

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 711 100**

51 Int. Cl.:

<b>A61K 31/4035</b>	(2006.01)	<b>A61P 17/10</b>	(2006.01)
<b>A61K 45/06</b>	(2006.01)	<b>A61K 47/06</b>	(2006.01)
<b>A61K 9/00</b>	(2006.01)	<b>A61K 47/10</b>	(2007.01)
<b>A61K 9/08</b>	(2006.01)	<b>A61K 47/14</b>	(2007.01)
<b>A61K 9/20</b>	(2006.01)	<b>A61K 47/26</b>	(2006.01)
<b>A61K 9/48</b>	(2006.01)	<b>A61K 9/06</b>	(2006.01)
<b>A61K 47/02</b>	(2006.01)	<b>A61K 9/70</b>	(2006.01)
<b>A61K 47/38</b>	(2006.01)		
<b>A61K 47/44</b>	(2007.01)		
<b>A61P 17/02</b>	(2006.01)		

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.03.2012 PCT/US2012/027368**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **13.09.2012 WO12121988**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.03.2012 E 12709437 (3)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.11.2018 EP 2683376**

54 Título: **Métodos para tratar enfermedades usando compuestos isoindolina**

30 Prioridad:

**07.03.2011 US 201161449716 P**

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

**30.04.2019**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**SCHAFFER, PETER, H. y  
SHANKAR, SAI**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

**Observaciones:**

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

**ES 2 711 100 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 para tratar enfermedades usando compuestos isoindolina

### 1. Referencia cruzada a solicitudes relacionadas

Esta solicitud reivindica el beneficio de la solicitud provisional U.S. no. 61/449 716, presentada el 7 de marzo, 2011.

### 5 2. Campo de la invención

En la presente memoria se proporcionan métodos para tratar, prevenir y/o gestionar una enfermedad seleccionada de dermatomiositis, prurigo nodular, pioderma gangrenoso, alopecia areata, hidradenitis supurativa, rosácea, liquen plano, arteritis de células gigantes, síndrome de Sjogren, gota, prostatitis crónica, uveitis posterior, vulvodinia y cistitis intersticial por la administración de (+)-2-[1-(3-etoxi-4-metoxifenil)-2-metilsulfoniletíl]-4-acetilaminoisoindolina-1,3-diona, {2-[(1S)-1-(3-etoxi-4-metoxifenil)-2-(metilsulfonil)etil]-3-oxoisoindolin-4-il}carboxamida de ciclopropilo o una combinación de los mismos.

En la presente memoria también se proporcionan composiciones farmacéuticas y formas de dosificación que comprenden (+)-2-[1-(3-etoxi-4-metoxifenil)-2-metilsulfoniletíl]-4-acetilaminoisoindolina-1,3-diona, {2-[(1S)-1-(3-etoxi-4-metoxifenil)-2-(metilsulfonil)etil]-3-oxoisoindolin-4-il}carboxamida de ciclopropilo o una combinación de los mismos para uso en métodos para tratar, prevenir y/o gestionar una enfermedad seleccionada de dermatomiositis, prurigo nodular, pioderma gangrenoso, alopecia areata, hidradenitis supurativa, rosácea, liquen plano, arteritis de células gigantes, síndrome de Sjogren, gota, prostatitis crónica, uveitis posterior, vulvodinia y cistitis intersticial.

### 15 3. Antecedentes de la invención

El factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) es una citoquina que se libera principalmente por los fagocitos mononucleares en respuesta a inmunostimuladores. El TNF- $\alpha$  es capaz de potenciar la mayor parte de los procesos celulares, tales como diferenciación, reclutamiento, proliferación, y degradación proteolítica. A niveles bajos, el TNF- $\alpha$  puede conferir protección frente a agentes infecciosos, tumores, y daño tisular. Sin embargo, el TNF- $\alpha$  también puede tener un papel en muchas enfermedades. Por ejemplo, cuando se administra a mamíferos o seres humanos, el TNF- $\alpha$  causa o agrava la inflamación, fiebre, efectos cardiovasculares, hemorragia, coagulación, y respuestas de fase aguda similares a las observadas durante infecciones agudas y estados de choque.

La producción aumentada o no regulada de TNF- $\alpha$  se ha implicado en enfermedades inflamatorias, enfermedades autoinmunes y enfermedades relacionadas. Algunos ejemplos no limitativos de enfermedades inflamatorias y autoinmunes incluyen enfermedades inflamatorias pulmonares crónicas; dermatitis; psoriasis; lupus eritematoso sistémico; afecciones artríticas, tales como artritis reumatoide y osteoartritis; osteoporosis; enfermedad de Crohn; colitis ulcerativa; enfermedad inflamatoria del intestino; y esclerosis múltiple. Pignet *et al.*, 1990, *Nature*, 344:245-247, Bissonnette *et al.*, 1989, *Inflammation* 13:329-339 y Baughman *et al.*, 1990, *J. Lab. Clin. Med.* 115:36-42 (enfermedades inflamatorias pulmonares crónicas); Elliot *et al.*, 1995, *Int. J. Pharmac.* 17:141-145 (artritis reumatoide); von Dullemen *et al.*, 1995, *Gastroenterology*, 109:129-135 (enfermedad de Crohn).

La PDE4 es una de las principales isoenzimas de fosfodiesterasa encontradas en células del linaje mieloide y linfoide humano. La enzima juega un papel crucial en la regulación de la actividad celular mediante la degradación del segundo mensajero ubicuo, adenosina monofosfato cíclico (AMPc) y su mantenimiento a niveles intracelulares bajos. Sin estar limitado por teoría, los inhibidores de PDE4 bloquean la degradación de AMPc mediante la inhibición de la enzima fosfodiesterasa tipo IV (PDE4), lo que produce un incremento en AMPc en células que expresan PDE4 incluyendo monocitos, células T, y neutrófilos. Además, el incremento resultante de los niveles de AMPc puede dar lugar a la modulación de las citoquinas inducidas por LPS, incluyendo la inhibición de la producción de TNF- $\alpha$  en monocitos, así como en linfocitos.

Los compuestos farmacéuticos que puedan bloquear la actividad o inhibir la producción de determinadas citoquinas (p. ej., TNF- $\alpha$ ) y fosfodiesterasa 4 (es decir, PDE4) pueden ser efectivos en el tratamiento, prevención y/o gestión de enfermedades inflamatorias, enfermedades autoinmunes y enfermedades relacionadas. Por ejemplo, muchos inhibidores que son moléculas pequeñas han demostrado una capacidad de tratar, prevenir y/o gestionar enfermedades inflamatorias implicadas por TNF- $\alpha$  (para una revisión, véase Lowe, 1998 *Exp. Opin. Ther. Patents* 8:1309-1332). US 2008/234359 A1 describe una forma sólida de compuesto enantioméricamente puro de fórmula (I) (apremilast) para el tratamiento de enfermedades/trastornos mejorados por la inhibición de la producción de TNF- $\alpha$  incluyendo arteritis de células gigantes, prurigo nodular, uveitis, enfermedad de Sjogren, cistitis intersticial, vulvodinia, prostatitis, dermatomiositis y pioderma gangrenoso. WO 2004/009776 A2 describe el uso de un anticuerpo neutralizante, con alta afinidad para TNF- $\alpha$  para tratar trastornos relacionados con TNF- $\alpha$ . Sin embargo, todavía existen necesidades de nuevos fármacos con eficacia mejorada y/o menos efectos secundarios para tratar enfermedades inflamatorias, enfermedades autoinmunes y enfermedades relacionadas, tales como dermatomiositis, prurigo nodular, pioderma gangrenoso, alopecia areata, hidradenitis supurativa, rosácea, liquen plano, arteritis de células gigantes, síndrome de Sjogren, gota, prostatitis crónica, uveitis posterior, vulvodinia y cistitis intersticial.

#### 4. Compendio

5 En un aspecto, en la presente memoria se proporcionan métodos para tratar, prevenir y/o gestionar una enfermedad seleccionada de enfermedades inflamatorias, enfermedades autoinmunes y otras enfermedades relacionadas, tales como enfermedades dermatológicas y enfermedades reumáticas en seres humanos. En algunas realizaciones, en la presente memoria se proporciona un compuesto para uso en métodos para tratar alopecia areata con un inhibidor de TNF- $\alpha$ , un inhibidor de PDE4 o una combinación de los mismos.

10 Tal y como se usa en la presente memoria y a no ser que se indique otra cosa, los términos "inhibidor de TNF- $\alpha$ " e "inhibidor de PDE4" engloban fármacos que son moléculas pequeñas, p.ej., moléculas orgánicas pequeñas, que no son péptidos, proteínas, ácidos nucleicos, oligosacáridos u otras macromoléculas, que inhiben la producción de TNF- $\alpha$ , PDE4 o una combinación de los mismos. En algunas realizaciones, los compuestos inhiben la producción de TNF- $\alpha$ . En determinadas realizaciones, los compuestos también pueden tener un efecto inhibidor modesto en IL1 $\beta$  e IL12 inducidas por LPS. En algunas realizaciones, los compuestos inhiben la producción de PDE4. En otras realizaciones, los compuestos inhiben tanto la producción de TNF- $\alpha$  como la producción de PDE4.

15 En algunas realizaciones, en la presente memoria se proporciona un compuesto para uso en métodos para tratar alopecia areata en seres humanos incluyendo, hombres, mujeres y niños. En determinadas realizaciones, la enfermedad es alopecia areata. Las enfermedades dermatológicas incluyen dermatomiositis, prurigo nodular, pioderma gangrenoso, alopecia areata, hidradenitis supurativa, rosácea y liquen plano. Las enfermedades reumáticas incluyen arteritis de células gigantes, síndrome de Sjogren y gota. Las enfermedades inflamatorias incluyen prostatitis crónica, uveítis posterior, vulvodinia y cistitis intersticial.

20 En otro aspecto, en la presente memoria se proporcionan métodos para tratar, prevenir y/o gestionar una enfermedad seleccionada de dermatomiositis, prurigo nodular, pioderma gangrenoso, alopecia areata, hidradenitis supurativa, rosácea, liquen plano, arteritis de células gigantes, síndrome de Sjogren, gota, prostatitis crónica, uveítis posterior, vulvodinia y cistitis intersticial con una cantidad terapéuticamente o profilácticamente efectiva de (+)-2-[1-(3-etoxi-4-metoxifenil)-2-metilsulfoniletil]-4-acetilaminoisoindolina-1,3-diona, o una sal o solvato (p. ej., hidrato) farmacéuticamente aceptable del mismo. En algunas realizaciones, el compuesto carece de su enantiómero (-). En determinadas realizaciones, se usa una sal o solvato del compuesto. En otras realizaciones, se usa el compuesto libre.

30 En otro aspecto, en la presente memoria se describen métodos para tratar, prevenir y/o gestionar una enfermedad seleccionada de dermatomiositis, prurigo nodular, pioderma gangrenoso, alopecia areata, hidradenitis supurativa, rosácea, liquen plano, arteritis de células gigantes, síndrome de Sjogren, gota, prostatitis crónica, uveítis posterior, vulvodinia y cistitis intersticial con una cantidad terapéuticamente o profilácticamente efectiva de {2-[(1S)-1-(3-etoxi-4-metoxifenil)-2-(metilsulfonil)etil]-3-oxoisoindolin-4-il}carboxamida de ciclopropilo, o una sal o solvato (p. ej., hidrato) farmacéuticamente aceptable del mismo. En algunas realizaciones, el compuesto carece de su enantiómero (*R*). En determinados aspectos, se usa una sal o solvato del compuesto. En otros aspectos, se usa el compuesto libre.

