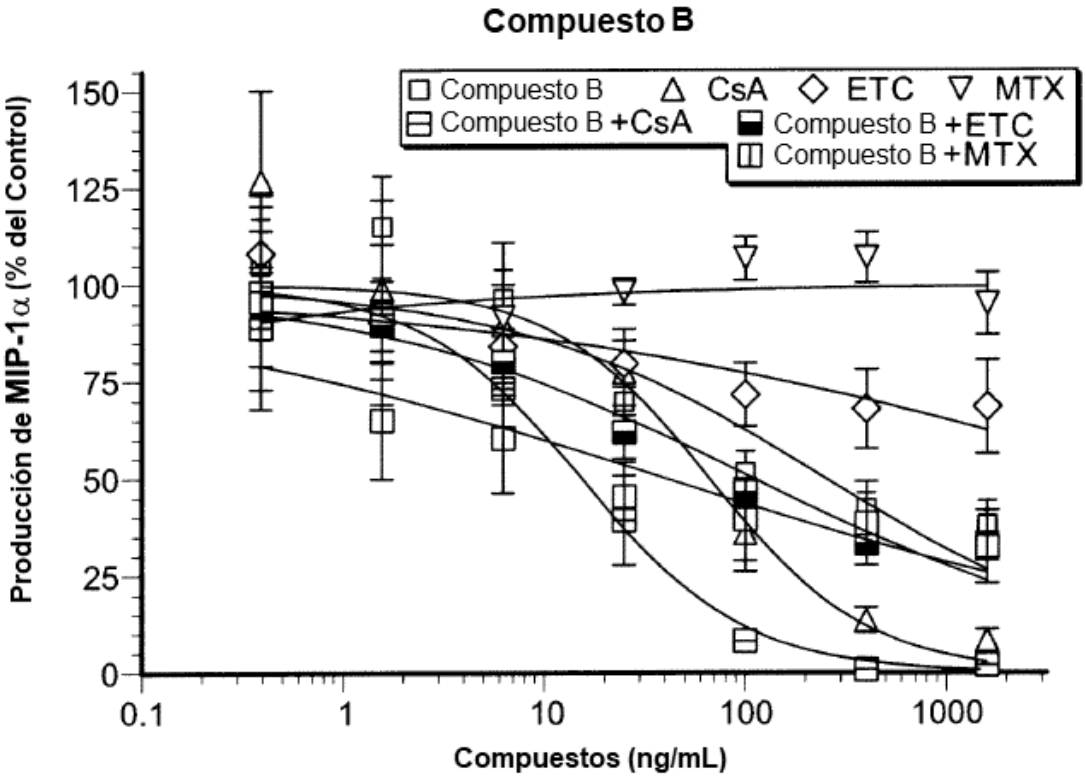


FIG. 23B

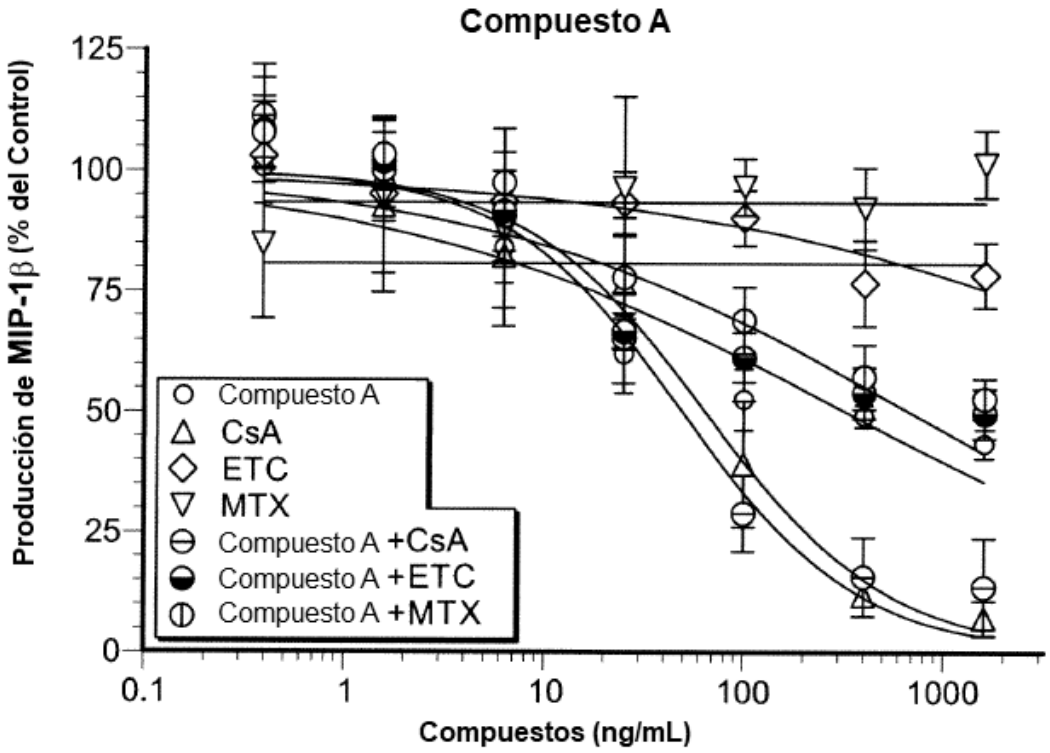


FIG. 24A

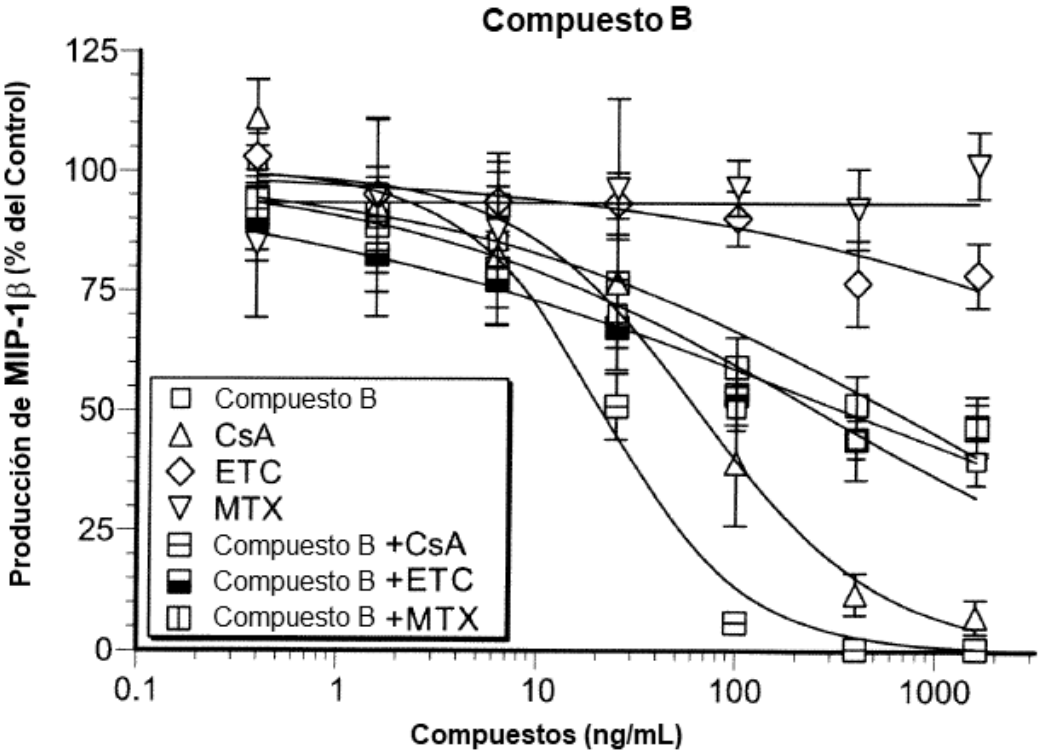