35 En algunas realizaciones, los métodos comprenden además administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de al menos un segundo agente activo que puede ser un antiinflamatorio, tal como agentes no esteroideos (p. ej., salicilatos) o corticosteroides (p. ej., dexametasona), un antipalúdico, un inmunosupresor, un antibiótico, un antiviral, un fármaco potenciador de la inmunidad, una hormona, PGE2 o una combinación de los mismos.

40 En otra realización, el compuesto de la invención o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo se administra tópicamente en una forma de dosificación que incluye, pero no está limitada a, pomadas, cremas, geles, pastas, polvos para uso externo, lociones, pulverizaciones, linimentos, emplastos, aerosoles, disoluciones, emulsiones, suspensiones y combinaciones de los mismos.

45 En realizaciones adicionales, el compuesto de la invención o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo se administra parenteralmente u oralmente o de una manera con liberación controlada.

#### 5. Descripción breve de las figuras

La Figura 1 ilustra los niveles de MxA de queratinocitos de diferentes muestras incluyendo el Control AA1 y los Ejemplos A1-A6 usados en el Ejemplo 14.

50 La Figura 2 ilustra los niveles de citoqueratina de diferentes muestras incluyendo el Control AA1 y los Ejemplos A1-A6 usados en el Ejemplo 14.

La Figura 3 ilustra la producción de IFN- $\alpha$  de diferentes muestras incluyendo los Controles BB1-BB2 y los Ejemplos B1-B12 usados en el Ejemplo 15.

La Figura 4 ilustra la producción de TNF- $\alpha$  de diferentes muestras incluyendo los Controles BB1-BB2 y los Ejemplos B1-B12 usados en el Ejemplo 15.

La Figura 5 ilustra los niveles de MxA de queratinocitos de diferentes muestras incluyendo los Controles BB1-BB2 y los Ejemplos B1-B9 y B11-B12 usados en el Ejemplo 16.

La Figura 6 ilustra los niveles de citoqueratina de diferentes muestras incluyendo los Controles BB1-BB2 y los Ejemplos B1-B9 y B11-B12 usados en el Ejemplo 16.

- 5 La Figura 7 ilustra la concentración de IFN- $\alpha$  (pg/mL) de diferentes muestras incluyendo los Ejemplos D1-D14 usados en el Ejemplo 17.

La Figura 8 ilustra la producción de IFN- $\alpha$  de diferentes muestras incluyendo el Control E1 y los Ejemplos E2-E20 usados en el Ejemplo 18.

## 6. Descripción detallada

- 10 En un aspecto, en la presente memoria se proporcionan métodos para tratar, gestionar y/o prevenir una enfermedad seleccionada de dermatomiositis, prurigo nodular, pioderma gangrenoso, alopecia areata, hidradenitis supurativa, rosácea, liquen plano, arteritis de células gigantes, síndrome de Sjogren, gota, prostatitis crónica, uveitis posterior, vulvodinia, cistitis intersticial y combinaciones de las mismas, en donde los métodos comprenden administrar a un paciente que tiene la enfermedad una cantidad terapéuticamente o profilácticamente efectiva de (+)-2-[1-(3-etoxi-4-  
15 metoxifenil)-2-metilsulfoniletil]-4-acetilaminoisoidolina-1,3-diona, o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo. En algunas realizaciones, el compuesto carece sustancialmente de su enantiómero (-).

- 20 En otro aspecto, en la presente memoria se describen métodos para tratar, gestionar y/o prevenir una enfermedad seleccionada de dermatomiositis, prurigo nodular, pioderma gangrenoso, alopecia areata, hidradenitis supurativa, rosácea, liquen plano, arteritis de células gigantes, síndrome de Sjogren, gota, prostatitis crónica, uveitis posterior, vulvodinia, cistitis intersticial y combinaciones de las mismas, en donde los métodos comprenden administrar a un paciente que tiene la enfermedad una cantidad terapéuticamente o profilácticamente efectiva de {2-[(1S)-1-(3-etoxi-4-  
25 metoxifenil)-2-(metilsulfonil)etil]-3-oxoisindolin-4-il}carboxamida de ciclopropilo, o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo. En algunos aspectos, el compuesto carece sustancialmente de su enantiómero (*R*).

- 30 Además, los pacientes que se van a tratar pueden incluir mamíferos, particularmente el ser humano. Pueden tratarse niños y adultos por los métodos y composiciones descritos en la presente memoria. También pueden tratarse los pacientes inmunocomprometidos. Esta invención contempla el tratamiento de pacientes que no han usado otras terapias, aquellos que han usado otras terapias y aquellos que son refractarios a terapias para las enfermedades descritas en la presente memoria. En algunas realizaciones, el paciente es una mujer. En determinadas realizaciones, el paciente es un hombre. En otras realizaciones, el paciente es un niño.

- 35 En algunos aspectos, la enfermedad que se va a tratar, prevenir y/o gestionar es dermatomiositis. En general, la dermatomiositis se caracteriza por cambios inflamatorios y degenerativos en la piel y músculos. La dermatomiositis puede afectar tanto a niños como a adultos con una relación global mujeres/hombres de aproximadamente 2:1. Los síntomas de la dermatomiositis incluyen generalmente debilidad muscular, manifestaciones articulares, implicación visceral y cambios en la piel.

- 40 Pueden usarse cinco criterios de diagnóstico para el diagnóstico de la dermatomiositis, que son (i) debilidad muscular proximal simétrica de los músculos de las cinturas y flexores del cuello anteriores, con o sin disfagia o implicación de los músculos respiratorios; (ii) elevación de los niveles séricos de enzimas del músculo esquelético; (iii) evidencia de una miopatía inflamatoria en la biopsia muscular; (iv) características electromiográficas de una miopatía; y (v) erupción cutánea característica. La presencia de tres o cuatro criterios más la erupción cutánea en un paciente puede definir un diagnóstico definitivo de dermatomiositis.

- 45 La dermatomiositis puede clasificarse de diferentes formas. Una forma es dividirla en de inicio adulto o inicio juvenil. Cada grupo puede dividirse adicionalmente en subgrupos. Los subgrupos de inicio adulto incluyen dermatomiositis clásica, dermatomiositis clásica con malignidad, dermatomiositis clásica de un trastorno de tejido conectivo superpuesto y dermatomiositis amiopática. Los subgrupos de inicio juvenil incluyen dermatomiositis clásica, dermatomiositis amiopática y dermatomiositis hipomiopática.

- 50 Otra forma posible de clasificar la dermatomiositis es dividirla en dermatomiositis clásica, dermatomiositis juvenil, dermatomiositis clásica con malignidad, dermatomiositis clásica de un trastorno de tejido conectivo superpuesto, dermatomiositis amiopática, dermatomiositis hipomiopática, dermatomiositis inducida por fármacos y dermatomiositis postmiopática.

- 55 La causa de la dermatomiositis es incierta. Sin embargo, se han implicado algunos factores, tales como (i) factores medioambientales; (ii) factores genéticos; (iii) determinados agentes infecciosos; y (iv) determinados fármacos. Un factor medioambiental que se ha sugerido como un factor causal en la dermatomiositis es la luz ultravioleta (UV). La predisposición genética ligada a determinados tipos de antígeno de leucocitos humanos (HLA) puede ser uno de los factores para el desarrollo de dermatomiositis.

Determinados agentes infecciosos pueden ser posibles desencadenantes de la dermatomiositis. Algunos ejemplos no limitativos incluyen virus, tales como virus coxsackie, parvovirus, echovirus, virus linfotrópico de células T humano (HTLV-1) y virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), bacterias, tales como borrelia burgdorferi y el grupo A de estreptococos alfa hemolíticos, y parásitos, tales como toxoplasma gondii.

- 5 Determinados fármacos, tales como los fármacos que disminuyen el colesterol, algunos fármacos antiinflamatorios no esteroideos (NSAID), fármacos antineoplásicos, fármacos antiinfecciosos y otras medicinas no relacionadas se sospechan en la patogénesis de la dermatomiositis.

La dermatomiositis puede tratarse con los compuestos (p. ej., (+)-2-[1-(3-etoxi-4-metoxifenil)-2-metilsulfoniletil]-4-acetilaminoisindolina-1,3-diona y {2-((1S)-1-(3-etoxi-4-metoxifenil)-2-(metilsulfonil)etil)-3-oxoisindolin-4-il}carboxamida de ciclopropilo) en combinación con medicación inmunosupresora, tal como corticosteroides (p. ej., prednisona), agentes inmunosupresores (p. ej., metotrexato, azatioprina, micofenolato, sirolimus, rituximab, cicloporina A, ciclofamida, micofenolato mofetil, clorambucilo, fludarabina y antipalúdicos aminoquinolona), inmunoglobulinas intravenosas (IVIG) y fármacos antipalúdicos (p. ej., hidroxicloroquina y fosfato de cloroquina).

15 En algunos aspectos, la enfermedad que se va a tratar, prevenir y/o gestionar es prurigo nodular (PN). El PN también se conoce como Hyde prurigo nodular, nódulos de Picker, liquen simple crónico o liquen córneo obtuso. El PN es una afección dermatológica caracterizada por la presencia de pápulas y nódulos con prurito primario intenso. Ambos sexos pueden estar afectados igualmente. Cerca del 80 % de los pacientes que tienen PN tienen un historial personal o familiar de dermatitis atópica, asma o fiebre del heno comparado con aproximadamente el 25 % de la población normal.

20 La causa del PN es incierta. La reacción a una picadura de insecto u otra dermatitis puede dar lugar a PN. El PN también puede estar asociado con estrés emocional, anemia con deficiencia de hierro, VIH, fallo renal crónico, enteropatía por gluten, infección por micobacterias, enfermedades del tiroides, enfermedades autoinmunes y otras afecciones.

25 Los nódulos o pápulas del PN tienen un diámetro generalmente de 3-20 mm. Son generalmente discretos, escamosos, simétricos, hiperpigmentados o purpúricos y firmes. Los nódulos y pápulas pueden aparecer en las superficies extensoras de los brazos, las piernas y el tronco.

Las lesiones del PN pueden mostrar signos de excoriación con una parte superior plana, umbilicada o cortezuda. Las lesiones pueden presentarse en un número de 1-2 a cientos. El picor es una de las características clínicas del PN. El picor es intenso y puede durar muchas horas sin alivio y puede alterar el sueño.

30 En determinadas realizaciones, la enfermedad que se va a tratar, prevenir y/o gestionar es pioderma gangrenoso (PG). El PG es una dermatosis neutrofilica no infecciosa. Puede aparecer a cualquier edad con una posible ligera predominancia en mujeres. Aproximadamente el cincuenta por ciento de los casos de PG están asociados con una enfermedad sistémica subyacente.

35 El PG empieza generalmente con pústulas estériles que progresan rápidamente y se convierten en úlceras dolorosas con una profundidad y tamaño variables con bordes violáceos socavados. Las piernas pueden estar afectadas comúnmente pero también pueden estar implicadas otras partes de la piel y de las membranas mucosas.

La causa de PG es incierta. Puede estar asociado con vasculitis, gammopatías, artritis reumatoide (AR), leucemia, linfoma, hepatitis C, lupus eritematoso sistémico (SLE), poliartritis y enfermedad inflamatoria del intestino. Puede estar causado por una respuesta inmune anormal.

40 El diagnóstico de PG puede ser difícil. El espécimen de biopsia puede no proporcionar ninguna información patognomónica. El diagnóstico de PG puede hacerse excluyendo otras causas de úlceras cutáneas mediante biopsia, cultivo y acumen clínico.

El PG puede clasificarse generalmente en ocho tipos incluyendo PG clásico, PG atípico, PG pustular, PG vegetativo, PG peristomal, PG genital, PG en bebés y niños, y enfermedad neutrofilica extracutánea.

45 En algunas realizaciones, la enfermedad que se va a tratar, prevenir y/o gestionar es alopecia areata (AA). La AA es una enfermedad en la que el pelo se pierde en personas sin un trastorno obvio de la piel o enfermedad sistémica.

La AA es una enfermedad autoinmune que afecta a personas genéticamente susceptibles expuestas a desencadenantes medioambientales no claros, tales como inyección y estrés emocional. Puede coexistir con vitiligo o tiroiditis autoinmune.

50 El diagnóstico de AA puede ser por inspección. La AA se manifiesta comúnmente como una pérdida súbita de pelo en áreas localizadas bien demarcadas. La lesión puede ser una zona redonda u ovalada de alopecia y puede estar aislada o ser numerosa. La zona de alopecia tiene habitualmente un borde distintivo en el que el pelo normal demarca la periferia de la lesión. El cuero cabelludo y la barba pueden estar afectados frecuentemente, pero pueden estar implicadas cualesquiera áreas con pelo.

## ES 2 711 100 T3

- 5 La AA puede clasificarse sobre la base del grado o patrón de la pérdida de pelo. La pérdida de pelo puede estar presente como zonas únicas delimitadas de pérdida de pelo, múltiples zonas o extensas de pérdida de pelo. Sobre la base del grado de la pérdida de pelo, la AA se clasifica generalmente en AA zonal en la que hay una pérdida parcial del pelo del cuero cabelludo; alopecia total en la que hay un 100 % de pérdida del pelo del cuero cabelludo; y alopecia universal en la que hay un 100 % de pérdida de todo el pelo del cuero cabelludo y corporal.
- 10 En determinados aspectos, la enfermedad que se va a tratar, prevenir y/o gestionar es hidradenitis supurativa (HS). La HS también se conoce como enfermedad de Verneuil, pioderma fistulans significa o acné inverso. La HS es una enfermedad crónica caracterizada por inflamación fibrosa de las glándulas apocrinas de las axilas, ingle y alrededor de los pezones y el ano. La incidencia de HS puede ser mayor en mujeres que en hombres. La HS puede aparecer después de la pubertad con una edad promedio de inicio en la segunda o tercera décadas de la vida. El diagnóstico de HS puede ser por examen.
- 15 La causa de HS puede ser el bloqueo de los conductos apocrinos que da lugar a inflamación subsecuente, sobrecrecimiento bacteriano y fibrosis. *Staphylococcus aureus* está implicado comúnmente en los casos agudos de HS, pero los organismos gram-negativos, tales como *Proteus*, pueden predominar en los casos crónicos de HS.
- 20 En pacientes que tienen HS pueden desarrollarse masas blandas hinchadas que se asemejan a abscesos cutáneos. Las características en los casos crónicos de HS incluyen dolor, fluctuación, secreciones y formación de tractos fibrosos. En los casos axilares crónicos de HS, la coalescencia de nódulos inflamados puede causar bandas fibróticas semejantes a cuerdas palpables. La afección puede convertirse en discapacitante debido al dolor y al mal olor.
- 25 En algunos aspectos, la enfermedad que se va a tratar, prevenir y/o gestionar es rosácea. La rosácea, también conocida como acné rosácea, es un trastorno inflamatorio crónico caracterizado por eritema facial, telangiectasias, eritema, pápulas, pústulas y rinofima. El diagnóstico puede estar basado en la apariencia característica y el historial.
- 30 La rosácea afecta comúnmente a pacientes con una edad de aproximadamente 30 a 50 con complexiones pálidas, principalmente a los de ascendencia irlandesa y del norte de Europa, pero puede afectar y probablemente está infrareconocida en pacientes con la piel más oscura.
- 35 La causa de la rosácea es incierta. Un control vasomotor anormal, drenaje venoso facial alterado, un incremento en los ácaros de los folículos e infección por *Helicobacter pylori* pueden estar asociados con rosácea. Los niveles de pequeños péptidos antimicrobianos, que son parte del sistema de defensa natural del cuerpo, pueden estar elevados en pacientes con rosácea. Las personas con rosácea también pueden tener unos niveles mayores de lo normal de catelicidina, así como enzimas tripticas del estrato córneo.
- 40 La rosácea está limitada a la cara y cuero cabelludo, y se manifiesta en 4 fases incluyendo fase pre-rosácea, fase vascular, fase inflamatoria y estadio tardío. Hay cuatro subtipos identificados de rosácea, incluyendo rosácea eritematotelangiectática, rosácea papulopustular, rosácea fimatosa, rosácea ocular y otras variantes de rosácea incluyendo rosácea conglobata, rosácea fulminans y fimas en rosácea.
- 45 En determinados aspectos, la enfermedad que se va a tratar, prevenir y/o gestionar es liquen plano (LP). El LP es una dermatosis inflamatoria. Es una erupción inflamatoria, recurrente, prurítica caracterizada por pápulas pequeñas, discretas, poligonales, con parte superior plana, y violáceas que pueden coalescer en zonas escamosas rugosas y puede acompañar lesiones orales. El diagnóstico de LP puede ser clínico y estar apoyado por una biopsia de la piel. Los niños pueden estar afectados menos frecuentemente.
- 50 La causa de LP no se entiende completamente. El LP puede estar causado por una reacción autoinmune mediada por las células T frente a queratinocitos del epitelio basal en personas con predisposición genética. Los fármacos, incluyendo  $\beta$ -bloqueantes, NSAID, inhibidores de ACE, sulfonilureas, oro, agentes antipalúdicos y tiazidas, pueden causar LP. Puede estar asociado con insuficiencia hepática inducida por hepatitis C, cirrosis biliar primaria, y otras formas de hepatitis.
- 55 Las lesiones típicas asociadas con LP incluyen pápulas y placas pruríticas, moradas, poliangulares, con parte superior plana. Las lesiones pueden tener un diámetro de 2 a 4 mm, con bordes angulares, un color violáceo y un brillo distintivo en luz lateral. Están generalmente distribuidas simétricamente y en las superficies flexoras de las piernas, muñecas, glande del pene, tronco y mucosas orales y vaginales, pero pueden estar muy extendidas.
- 60 El LP cutáneo puede describirse por la configuración o morfología de las lesiones. Algunos ejemplos no limitativos de LP cutáneo incluyen LP blaschkoide, LP zosteriforme, LP inverso, LP mucosal, liquen planopilaris, LP hipertrófico, LP ampolloso, LP actínico, LP atrófico anular, LP erosivo, LP pigmentoso, LP perforante, LP invisible, LP penfigoide y LP eritematoso.
- 65 En algunos aspectos, la enfermedad que se va a tratar, prevenir y/o gestionar es arteritis de células gigantes (GCA). La GCA, también conocida como arteritis temporal, arteritis granulomatosa, arteritis craneal o enfermedad de Horton, es una vasculitis inflamatoria sistémica.

- 5 La vasculitis tiende a afectar a las arterias que contienen tejido elástico. La vasculitis puede afectar comúnmente las arterias temporal, craneal u otras del sistema carótido. Las ramificaciones del arco aórtico, arterias coronarias y arterias periféricas también pueden estar afectadas. Las células mononucleares infiltradas en la túnica adventicia forman granulomas que contienen células T activadas y macrófagos. Las células gigantes multinucleadas pueden agruparse cerca de la lámina elástica disrumpida. La capa íntima puede estar engrosada, con un estrechamiento concéntrico y oclusión del lumen.
- 10 La GCA puede implicar la aorta torácica, arterias grandes que parten de la aorta en el cuello y ramificaciones extracraneales de las arterias carótidas. Los vasos intracraneales no están afectados generalmente.
- 15 Los síntomas de GCA pueden empezar gradualmente durante varias semanas u ocurrir abruptamente. Los síntomas y signos focales pueden incluir dolores de cabeza, alteraciones visuales, sensibilidad de la arteria temporal y dolor en los músculos de la mandíbula durante el masticado. También son síntomas comunes la fiebre, pérdida de peso, malestar y fatiga. La velocidad de sedimentación de los eritrocitos (ESR) y el nivel de la proteína C reactiva del paciente con GCA pueden estar elevados. El diagnóstico de GCA puede ser clínico y confirmarse por biopsia de la arteria temporal.
- 20 La GCA es una forma relativamente común de vasculitis en los EE.UU. y Europa. Las mujeres pueden estar afectadas más frecuentemente que los hombres. La edad de inicio de la GCA en los hombres es aproximadamente a los 70, con un intervalo de aproximadamente 50 a > 90. Aproximadamente el 40 a 60 % de los pacientes con GCA tienen polimialgia reumática.
- 25 En determinados aspectos, la enfermedad que se va a tratar, prevenir y/o gestionar es síndrome de Sjögren (SS). El SS es un trastorno crónico, autoinmune, sistémico e inflamatorio relativamente común. Las características de SS incluyen sequedad en los ojos, boca y otras membranas mucosas. La sequedad puede deberse a la infiltración linfocítica de la glándula exocrina y disfunción de la glándula secundaria. El SS puede afectar varias glándulas exocrinas u otros órganos. El diagnóstico de SS puede ser por criterios específicos relacionados con la implicación del ojo, boca y glándula salivar, autoanticuerpos e histopatología.
- 30 Todas las edades pueden verse afectadas por SS. El SS ocurre generalmente entre mujeres de mediana edad. Los pacientes pueden clasificarse como que tienen bien SS primario o secundario. El SS primario no ocurre en asociación con otra enfermedad autoinmune sistémica. Sin embargo, el SS secundario ocurre con otra enfermedad autoinmune, tal como AR, SLE, esclerosis sistémica, enfermedad del tejido conectivo mixto, cirrosis biliar primaria, tiroiditis de Hashimoto o hepatitis autoinmune crónica.
- 35 La causa de SS es incierta. Las glándulas salivares, lacrimales y otras glándulas exocrinas pueden verse infiltradas con células T CD4+ y con algunas células B. Las células T pueden producir citoquinas inflamatorias. Las células de los conductos salivares también pueden producir citoquinas, que eventualmente dañan los conductos secretores. La atrofia del epitelio secretor de las glándulas lacrimales puede causar la desecación de la córnea y la conjuntiva. La infiltración linfocítica y la proliferación de las células intraductales en la glándula parótida pueden causar estrechamiento luminal y la formación de estructuras celulares compactas denominadas islas mioepiteliales. La atrofia de la glándula puede dar como resultado que el paciente tenga SS. La sequedad, atrofia mucosal o submucosal gastrointestinal, y la infiltración difusa por células plasmáticas y linfocitos pueden causar síntomas de SS. El SS también puede estar asociado con predisposición genética.
- 40 En algunos aspectos, la enfermedad que se va a tratar, prevenir y/o gestionar es gota. La gota es una artritis común causada por la precipitación de cristales de urato monosódico en los tejidos, generalmente en y alrededor de las articulaciones. Generalmente, causa artritis aguda o crónica recurrente. La artritis aguda es inicialmente monarticular y generalmente implica la primera articulación metatarsofalángica. El diagnóstico de gota puede requerir la identificación de cristales en el fluido sinovial.
- 45 La gota puede ser más común en hombres que en mujeres. En los hombres, la gota se desarrolla generalmente durante la edad madura. En las mujeres, la gota se desarrolla generalmente después de la menopausia. Las personas más jóvenes con gota son menos comunes, pero la gota es generalmente más grave en personas que desarrollan gota antes de la edad de 30. La gota generalmente afecta a os miembros de la misma familia.
- 50 Los síntomas de la gota incluyen dolor agudo, sensibilidad, calor, enrojecimiento, hinchazón e inflamación. La artritis gotosa aguda empieza generalmente con un inicio súbito de dolor. La articulación metatarsofalángica de un dedo gordo del pie está implicada comúnmente en el caso de gota. El dolor puede volverse progresivamente más severo, generalmente durante unas pocas horas y muy agudo. La piel suprayacente puede volverse más caliente, tensa, brillante y roja o purpúrea. En los pacientes con gota pueden ocurrir fiebre, escalofríos, taquicardia y malestar. En los pacientes con gota son comunes la hipertensión, hiperlipidemia y obesidad coexistentes.
- 55 Cuando mayor es el grado y duración de la hiperuricemia, mayor es la probabilidad de gota y más graves son los síntomas. Los niveles de urato pueden estar elevados debido a una tasa de excreción renal disminuida de urato, producción incrementada de urato e ingesta incrementada de alimentos ricos en purina. Sin embargo, la asociación entre los niveles séricos elevados de ácido úrico y el desarrollo de la gota es incierta.