FIG. 24B

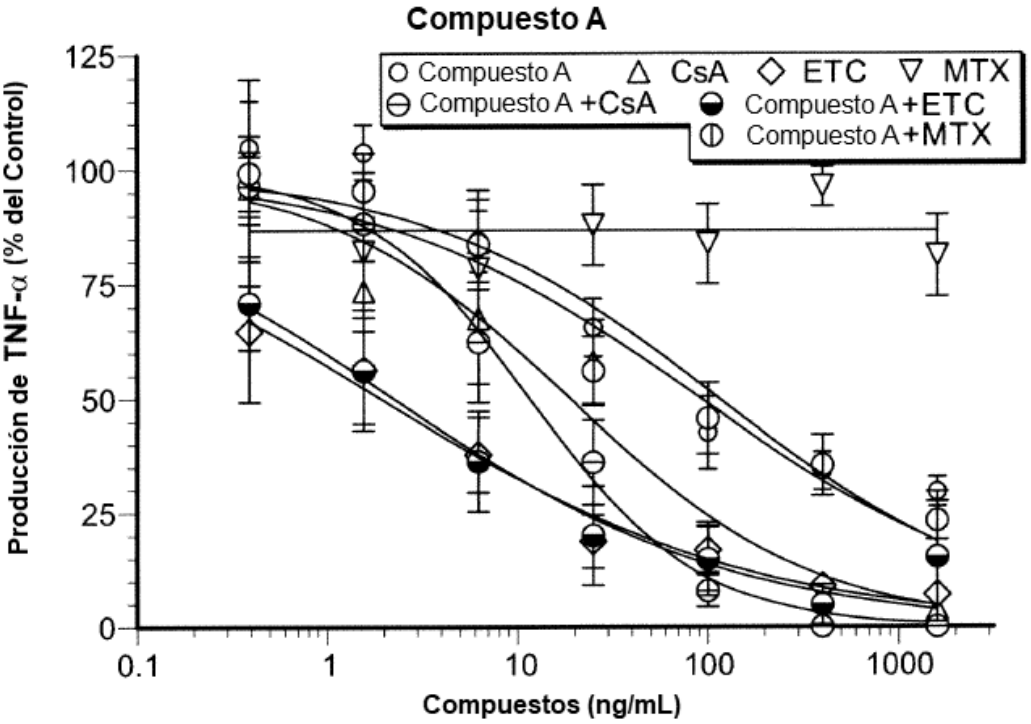


FIG. 25A

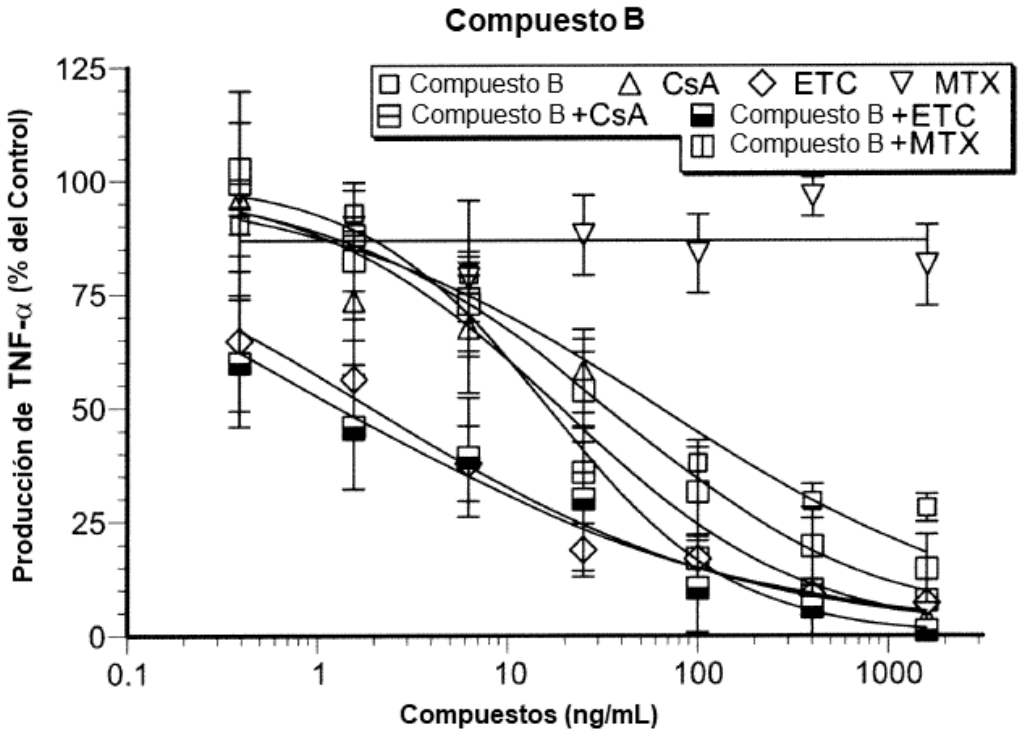


FIG. 25B

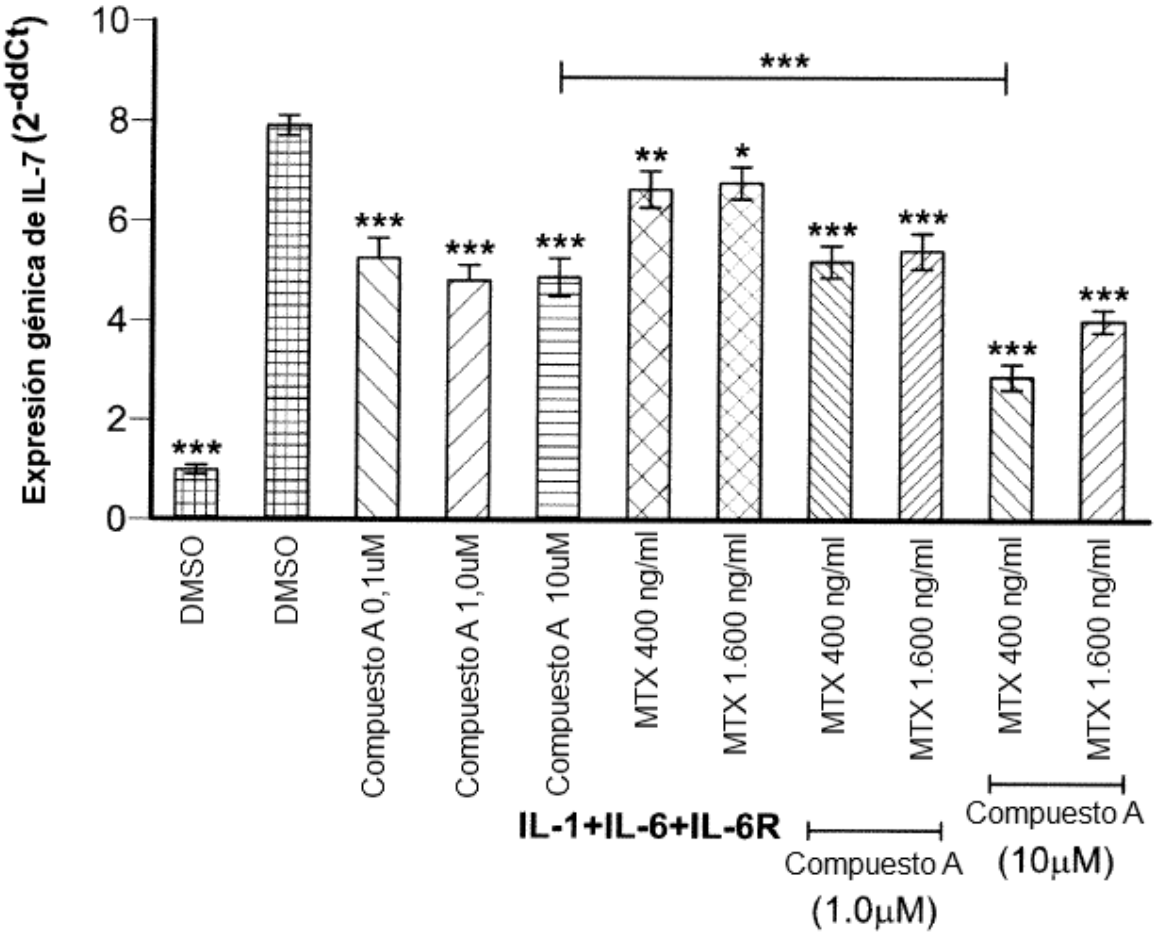

Expresión génica de IL-7 (2-ddCt)
10
8
6
4
2
0
***
**
*
DMSO
DMSO
Compuesto A 0,1uM
Compuesto A 1,0uM
Compuesto A 10uM
MTX 400 ng/ml
MTX 1.600 ng/ml
MTX 400 ng/ml
MTX 1.600 ng/ml
MTX 400 ng/ml
MTX 1.600 ng/ml
IL-1+IL-6+IL-6R
Compuesto A (1.0μM)
Compuesto A (10μM)