En determinados aspectos, la enfermedad que se va a tratar, prevenir y/o gestionar es prostatitis. La prostatitis se refiere a un grupo dispar de trastornos que se manifiestan con una combinación de síntomas urinarios predominantemente irritativos u obstructivos y dolor perineal.

- 5 La prostatitis puede clasificarse en 4 categorías incluyendo prostatitis bacteriana aguda, prostatitis bacteriana crónica, prostatitis crónica/síndrome de dolor pélvico crónico y prostatitis inflamatoria asintomática. La prostatitis bacteriana crónica y la prostatitis crónica/síndrome de dolor pélvico crónico son generalmente más comunes que la prostatitis bacteriana aguda y la prostatitis inflamatoria asintomática.

La causa de la prostatitis crónica/síndrome de dolor pélvico crónico es incierta. Puede estar asociada con factores etiológicos y fisiopatológicos (p. ej., factores inmunológicos, endocrinos, neurológicos, psicológicos e infecciosos).

- 10 Los síntomas de la prostatitis crónica/síndrome de dolor pélvico crónico incluyen dolor, dolor con eyaculación, disfunción en la micción (p. ej., irritación urinaria y obstrucción urinaria) y disfunción sexual. La próstata puede ser sensible pero generalmente puede no estar blanda y agrandada o hinchada. Este malestar puede ser significativo y puede interferir con la calidad de vida.

- 15 En determinados aspectos, la enfermedad que se va a tratar, prevenir y/o gestionar es uveítis. La uveítis es un trastorno ocular en el que el tracto uveal, es decir, el iris, cuerpo ciliar o corioide, está inflamado. La uveítis puede clasificarse en uveítis anterior, uveítis intermedia, uveítis posterior y panuveítis.

- 20 En algunos aspectos, la enfermedad que se va a tratar, prevenir y/o gestionar es uveítis posterior (PU). PU se refiere a cualesquiera formas de retinitis, coroiditis o inflamación del disco óptico. La PU es generalmente idiopática. La PU puede diagnosticarse dilatando la pupila del paciente. La toxoplasmosis es una causa comúnmente reconocida de PU en pacientes inmunocompetentes. El citomegalovirus es una causa comúnmente reconocida de PU en pacientes con el virus de la inmunodeficiencia humana/síndrome de inmunodeficiencia adquirida (VIH/SIDA).

La PU causa comúnmente cuerpos flotantes y una visión disminuida, pero los síntomas de PU pueden ser diversos. Los signos de PU incluyen células en el humor vítreo; lesiones blancas o blancas amarillentas en la retina y corioide subyacente; desprendimientos de retina exudativos; vasculitis retinal; y edema en el disco óptico.

- 25 En determinados aspectos, la enfermedad que se va a tratar, prevenir y/o gestionar es vulvodinia. La vulvodinia es un trastorno crónico doloroso que puede caracterizarse por quemazón, escozor, irritación o dolor agudo en la vulva, incluyendo los labios y entrada a la vagina, pero sin la presencia de descubrimientos visibles relevantes o un trastorno específico, clínicamente identificable y neurológico.

- 30 Los síntomas de la vulvodinia incluyen quemazón, escozor, irritación o dolor agudo en la vulva. Los síntomas pueden ocurrir en un sitio o en el área vulvar completa. El dolor puede ser constante o intermitente, o producirse solo cuando se toca la vulva. Puede ocurrir durante o después de la actividad sexual, cuando se insertan tampones, o cuando se aplica una presión prolongada en la vulva o sin ninguna razón particular.

- 35 La vulvodinia puede afectar a mujeres de todas las edades. Puede interferir con las emociones del paciente y puede dar lugar a depresión. La vulvodinia puede clasificarse por el sitio anatómico del dolor del paciente (p. ej., vulvodinia generalizada, hemivulvodinia y clitorodinia). La vulvodinia puede clasificarse además en la forma provocada, no provocada y mixta, es decir, tanto provocada como no provocada.

- 40 La causa de la vulvodinia es incierta. Puede estar asociada con predisposición genética a inflamación, alergia u otra sensibilidad, trastorno autoinmune similar al lupus eritematoso, eccema o a liquen escleroso, infección, daño y neuropatía. También puede ser consecuencia de resultados negativos de la cirugía genital, tales como una labiectomía.

En algunos aspectos, la enfermedad que se va a tratar, prevenir y/o gestionar es cistitis intersticial (IC). La IC es inflamación de la vejiga no infecciosa. Aproximadamente el 90 % de los casos de IC se producen en mujeres. El diagnóstico de IC puede ser por historial y exclusión de otros trastornos clínicamente y por cistoscopia y biopsia.

- 45 La causa de IC es incierta. Puede implicar la pérdida de mucina urotelial protectora, penetración de potasio urinario y otras sustancias en la pared de la vejiga, activación de los nervios sensoriales o daño en el músculo liso. Los mastocitos pueden mediar el proceso de IC, pero su papel no está claro.

- 50 Los síntomas de IC incluyen dolor suprapúbico, pélvico y abdominal, frecuencia y urgencia urinaria con incontinencia. La IC puede empeorar al llenarse la vejiga y disminuye cuando el paciente micciona. La ovulación, menstruación, alergias estacionales, estrés físico, estrés emocional o relaciones sexuales pueden empeorar los síntomas de la IC. Los síntomas pueden aparecer y empeorar durante años al dañarse la pared de la vejiga del paciente. Los alimentos con alto contenido en potasio pueden causar exacerbaciones de la IC. El alcohol, tabaco y los alimentos especiados pueden empeorar los síntomas de la IC.

## 6.1 Definiciones

Tal y como se usa en la presente memoria y a no ser que se indique otra cosa, el término "el compuesto de la invención" es (+)-2-[1-(3-etoxi-4-metoxifenil)-2-metilsulfoniletil]-4-acetilaminoisindolina-1,3-diona, o un polimorfo, sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, que carece sustancialmente del enantiómero (-).

5 Tal y como se usa en la presente memoria y a no ser que se indique otra cosa, el término "sal farmacéuticamente aceptable" incluye sales de grupos ácidos o básicos que pueden estar presentes en los compuestos de la invención. Bajo determinadas condiciones ácidas, el compuesto de la invención puede formar una amplia variedad de sales con  
10 varios ácidos inorgánicos y orgánicos. Los ácidos que pueden usarse para preparar sales farmacéuticamente aceptables de dichos compuestos básicos son aquellos que forman sales que comprenden aniones farmacológicamente aceptables incluyendo acetato, benzenosulfonato, benzoato, bicarbonato, bitartrato, bromuro, edetato de calcio, camsilato, carbonato, cloruro, bromuro, yoduro, citrato, dihidrocloruro, edetato, edisilato, estolato, esilato, fumarato, gluceptato, gluconato, glutamato, glicolilarsanilato, hexilresorcinato, hidrabamina, hidroxinaftoato, isetionato, lactato, lactobionato, malato, maleato, mandelato, mesilato, metilsulfato, muscato, napsilato, nitrato, pantotenato, fosfato/difosfato, poligalacturonato, salicilato, estearato, succinato, sulfato, tanato, tartrato, teoclato, trietiyoduro y pamoato. Bajo determinadas condiciones básicas, el compuesto de la invención puede formar sales  
15 básicas con varios cationes farmacológicamente aceptables. Los ejemplos no limitativos de dichas sales incluyen sales de metales alcalinos o metales alcalinotérreos y, particularmente, sales de calcio, magnesio, sodio, litio, cinc, potasio y hierro.

20 Tal y como se usa en la presente memoria y a no ser que se indique otra cosa, el término "hidrato" significa un compuesto de la presente invención o una sal del mismo, 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 de la presente invención. El término "solvato" incluye hidratos (p. ej., monohidrato, dihidrato, trihidrato, tetrahidrato).

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

30 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 derivados y metabolitos de (+)-2-[1-(3-etoxi-4-metoxifenil)-2-metilsulfoniletil]-4-acetilaminoisindolina-1,3-diona, o {2-[(1S)-1-(3-etoxi-4-metoxifenil)-2-(metilsulfonil)etil]-3-oxoisindolin-4-il}carboxamida de ciclopropilo que incluyen restos biohidrolizables, tales como amidas biohidrolizables, ésteres biohidrolizables, carbamatos biohidrolizables, carbonatos biohidrolizables, ureidos biohidrolizables, y análogos de fosfato biohidrolizables. Los profármacos pueden prepararse típicamente usando métodos muy conocidos, tales como los descritos por 1 *Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery*,  
35 172-178, 949-982 (Manfred E. Wolff *ed.*, 5ª ed. 1995).

40 Tal y como se usa en la presente memoria, y a no ser que se especifique otra cosa, los términos "carbamato biohidrolizable", "carbonato biohidrolizable", "ureido biohidrolizable" y "fosfato biohidrolizable" significan un carbamato, carbonato, ureido y fosfato, respectivamente, de un compuesto que bien: 1) no interfiere con la actividad biológica del compuesto pero puede conferir a ese compuesto propiedades ventajosas *in vivo*, tales como captación, duración de la acción o inicio de la acción; o 2) es biológicamente inactivo pero se convierte *in vivo* en el compuesto biológicamente activo. Los ejemplos no limitativos de carbamatos biohidrolizables incluyen alquilaminas inferiores, etilendiaminas sustituidas, aminoácidos, hidroxialquilaminas, aminas heterocíclicas y heteroaromáticas y poliéter aminas.

45 Tal y como se usa en la presente memoria, y a no ser que se especifique otra cosa, el término "estereoisómero" engloba todos los compuestos enantioméricamente/estereoméricamente puros y enantioméricamente/estereoméricamente enriquecidos de esta invención.

50 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 el 80 %, 90 % o 95 % o más de un estereoisómero y el 20 %, 10 % o 5 % o menos del contra estereoisómero. En algunos casos, un compuesto de la invención se considera ópticamente activo o estereoméricamente/enantioméricamente puro (p. ej., sustancialmente la forma R o sustancialmente la forma S) con respecto a un centro quiral cuando el compuesto es aproximadamente 80 % ee (exceso enantiomérico) o mayor, preferiblemente, igual a o mayor del 90 % ee con respecto a un centro quiral particular y más preferiblemente el 95 % ee con respecto a un centro quiral particular.

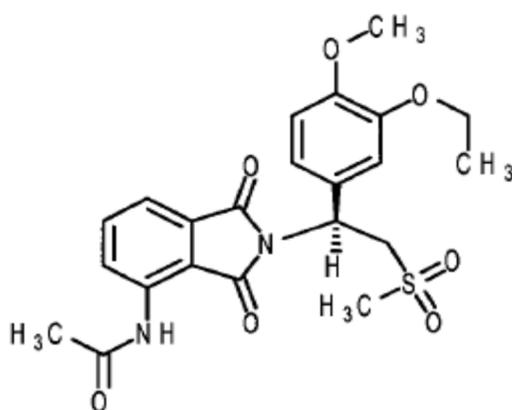
55 Tal y como se usa en la presente memoria, y a no ser que se indique otra cosa, el término "carece sustancialmente de su enantiómero (R)" se usa en la presente memoria para significar igual a o mayor del 80 % puro del enantiómero (S), sobre la base del peso total del compuesto. En algunos casos, el término "carece sustancialmente de su enantiómero (R)" significa igual a o mayor del 85 %, 90 %, 95 % o 99 % puro del enantiómero (S), sobre la base del peso total del compuesto.