FIG. 26

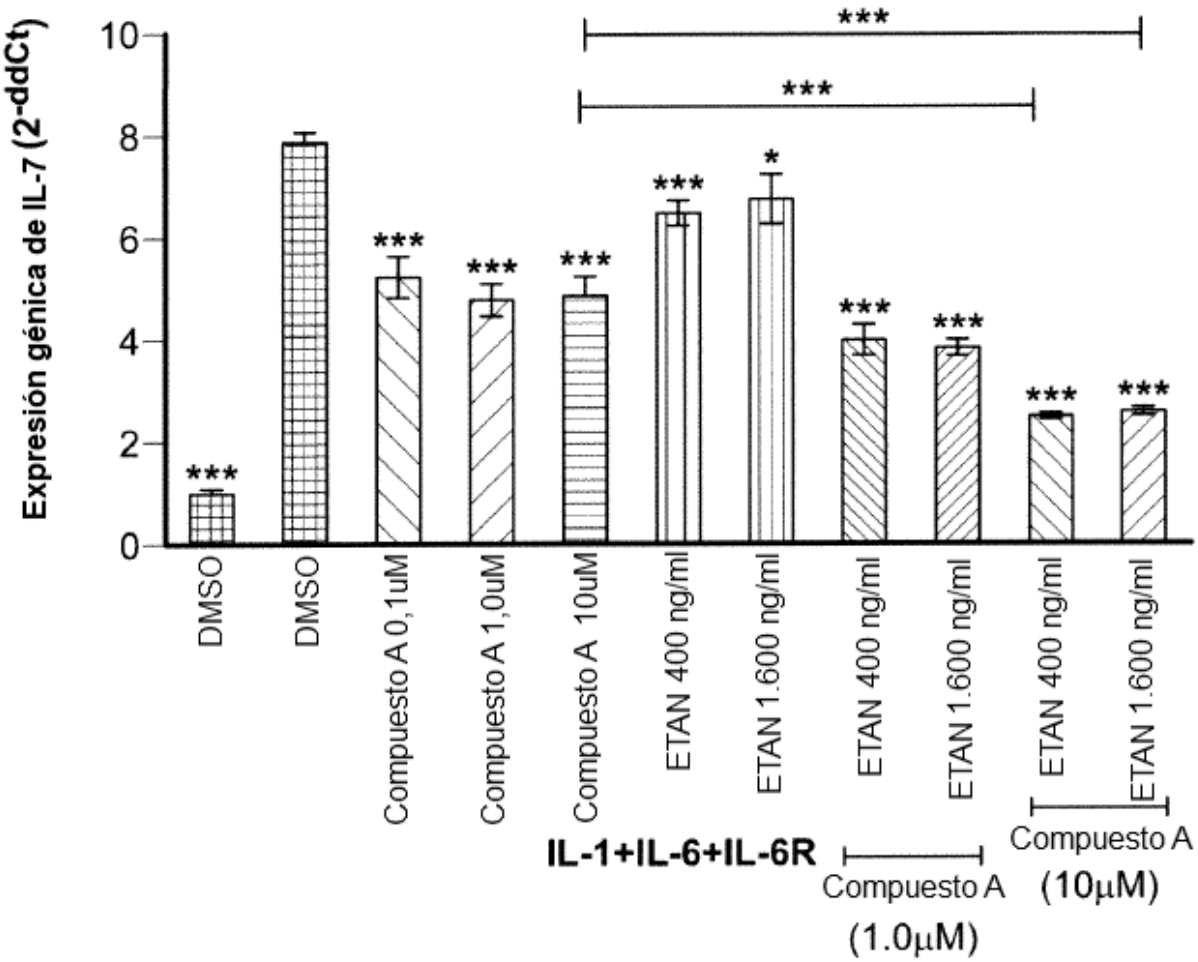

Expresión génica de IL-7 (2-ddCt)
10
8
6
4
2
0
***
*
DMSO
DMSO
Compuesto A 0,1uM
Compuesto A 1,0uM
Compuesto A 10uM
ETAN 400 ng/ml
ETAN 1.600 ng/ml
ETAN 400 ng/ml
ETAN 1.600 ng/ml
ETAN 400 ng/ml
ETAN 1.600 ng/ml
IL-1+IL-6+IL-6R
Compuesto A
(1.0μM)
Compuesto A
(10μM)