- 5 Tal y como se usa en la presente memoria, y a no ser que se indique otra cosa, el término "carece sustancialmente de su enantiómero (-)" se usa en la presente memoria para significar igual a o mayor del 80 % puro del enantiómero (+), sobre la base del peso total del compuesto. En algunos casos, el término "carece sustancialmente de su enantiómero (-)" significa igual a o mayor del 85 %, 90 %, 95 % o 99 % puro del enantiómero (+), sobre la base del peso total del compuesto.
- Tal y como se usa en la presente memoria, y a no ser que se indique otra cosa, el término "estereoméricamente enriquecido" o "enantioméricamente enriquecido" engloba determinadas mezclas de estereoisómeros de compuestos (p. ej., R/S = 30/70, 35/65, 65/35 y 70/30).
- 10 Tal y como se usa en la presente memoria, y a no ser que se especifique otra cosa, los términos "tratar", "tratando" y "tratamiento" contemplan una acción que ocurre mientras un paciente padece la enfermedad o trastorno especificado, que reduce la gravedad de los síntomas de la enfermedad o trastorno, o retarda o ralentiza la progresión o síntomas de la enfermedad o trastorno.
- 15 Tal y como se usa en la presente memoria, y a no ser que se especifique otra cosa, el término "cantidad terapéuticamente efectiva" engloba cantidades de dosificación y esquemas de frecuencia de dosificación. Pueden ser aplicables diferentes cantidades terapéuticamente efectivas para diferentes afecciones, como conocerán fácilmente los expertos en la técnica. De forma similar, las cantidades suficientes para tratar o prevenir trastornos específicos, pero insuficientes para causar, o suficientes para reducir, efectos adversos asociados con los compuestos de la invención, también están englobadas por las cantidades de dosificación y esquemas de frecuencia de dosificación.
- 20 Tal y como se usa en la presente memoria, y a no ser que se especifique otra cosa, los términos "prevenir", "previniendo" y "prevención" contemplan una acción que ocurre antes de que el paciente empiece a padecer la enfermedad o trastorno especificado, que inhibe o reduce la gravedad o síntomas de la enfermedad o trastorno.
- 25 Tal y como se usa en la presente memoria, y a no ser que se indique otra cosa, los términos "gestionar", gestionando" 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 aumentar 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.
- 30 Tal y como se usa en la presente memoria, y a no ser que se especifique otra cosa, el término "potenciando" o "potencia", cuando se usa en conexión con una respuesta inmune, significa que cuando un agente antigénico o inmunogénico se administra a un sujeto que ha sido o está siendo tratado con los compuestos de la invención, hay una formación incrementada de anticuerpos, comparado con un sujeto al que se administra la misma cantidad del agente antigénico o inmunogénico solo, según se determina por cualquier método convencional de determinación del nivel de anticuerpos conocido en la técnica, por ejemplo, nefelometría, inmunoelectroforesis, radioinmunoensayo y ELISA. En algunas realizaciones, cuando se usan los métodos de esta invención, la formación de anticuerpos se incrementa aproximadamente un 5 %, 10 %, 20 %, 50 % o 100 % o más, comparado con la formación de anticuerpos obtenida cuando no se usan dichos métodos.
- 35

## 6.2 Los compuestos de la invención

(+)-2-[1-(3-etoxi-4-metoxifenil)-2-metilsulfoniletil]-4-acetilaminoisindolina-1,3-diona

- 40 En la presente memoria se proporcionan métodos para tratar, gestionar o prevenir una enfermedad seleccionada de dermatomiositis, prurigo nodular, pioderma gangrenoso, alopecia areata, hidradenitis supurativa, rosácea, liquen plano, arteritis de células gigantes, síndrome de Sjogren, gota, prostatitis crónica, uveitis posterior, vulvodinia, cistitis intersticial y combinaciones de las mismas, en donde los métodos comprenden administrar a un paciente que necesita dicho tratamiento, gestión o prevención una cantidad terapéuticamente o profilácticamente efectiva del enantiómero (+) de (+)-2-[1-(3-etoxi-4-metoxifenil)-2-metilsulfoniletil]-4-acetilaminoisindolina-1,3-diona (también conocido como apremilast).
- 45 Sin estar limitado por teoría, el enantiómero (+) de (+)-2-[1-(3-etoxi-4-metoxifenil)-2-metilsulfoniletil]-4-acetilaminoisindolina-1,3-diona se cree que es (S)-{2-[1-(3-etoxi-4-metoxifenil)-2-metilsulfoniletil]-4-acetilaminoisindolina-1,3-diona} [Compuesto (I)], que tiene la siguiente estructura:



(I).

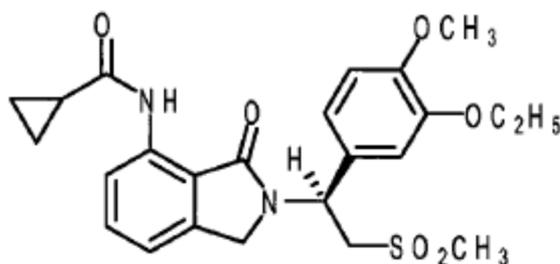
Así, se usa (+)-2-[1-(3-etoxi-4-metoxifenil)-2-metilsulfoniletil]-4-acetilaminoisindolina-1,3-diona para describir el compuesto representado como Compuesto (I). El Compuesto (I) puede prepararse según los métodos descritos en la Patente U.S. No. 6 962 940, titulada "(+)-2-[1-(3-Ethoxy-4-methoxyphenyl)-2-methylsulfonylethyl]-4-acetylaminoisindoline-1,3-dione: Methods Of Using and Compositions Thereof", presentada el 8 de noviembre, 2005. En una realización, el Compuesto (I) se sintetiza a partir de anhídrido 3-acetamidofáltico y una sal de aminoácido quiral de (S)-2-(3-etoxi-4-metoxifenil)-1-(metilsulfonyl)-et-2-ilamina. Las sales de aminoácidos quirales de (S)-2-(3-etoxi-4-metoxifenil)-1-(metilsulfonyl)-et-2-ilamina incluyen 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. En algunas realizaciones, la sal de aminoácido quiral es sal de (S)-2-(3-etoxi-4-metoxifenil)-1-(metilsulfonyl)-et-2-ilamina-N-acetil-L-leucina, que se resuelve a partir de 2-(3-etoxi-4-metoxifenil)-1-(metilsulfonyl)-et-2-ilamina y N-acetil-L-leucina en metanol.

Alternativamente, el Compuesto (I) puede aislarse a partir de la 2-[1-(3-etoxi-4-metoxifenil)-2-metilsulfoniletil]-4-acetilaminoisindolina-1,3-diona racémica correspondiente por técnicas de separación conocidas en la técnica. El compuesto racémico puede prepararse fácilmente según el procedimiento para el Ejemplo 12 de la Patente U.S. No. 6 020 358. Los ejemplos de técnicas de separación adecuadas incluyen la formación de sales quirales y el uso de cromatografía líquida quiral o de alto rendimiento "HPLC" y la formación y cristalización de sales quirales. Véase, p. ej., 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); y Wilen, S. H., *Tables of Resolving Agents and Optical Resolutions* p. 268 (E.L. Eliel, Ed., Univ. of Notre Dame Press, Notre Dame, IN, 1972).

{2-[(1S)-1-(3-etoxi-4-metoxifenil)-2-(metilsulfonyl)etil]-3-oxoisindolin-4-il}carboxamida de ciclopropilo

En la presente memoria se proporcionan métodos para tratar, gestionar o prevenir una enfermedad seleccionada de dermatomiositis, prurigo nodular, pioderma gangrenoso, alopecia areata, hidradenitis supurativa, rosácea, liquen plano, arteritis de células gigantes, síndrome de Sjogren, gota, prostatitis crónica, uveitis posterior, vulvodinia, cistitis intersticial y combinaciones de las mismas, en donde los métodos comprenden administrar a un paciente que necesita dicho tratamiento, gestión o prevención una cantidad terapéuticamente o profilácticamente efectiva de {2-[(1S)-1-(3-etoxi-4-metoxifenil)-2-(metilsulfonyl)etil]-3-oxoisindolin-4-il}carboxamida de ciclopropilo o N-[2-[(1S)-1-(3-etoxi-4-metoxifenil)-2-(metilsulfonyl)etil]-2,3-dihidro-3-oxo-1H-isindol-4-il]-ciclopropanocarboxamida.

La {2-[(1S)-1-(3-etoxi-4-metoxifenil)-2-(metilsulfonyl)etil]-3-oxoisindolin-4-il}carboxamida de ciclopropilo o N-[2-[(1S)-1-(3-etoxi-4-metoxifenil)-2-(metilsulfonyl)etil]-2,3-dihidro-3-oxo-1H-isindol-4-il]-ciclopropanocarboxamida [es decir, el Compuesto (II)] tiene la siguiente estructura:



Compuesto (II).

35

El Compuesto (II) puede prepararse según el procedimiento de preparación para el Ejemplo 57 de la Patente U.S. No. 6 667 316, titulada "Pharmaceutically Active Isoindoline Derivatives", presentada el 23 de diciembre, 2003. En un aspecto, el Compuesto (II) puede prepararse calentando una mezcla de 7-amino-2-[(1S)-1-(3-etoxi-4-metoxifenil)-2-(metilsulfonil)etil]isoindolin-1-ona y cloruro de ciclopropanocarbonilo en tetrahidrofurano.

- 5 Alternativamente, el Compuesto (II) puede aislarse de la {2-[1-(3-etoxi-4-metoxifenil)-2-(metilsulfonil)etil]-3-oxoisoindolin-4-il}carboxamida de ciclopropilo racémica correspondiente por técnicas de separación conocidas para los expertos en la técnica. El compuesto racémico puede prepararse fácilmente según el procedimiento de preparación para el Ejemplo 55 de la Patente U.S. No. 6 667 316. Los ejemplos de técnicas de separación adecuadas incluyen la formación de sales quirales y el uso de cromatografía líquida quiral o de alto rendimiento "HPLC" y la formación y
- 10 cristalización de sales quirales. Véase, p. ej., Rex W. Souter, *Chromatographic Separations of Stereoisomers*, (CRC Press, Boca Raton, 1985); 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); y Wilen, S. H., *Tables of Resolving Agents and Optical Resolutions*, p. 268 (E.L. Eliel, Ed., Univ. of Notre Dame Press, Notre Dame, IN, 1972).

### 15 6.3 Métodos de tratamientos y prevención

En la presente memoria se proporcionan métodos para tratar, prevenir y/o gestionar una enfermedad seleccionada de dermatomiositis, prurigo nodular, pioderma gangrenoso, alopecia areata, hidradenitis supurativa, rosácea, liquen plano, arteritis de células gigantes, síndrome de Sjogren, gota, prostatitis crónica, uveitis posterior, vulvodinia y cistitis intersticial mediante la administración de uno o más de los compuestos de la invención a un paciente que tiene la enfermedad.

20

En algunos aspectos, la enfermedad es dermatomiositis (DM). Algunos ejemplos no limitativos de DM incluyen dermatomiositis clásica, dermatomiositis juvenil, dermatomiositis clásica con malignidad, dermatomiositis clásica de un trastorno de tejido conectivo superpuesto, dermatomiositis amiopática, dermatomiositis hipomiopática, dermatomiositis inducida por fármacos y dermatomiositis post-miopática.

25 En algunos aspectos, la enfermedad es prurigo nodular (PN).

En determinadas realizaciones, la enfermedad es pioderma gangrenoso (PG). Algunos ejemplos no limitativos de PG incluyen PG clásico, PG atípico, PG pustular, PG vegetativo, PG peristomal, PG genital, PG en bebés y niños y enfermedad neutrofílica extracutánea.

30 En algunas realizaciones, la enfermedad es alopecia areata (AA). Algunos ejemplos no limitativos de AA incluyen AA zonal, alopecia total y alopecia universal.

En determinados aspectos, la enfermedad es hidradenitis supurativa (HS).

En algunos aspectos, la enfermedad es rosácea o acné rosácea. Algunos ejemplos no limitativos de rosácea o acné rosácea incluyen rosácea eritematotelangiectática, rosácea papulopustular, rosácea fimatosa, rosácea ocular, y otras variantes de rosácea incluyendo tales como rosácea conglobata, rosácea fulminans y firmas en rosácea.

35 En determinados aspectos, la enfermedad es liquen plano (LP). Algunos ejemplos no limitativos de LP incluyen LP blaschkoid, LP zosteriforo, LP inverso, LP mucosal, liquen planopilaris, LP hipertrófico, LP ampolloso, LP actínico, LP atrófico anular, LP erosivo, LP pigmentoso, LP perforante, LP invisible, LP penfigoide y LP eritematoso.

En algunos aspectos, la enfermedad es arteritis de células gigantes (GCA), arteritis temporal, arteritis granulomatosa, arteritis craneal o enfermedad de Horton.

40 En determinados aspectos, la enfermedad es síndrome de Sjögren (SS).

En algunos aspectos, la enfermedad es gota.

En determinados aspectos, la enfermedad es prostatitis. Algunos ejemplos no limitativos de prostatitis incluyen prostatitis bacteriana aguda, prostatitis bacteriana crónica, prostatitis crónica/síndrome de dolor pélvico crónico y prostatitis inflamatoria asintomática.

45 En algunos aspectos, la enfermedad es uveitis posterior (PU).

En determinados aspectos, la enfermedad es vulvodinia. Algunos ejemplos no limitativos de vulvodinia incluyen vulvodinia generalizada, hemivulvodinia y clitorodinia.

En algunos aspectos, la enfermedad es cistitis intersticial (IC).

50 Esta invención también engloba los usos de los compuestos de la invención en la modulación del sistema inmune para que no se desequilibre y produzca trastornos inflamatorios, autoinmunes y relacionados, tales como las enfermedades descritas en la presente memoria en un paciente. Por lo tanto, en otro aspecto, se describen métodos

para potenciar una respuesta inmune frente a un inmunógeno, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente o profilácticamente efectiva de (+)-2-[1-(3-etoxi-4-metoxifenil)-2-metilsulfoniletil]-4-acetilaminoisoidolinolona-1,3-diona, o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, a un paciente que necesita dicha potenciación. Los compuestos pueden administrarse antes de, durante o posteriormente a la exposición del paciente al inmunógeno.

### 6.3.1 Terapia de combinación con un segundo agente activo

En métodos particulares englobados por esta realización, el compuesto de la invención se administra en combinación con otro fármaco ("segundo agente activo") en métodos para tratar, gestionar y/o prevenir una o más enfermedades descritas en la presente memoria. El segundo agente activo incluye agentes antiinflamatorios, tales como agentes no esteroideos y corticosteroides, antipalúdicos, inmunosupresores, antibióticos, antivirales, fármacos que potencian la inmunidad, hormonas, PGE2 y combinaciones de los mismos. Los ejemplos no limitativos de métodos o terapias que pueden usarse en combinación con la administración del compuesto de la invención incluyen inyecciones o infusiones de anticuerpos, y trasplante de células madre.

El compuesto de la invención puede usarse con al menos un segundo agente activo en los usos de la invención descritos en la presente memoria. Esta invención engloba combinaciones sinérgicas para el tratamiento, prevención y/o gestión de una o más enfermedades descritas en la presente memoria. El compuesto de la invención también puede usarse para aliviar efectos adversos o no identificados asociados con algunos segundos agentes activos, y a la inversa, algunos segundos agentes activos pueden usarse para aliviar efectos adversos o no identificados asociados con el compuesto de la invención.

En algunas realizaciones de interés, los segundos agentes activos pueden incluir antiinflamatorios, tales como acetaminofeno (p. ej., TYLENOL®), derivados del ácido 5-aminosalicílico, salicilatos, corticosteroides y fármacos antiinflamatorios no esteroideos. Un ejemplo no limitativo de derivados del ácido 5-aminosalicílico es sulfasalazina (p. ej., AZULFIDINE®). Un ejemplo no limitativo de salicilatos es ácido acetilsalicílico (p. ej., ASPIRINA®).

Los ejemplos no limitativos de corticosteroides incluyen dexametasona (p. ej., AZIUM® o VOREN®), hidrocortisona (p. ej., CETACORT®, HYTONE® o NUTRACORT®), beclometasona (p. ej., VANCERIL®), budesonida (p. ej., PULMICORT®), fluticasona (p. ej., FLONASE® o FLOVENT®), metilprednisolona (p. ej., DEPO-MEDROL®, SOLU-MEDROL® o MEDROL®), furoato de mometasona (p. ej., NASONE® o ELOCON®), prednisona (p. ej., DELTASONE®, ORASONE®, PREDNICEN-M® o LIQUID PRED®) y triamcinolona (p. ej., AZMACORT®).

Los ejemplos no limitativos de fármacos antiinflamatorios no esteroideos incluyen diclofenac (p. ej., ARTHROTEC®), diflunisal (p. ej., DOLOBID®), etodolac (p. ej., LODINE®), fenoprofeno (p. ej., NALFON®), ibuprofeno (p. ej., ADVIL®, ADVIL/MOTRIN® PEDIÁTRICO, MEDIPREN®, MOTRIN®, NUPRIN® o PEDIACARE FEVER®), indometacina (p. ej., ARTHREXIN®), ketoprofeno (p. ej., ORUVAIL®), ketorolac (p. ej., TORADOL®), fosfomicina trometamina (p. ej., MONURAL®), meclofenamato (p. ej., Meclomen®), nabumetona (p. ej., RELAFEN®), naproxeno (p. ej., ANAPROX®, ANAPROX® DS, EC-NAPROSYN®, NAPRELAN® o NAPROSYN®), oxaprozina (p. ej., DAYPRO®), piroxicam (p. ej., FELDENE®), sulindac (p. ej., CLINORIL®), y tolmetina (p. ej., TOLECTIN® DS o TOLECTIN®).

En otras realizaciones de interés, los segundos agentes activos pueden incluir antipalúdicos, tales como cloroquina (p. ej., ARALEN®) e hidroxicloroquina (p. ej., PLAQUENIL®); inmunosupresores, tales como azatioprina (p. ej., IMURAN®), ciclofosfamida (p. ej., CYTOXAN®), clorambucilo (p. ej., LEUKERAN®) y melfalán (p. ej., ALKERAN®); y compuestos inmunomoduladores, tales como azatioprina (p. ej., IMURAN®), ciclofosfamida (p. ej., CYTOXAN®), metotrexato (p. ej., RHEUMATREX®) y ciclosporina (p. ej., NEORAL® o SANDIMMUNE®).

En realizaciones adicionales de interés, los segundos agentes activos pueden incluir antibióticos (terapéuticos o profilácticos), tales como ampicilina (p. ej., UNASYN®), tetraciclina (p. ej., ACHROMYCIN® o SUMYCIN®), penicilina (p. ej., AMOXIL®, POLYMOX®, TRIMOX®, SPECTROBID® o GEOCILLIN®), cefalosporinas (p. ej., OMNICEF®, SPECTRACEF®, SUPRAX®, VANTIN®, CEFZIL® o CEDAX®), estreptomicina (p. ej., ZANOSAR®), kanamicina (p. ej., KANTREX®) y eritromicina (p. ej., E.E.S.®, E-MYCIN®, ERYC, ERY-TAB®, ERYTHROCIN® o PCE®); antivirales, tales como amantadina (p. ej., SYMMETREL®), rimantadina (p. ej., FLUMADINE®), aciclovir (p. ej., ZOVIRAX®) y ribavirina (p. ej., VIRAZOLE®); inmunoglobulina; fármacos que potencian la inmunidad, tales como levamisol (p. ej., ERGAMISOL®) e inosina pranobex (ISOPRINOSINE®); biológicos, tales como gammaglobulina, factor de transferencia, interleuquinas e interferones; hormonas, tales como tímica; y otros agentes inmunológicos, tales como estimuladores de las células B (p. ej., BAFF/BlyS), citoquinas (p. ej., IL-2, IL-4 e IL-5), factores de crecimiento (p. ej., TGF-β), anticuerpos (p. ej., anti-CD40 e IgM), oligonucleótidos que contienen restos CpG no metilados (p. ej., TCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT) y vacunas (p. ej., vacunas con péptidos virales y tumorales).

Los usos específicos de la invención comprenden administrar (+)-2-[1-(3-etoxi-4-metoxifenil)-2-metilsulfoniletil]-4-acetilaminoisoidolinolona-1,3-diona, o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, en combinación con al menos un segundo agente activo u otra terapia.

La cantidad administrada del segundo agente activo puede determinarse sobre la base del agente específico usado, el tipo de enfermedad que se está tratando o gestionando, la gravedad y estadio de la enfermedad, y la o las cantidades de los compuestos de la invención y cualesquiera segundos agentes activos opcionales adicionales que

se administran concurrentemente al paciente. Los expertos en la técnica pueden determinar las cantidades específicas según procedimientos convencionales conocidos en la técnica. Al principio, 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, p. ej., *Physician's Desk Reference* (56ª Ed., 2004). Además, las cantidades y métodos de administración de los segundos agentes activos descritos en la presente memoria para el tratamiento, prevención y/o gestión de una o más enfermedades descritas en la presente memoria se describen en la bibliografía, p. ej., *Physician's Desk Reference* (56ª Ed., 2004).

### 6.3.2 Terapia cíclica

En algunas realizaciones, el compuesto de la invención puede administrarse cíclicamente a un paciente que tiene la enfermedad descrita en la presente memoria. La terapia cíclica implica la administración del compuesto de la invención durante un periodo de tiempo, seguido de un descanso durante un periodo de tiempo y la repetición de esta administración secuencial. La terapia cíclica puede reducir el desarrollo de resistencia a una o más de las terapias, evitar o reducir los efectos secundarios de una de las terapias y/o mejorar la eficacia del tratamiento.

Consecuentemente, en una realización específica, el compuesto de la invención se administra diariamente en una única dosis o dosis divididas en un ciclo de cuatro a seis semanas con un periodo de descanso de aproximadamente una semana o dos semanas. La invención permite además que se incrementen la frecuencia, número y duración de los ciclos de dosificación. Así, otra realización engloba la administración del compuesto de la invención durante más ciclos que los típicos cuando se administra solo. En otra realización más, el compuesto de la invención se administra durante un número mayor de ciclos de los que causarían típicamente toxicidad limitante de la dosis en un paciente a quien no se está administrando también un segundo ingrediente activo.