FIG. 27

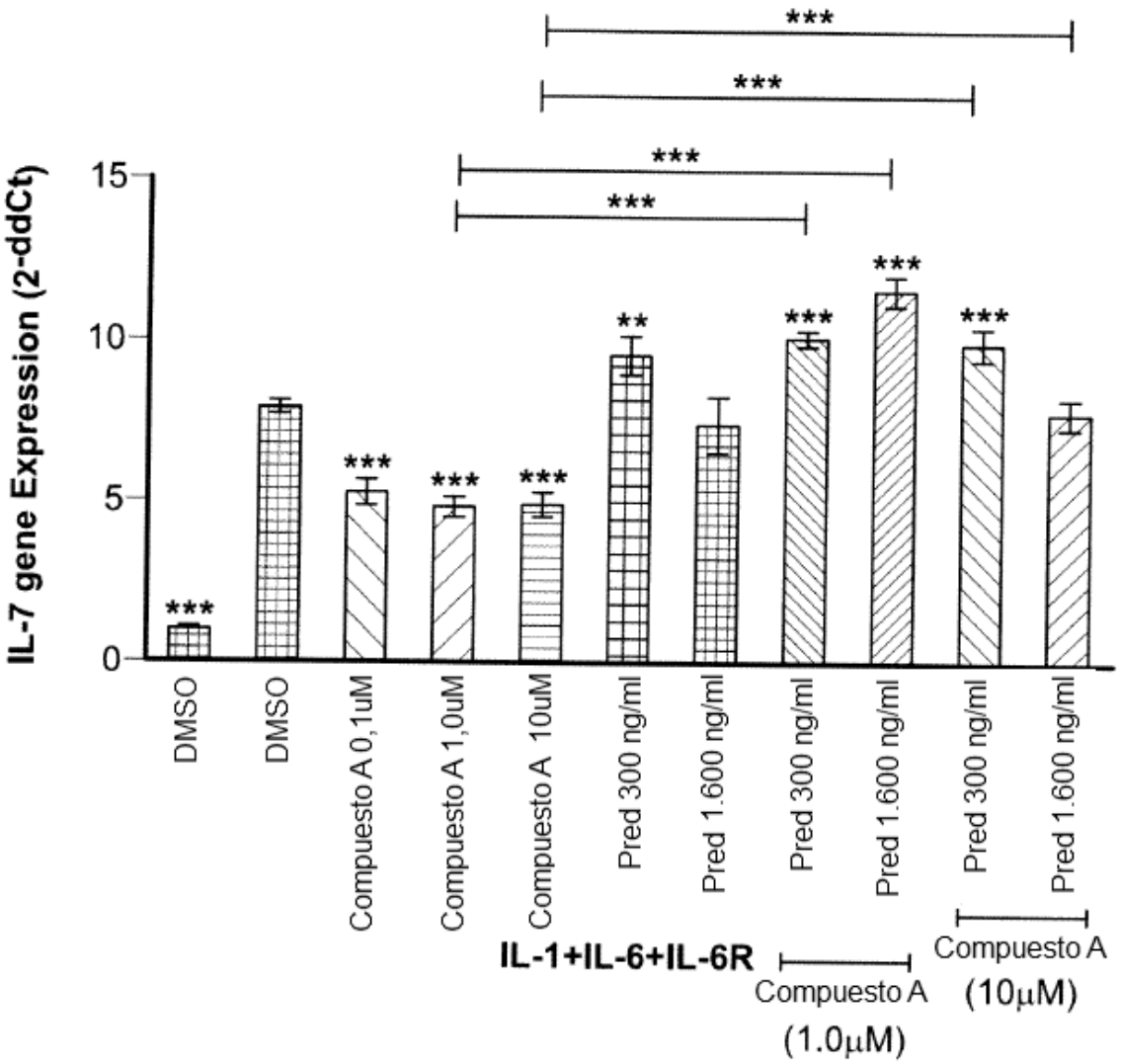

IL-7 gene Expression (2-ddCt)
15
10
5
0
***
**
DMSO
DMSO
Compuesto A 0,1uM
Compuesto A 1,0uM
Compuesto A 10uM
Pred 300 ng/ml
Pred 1.600 ng/ml
Pred 300 ng/ml
Pred 1.600 ng/ml
Pred 300 ng/ml
Pred 1.600 ng/ml
IL-1+IL-6+IL-6R
Compuesto A (1.0μM)
Compuesto A (10μM)

FIG. 28