En algunas realizaciones, la (+)-2-[1-(3-etoxi-4-metoxifenil)-2-metilsulfoniletil]-4-acetilaminoisoindolina-1,3-diona se administra diariamente y continuamente durante tres o cuatro semanas a una dosis de aproximadamente 10 a aproximadamente 200 mg al día, seguido de un descanso de una o dos semanas. En determinadas realizaciones, la {2-[(1S)-1-(3-etoxi-4-metoxifenil)-2-(metilsulfonil)etil]-3-oxoisoindolin-4-il}carboxamida de ciclopropilo se administra diariamente y continuamente durante tres o cuatro semanas a una dosis de aproximadamente 10 a aproximadamente 200 mg al día, seguido de un descanso de una o dos semanas.

En otra realización, el compuesto de la invención y un segundo ingrediente activo se administran oralmente, ocurriendo la administración del compuesto de la invención 30 a 60 minutos antes de un segundo ingrediente activo, durante un ciclo de cuatro a seis semanas. En otra realización, la combinación del compuesto de la invención y un segundo ingrediente activo se administra por infusión intravenosa durante aproximadamente 90 minutos cada ciclo. En una realización, un ciclo comprende la administración de aproximadamente 0.1 a aproximadamente 200 mg/día del compuesto de la invención y de aproximadamente 50 a aproximadamente 200 mg/m<sup>2</sup>/día de un segundo ingrediente activo diariamente durante tres a cuatro semanas y después una o dos semanas de descanso. En otra realización, cada ciclo comprende la administración de aproximadamente 1 a aproximadamente 30 mg/día del compuesto de la invención y de aproximadamente 50 a aproximadamente 200 mg/m<sup>2</sup>/día de un segundo ingrediente activo durante 3 a 4 semanas, seguido de una o dos semanas de descanso. Típicamente, el número de ciclos durante los cuales se administra el tratamiento de combinación a un paciente será de aproximadamente uno a aproximadamente 24 ciclos, más típicamente de aproximadamente dos a aproximadamente 16 ciclos e incluso más típicamente de aproximadamente cuatro a aproximadamente tres ciclos.

La cantidad administrada de la composición farmacéutica según los métodos de la invención dependerá del sujeto que se está tratando, de la gravedad del trastorno o síntoma del trastorno, de la manera de administración, de la frecuencia de la administración y del criterio del médico responsable.

La frecuencia de la administración está en el intervalo de aproximadamente una dosis a la hora a una dosis mensual. En algunas realizaciones, la administración es de 8 veces al día a una vez cada dos días o de 1 a 3 veces al día. En una realización, una composición farmacéutica de la invención se administra crónicamente, p. ej., diariamente.

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, debe indicarse que el sanitario o médico responsable del tratamiento sabrá cómo y cuándo interrumpir, ajustar, o terminar la terapia conjuntamente con la respuesta del paciente individual.

### 6.4 Dosis

En una realización, la (+)-2-[1-(3-etoxi-4-metoxifenil)-2-metilsulfoniletil]-4-acetilaminoisoindolina-1,3-diona puede administrarse oralmente y en dosis únicas o divididas diarias en una cantidad de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 1000 mg al día, proporcionada como una única dosis una vez al día, preferiblemente como dosis divididas a lo largo de un día. Más específicamente, la dosis diaria de (+)-2-[1-(3-etoxi-4-metoxifenil)-2-metilsulfoniletil]-4-acetilaminoisoindolina-1,3-diona se administra dos veces al día en dosis divididas igualmente. Específicamente, un intervalo de dosis diaria de (+)-2-[1-(3-etoxi-4-metoxifenil)-2-metilsulfoniletil]-4-acetilaminoisoindolina-1,3-diona puede ser de aproximadamente 5 mg a aproximadamente 500 mg al día, más específicamente, entre aproximadamente 10 mg y aproximadamente 200 mg al día. Específicamente, la dosis diaria de (+)-2-[1-(3-etoxi-4-metoxifenil)-2-

metilsulfoniletil]-4-acetilaminoisoidolina-1,3-diona puede administrarse en formas de dosificación de 5 mg, 10 mg, 15 mg, 20 mg, 25 mg, 30 mg, 50 mg, o 100 mg. En la gestión del paciente, la terapia debería iniciarse a una dosis más baja, quizás aproximadamente 1 mg a aproximadamente 30 mg, e incrementarse si es necesario hasta aproximadamente 200 mg a aproximadamente 1000 mg al día bien como una única dosis o dosis divididas, dependiendo de la respuesta global del paciente. Específicamente, la (+)-2-[1-(3-etoxi-4-metoxifenil)-2-metilsulfoniletil]-4-acetilaminoisoidolina-1,3-diona puede administrarse en 10 mg, 20 mg, y 30 mg dos veces al día. Alternativamente, la (+)-2-[1-(3-etoxi-4-metoxifenil)-2-metilsulfoniletil]-4-acetilaminoisoidolina-1,3-diona puede administrarse en 40 mg una vez al día. Alternativamente, la dosis diaria es de 0.01 mg/kg a 100 mg/kg.

En algunos aspectos, la {2-[(1S)-1-(3-etoxi-4-metoxifenil)-2-(metilsulfonil)etil]-3-oxoisindolin-4-il}carboxamida de ciclopropilo puede administrarse oralmente y en dosis únicas o divididas diarias en una cantidad de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 1000 mg al día, proporcionada como una única dosis una vez al día, preferiblemente como dosis divididas a lo largo de un día. Más específicamente, la dosis diaria de {2-[(1S)-1-(3-etoxi-4-metoxifenil)-2-(metilsulfonil)etil]-3-oxoisindolin-4-il}carboxamida de ciclopropilo se administra dos veces al día en dosis divididas igualmente. Específicamente, un intervalo de dosis diaria de {2-[(1S)-1-(3-etoxi-4-metoxifenil)-2-(metilsulfonil)etil]-3-oxoisindolin-4-il}carboxamida de ciclopropilo puede ser de aproximadamente 5 mg a aproximadamente 500 mg al día, más específicamente, entre aproximadamente 10 mg y aproximadamente 200 mg al día. Específicamente, la dosis diaria de {2-[(1S)-1-(3-etoxi-4-metoxifenil)-2-(metilsulfonil)etil]-3-oxoisindolin-4-il}carboxamida de ciclopropilo puede administrarse en formas de dosificación de 5 mg, 10 mg, 15 mg, 20 mg, 25 mg, 30 mg, 50 mg, o 100 mg. En la gestión del paciente, la terapia debería iniciarse a una dosis más baja, quizás aproximadamente 1 mg a aproximadamente

30 mg, e incrementarse si es necesario hasta aproximadamente 200 mg a aproximadamente 1000 mg al día bien como una única dosis o dosis divididas, dependiendo de la respuesta global del paciente. Específicamente, la {2-[(1S)-1-(3-etoxi-4-metoxifenil)-2-(metilsulfonil)etil]-3-oxoisindolin-4-il}carboxamida de ciclopropilo puede administrarse en 10 mg, 20 mg, y 30 mg dos veces al día. Alternativamente, la dosis diaria es de 0.01 mg/kg a 100 mg/kg.

Varias formas de dosificación de la invención se discuten en la sección 5.5 más adelante. En una realización, las formas de dosificación típicas de la invención comprenden (+)-2-[1-(3-etoxi-4-metoxifenil)-2-metilsulfoniletil]-4-acetilaminoisoidolina-1,3-diona, en una cantidad de aproximadamente 0.10 a aproximadamente 1000 mg, de aproximadamente 0.10 a aproximadamente 800 mg, de aproximadamente 0.10 a aproximadamente 600 mg, de aproximadamente 0.10 a aproximadamente 500 mg, de aproximadamente 0.10 a aproximadamente 400 mg, de aproximadamente 0.10 a aproximadamente 300 mg, de aproximadamente 0.10 a aproximadamente 200 mg, o de aproximadamente 0.10 a aproximadamente 100 mg. En una realización, las formas de dosificación típicas comprenden el compuesto en una cantidad de aproximadamente 1, 2, 5, 10, 25, 30, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, o 500 mg.

En una realización, las formas de dosificación típicas comprenden el segundo ingrediente activo en una cantidad de 1 a aproximadamente 1000 mg, de aproximadamente 5 a aproximadamente 500 mg, de aproximadamente 10 a aproximadamente 350 mg o de aproximadamente 50 a aproximadamente 200 mg. Por supuesto, la cantidad específica del agente dependerá del agente específico usado, del tipo de enfermedad o trastorno que se está tratando o gestionando, y de la o las cantidades de los compuestos de la invención y cualesquiera segundos agentes activos opcionales adicionales administrados concurrentemente al paciente.

## 6.5 Composiciones farmacéuticas y formas de dosificación

Pueden usarse composiciones farmacéuticas en la preparación de formas de dosificación unitarias individuales. Las composiciones farmacéuticas y las formas de dosificación descritas en la presente memoria pueden comprender los compuestos de la invención, o una sal, solvato o estereoisómero farmacéuticamente aceptable del mismo, y opcionalmente un segundo agente activo. Los ejemplos de los segundos agentes activos opcionales están descritos en la presente memoria (véase, p. ej., la sección 6.3.1). Las composiciones farmacéuticas y las formas de dosificación descritas en la presente memoria pueden comprender además uno o más vehículos, excipientes o diluyentes.

Las formas de dosificación unitarias descritas en la presente memoria son adecuadas para la administración oral, mucosal (p. ej., sublingual, nasal, vaginal, cística, rectal, prepucial, ocular, bucal o aural), parenteral (p. ej., subcutánea, intravenosa, inyección en bolo, intramuscular o intraarterial), tópica (p. ej., 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 elásticas blandas; obleas; tabletas; pastillas para chupar; dispersiones; supositorios; polvos; aerosoles (p. ej., pulverizadores o inhaladores nasales); geles; formas de dosificación líquidas adecuadas para administración oral o mucosal a un paciente, incluyendo suspensiones (p. ej., suspensiones líquidas acuosas o no acuosas, emulsiones de aceite en agua o emulsiones líquidas de agua en aceite), 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 (p. ej., 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 de la invención variará 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 de lo que comprende 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 de lo que comprende una forma de dosificación oral usada para tratar la misma enfermedad. Estas y otras formas en las que las formas de dosificación específicas englobadas por esta invención variarán entre sí serán fácilmente evidentes para los expertos en la técnica. Véase, p. 5 ej., *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 18ª ed., Mack Publishing, Easton PA (1990).

Las composiciones farmacéuticas y formas de dosificación típicas comprenden uno o más excipientes. Los excipientes adecuados son muy conocidos para los expertos en la técnica de farmacia y en la presente memoria se proporcionan ejemplos no limitativos de excipientes adecuados. Si un excipiente particular es adecuado para la incorporación en una composición farmacéutica o forma de dosificación depende de una variedad de factores muy conocidos en la técnica, incluyendo 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 adecuados 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, esta invención engloba composiciones farmacéuticas y formas de dosificación que contienen poca, si algo de, lactosa u otros mono o disacáridos. Tal y como se usa en la presente memoria, el término "carece de lactosa" significa que la cantidad de lactosa presente, si hay algo, es insuficiente para incrementar sustancialmente la tasa de degradación de un ingrediente activo. 10 15 20

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

Esta invención engloba además 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 (p. ej., 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, p. ej., 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 ser muy significativo ya que la hidratación y/o humedad están presentes comúnmente durante la fabricación, manipulación, envasado, almacenamiento, transporte y uso de las formulaciones. 30 35

Las composiciones farmacéuticas y formas de dosificación anhidras de la invención pueden prepararse usando ingredientes anhidros o con bajo contenido en humedad o condiciones de baja hidratación 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 hidratación y/o humedad durante la fabricación, envasado y/o almacenamiento. 40

Una composición farmacéutica anhidra debería 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 previenen la exposición al agua de manera que pueden incluirse en kits de formulación adecuados. Los ejemplos no limitativos de envase adecuado incluyen aluminios, plásticos, contenedores de dosis unitarias (p. ej., viales), envases blíster y envases de tiras herméticamente sellados. 45

La invención engloba además composiciones farmacéuticas y formas de dosificación que comprenden uno o más compuestos que reducen la tasa a la que se descompondrá un ingrediente activo. Dichos compuestos, que se refieren en la presente memoria como "estabilizadores", incluyen antioxidantes, tales como ácido ascórbico, tampones de pH o tampones de sales. Como las cantidades y tipos de excipientes, las cantidades y tipos específicos de ingredientes activos en una forma de dosificación pueden diferir dependiendo de factores tales como la ruta por la que se va a administrar a pacientes. 50

La invención engloba además un compuesto para uso en métodos para tratar alopecia areata, mediante la administración de una o más composiciones farmacéuticas y formas de dosificación descritas en la presente memoria a un paciente que tiene la enfermedad. 55

### 6.5.1 Formas de dosificación orales

Las composiciones farmacéuticas descritas en la presente memoria que son adecuadas para administración oral pueden presentarse como formas de dosificación discretas, tales como comprimidos (p. ej., comprimidos masticables), comprimidos oblongos, cápsulas y líquidos (p. ej., 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*, 18ª ed., Mack Publishing, Easton PA (1990).

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

Debido a su facilidad de administración, los comprimidos y las cápsulas representan las formas de dosificación unitaria oral más ventajosas, en cuyo caso, se emplean excipientes sólidos. Si se desea, los comprimidos pueden recubrirse por técnicas estándar acuosas o no acuosas. Dichas formas de dosificación pueden prepararse por cualquiera de los métodos de farmacia. En general, las composiciones farmacéuticas y las formas de dosificación se preparan mezclando uniformemente e íntimamente los ingredientes activos con vehículos líquidos, vehículos sólidos finamente divididos o ambos y después dando 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 limitativos de excipientes que pueden usarse en las formas de dosificación orales descritas en la presente memoria incluyen aglutinantes, rellenos, disgregantes y lubricantes. Los ejemplos no limitativos de aglutinantes adecuados para uso en las composiciones farmacéuticas y las formas de dosificación incluyen almidón de maíz, almidón de patata u otros almidones, gelatina, gomas naturales y sintéticas, tales como goma arábiga, alginato de sodio, ácido algínico, otros alginatos, goma de tragacanto en polvo, goma guar, celulosa y sus derivados (p. ej., etil celulosa, acetato de celulosa, carboximetil celulosa de calcio, carboximetil celulosa de sodio), polivinil pirrolidona, metil celulosa, almidón pregelatinizado, hidroxipropil metil celulosa, (p. ej., Nos. 2208, 2906, 2910), celulosa microcristalina y mezclas de los mismos.

Los ejemplos no limitativos de formas adecuadas de celulosa microcristalina incluyen los materiales vendidos como AVICEL-PH-101, AVICEL-PH-103 AVICEL RC-581, AVICEL-PH-105 (disponibles en FMC Corporation, American Viscose Division, Avicel Sales, Marcus Hook, PA) y mezclas de los mismos. 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 humedad adecuados incluyen AVICEL-PH-103™ y Almidón 1500 LM.

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

Los disgregantes se usan en las composiciones farmacéuticas descritas 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 durante el almacenamiento, mientras que aquellos que contienen demasiado poco pueden no disgregarse a una velocidad deseada o bajo las condiciones deseadas. Así, debería usarse una cantidad suficiente de disgregante que no sea ni demasiado alta ni demasiado baja para alterar de forma perjudicial la liberación de los ingredientes activos para formar las formas de dosificación orales sólidas de la invención. La cantidad de disgregante usada varía sobre la base del tipo de formulación y es fácilmente averiguable por 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 limitativos de disgregantes que pueden usarse en las composiciones farmacéuticas y las formas de dosificación descritas 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 pregelatinizado, otros almidones, arcillas, otras alginas, otras celulosas, gomas y mezclas de los mismos.

Los ejemplos no limitativos de lubricantes que pueden usarse en las composiciones farmacéuticas y las formas de dosificación descritas en la presente memoria incluyen estearato de calcio, estearato de magnesio, aceite mineral, aceite mineral ligero, glicerina, sorbitol, manitol, polietilén glicol, otros glicoles, ácido esteárico, lauril sulfato de sodio, talco, aceite vegetal hidrogenado (p. ej., 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 los mismos. Los lubricantes adicionales incluyen, por ejemplo, un gel de sílice siloide (AEROSIL200, fabricado por W.R. Grace Co. de Baltimore, MD), un aerosol coagulado de sílice sintética (fabricado 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 los mismos. Si se usan, los lubricantes se usan típicamente en una cantidad de menos de aproximadamente el 1 por ciento en peso de las composiciones farmacéuticas o formas de dosificación en las que se incorporan.

Una forma de dosificación oral sólida particular de la invención comprende el compuesto de la invención (p. ej., (+)-2-[1-(3-etoxi-4-metoxifenil)-2-metilsulfoniletil]-4-acetilaminoisindolina-1,3-diona), lactosa anhidra, celulosa microcristalina, polivinilpirrolidona, ácido esteárico, sílice coloidal anhidra y gelatina.

### 6.5.2 Formas de dosificación de liberación retardada

Los ingredientes activos de la invención 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 limitativos de medios de liberación controlada o dispositivos de administración incluyen aquellos 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 la liberación lenta o controlada de uno o más ingredientes activos usando, por ejemplo, hidropilmetil celulosa, otras matrices de polímeros, geles, membranas permeables, sistemas osmóticos, recubrimientos con múltiples capas, micropartículas, liposomas, microesferas o una combinación de los mismos para proporcionar el perfil de liberación deseado en proporciones variadas. Las formulaciones de liberación controlada adecuadas conocidas para los expertos en la técnica, incluyendo aquellas descritas en la presente memoria, pueden seleccionarse fácilmente para uso con los ingredientes activos de la invención. La invención engloba así formas de dosificación unitarias adecuadas para la administración oral, tales como comprimidos, cápsulas, perlas de gel y comprimidos oblongos que están adaptadas para la liberación controlada.

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

La mayoría de las formulaciones de liberación controlada se diseñan para liberar inicialmente una cantidad de fármaco (ingrediente activo) que produce de inmediato el efecto terapéutico deseado y liberan gradualmente y continuamente otras cantidades del 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 pH, temperatura, enzimas, agua u otras condiciones fisiológicas o compuestos.

### 6.5.3 Formas de dosificación parenterales

Las formas de dosificación parenterales pueden administrarse a pacientes por varias rutas incluyendo subcutánea, intravenosa (incluyendo inyección en bolo), intramuscular e intraarterial. Como su administración sobrepasa típicamente las defensas naturales de los pacientes frente a los contaminantes, las formas de dosificación parenterales son preferiblemente estériles o son capaces de ser esterilizadas antes de la administración a un paciente. Los ejemplos no limitativos 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 de la invención son muy conocidos para los expertos en la técnica. Los ejemplos no limitativos de vehículos adecuados incluyen Agua para Inyección USP; vehículos acuosos, tales como Inyección de Cloruro de Sodio, Inyección de Ringer, Inyección de Dextrosa, Inyección de Dextrosa y Cloruro de Sodio e Inyección de Ringer con Lactato; vehículos miscibles con agua, tales como alcohol etílico, polietilén glicol y polipropilén glicol; y vehículos no acuosos, tales como 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 de la invención. Por ejemplo, pueden usarse ciclodextrina y sus derivados para incrementar la solubilidad de los compuestos de la invención y sus derivados.

#### 6.5.4 Formas de dosificación tópicas, transdérmicas y mucosales

Los fármacos pueden aplicarse localmente en la piel y sus anexos o en una variedad de membranas mucosas. Las rutas que pueden usarse incluyen tópica, transdérmica, sublingual, nasal, vaginal, cística, rectal, prepucial, ocular, bucal o aural. Se han desarrollado muchas formas de dosificación para administrar los principios activos al sitio de la aplicación para producir efectos locales. Las formas de dosificación transdérmica, tópica y mucosal de la invención incluyen disoluciones oftálmicas, pulverizaciones, aerosoles, cremas, lociones, pomadas, geles, disoluciones, emulsiones, suspensiones, u otras formas conocidas para un experto en la técnica. Véase, p. ej., *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 16ª y 18ª eds., Mack Publishing, Easton PA (1980 y 1990); 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. Además, las formas de dosificación transdérmicas incluyen parches de "tipo reservorio " o "tipo matriz", que pueden aplicarse en la piel y llevarse durante un periodo de tiempo específico para permitir la penetración de una cantidad deseada de ingredientes activos.

Los excipientes adecuados (p. ej., vehículos y diluyentes) y otros materiales que pueden usarse para proporcionar formas de dosificación tópicas, transdérmicas y mucosales englobadas por esta invención son muy conocidos para los expertos en las técnicas farmacéuticas, y dependen del tejido particular al que se aplicará una composición farmacéutica o forma de dosificación dada. Con este hecho en la mente, los 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 los mismos para formar lociones, tinturas, cremas, emulsiones, geles o pomadas, que no son tóxicas y son farmacéuticamente aceptables. También pueden añadirse hidratantes tales como oclusivos, humectantes, emolientes y rejuvenecedores proteicos a las composiciones farmacéuticas y formas de dosificación, si se desea. Los ejemplos de dichos ingredientes adicionales son muy conocidos en la técnica. Véase, p. ej., *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 16ª y 18ª eds., Mack Publishing, Easton PA (1980 y 1990).

Los oclusivos son sustancias que bloquean físicamente la pérdida de agua en el estrato córneo. Los ejemplos no limitativos de oclusivos incluyen petrolato, lanolina, aceite mineral, siliconas, tales como dimeticona, óxido de cinc y combinaciones de los mismos. Preferiblemente, los oclusivos son petrolato y lanolina, más preferiblemente petrolato en una concentración mínima del 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 llega a 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 empeorar la sequedad. Los ejemplos no limitativos de humectantes incluyen glicerina, sorbitol, urea, alfa-hidroxi ácidos, azúcares y combinaciones de los mismos. 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 las escamas de la piel con gotitas de aceite, y no son habitualmente oclusivos a no ser que se apliquen en gran cantidad. Cuando se combinan con un emulsionante, pueden ayudar a mantener el aceite y el agua en el estrato córneo. La vitamina E es un aditivo común, que parece no tener efecto, excepto como un emoliente. Asimismo, también se añaden otras vitaminas, por ejemplo, A y D, pero su efecto es cuestionable. Los ejemplos no limitativos de emolientes incluyen aceite mineral, lanolina, ácidos grasos, colesterol, escualeno, lípidos estructurales y combinaciones de los mismos.

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

Dependiendo del tejido específico que se va a tratar, pueden usarse componentes adicionales antes de, conjuntamente con, o posteriormente al tratamiento con ingredientes activos de la invención. Por ejemplo, pueden usarse potenciadores de la penetración para ayudar a administrar los ingredientes activos en el tejido. Los potenciadores de la penetración adecuados incluyen: acetona; varios alcoholes, tales como etanol, oleílico, y tetrahidrofurfílico; sulfóxidos de alquilo, tales como dimetil sulfóxido; dimetil acetamida; dimetil formamida; polietilen glicol; pirrolidonas, tales como polivinilpirrolidona; grados Kollidon (Povidona, Polividona); urea; y varios ésteres de azúcar solubles o insolubles en agua, tales como Tween 80 (polisorbato 80) y Span 60 (monoestearato de sorbitán).

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 disolvente vehicular, su fuerza iónica o tonicidad pueden ajustarse para mejorar la administración. Por ejemplo, la absorción a través de la piel también puede potenciarse por vendajes oclusivos, untura o el uso de dimetil sulfóxido como un vehículo. Los compuestos tales como estearatos metálicos (p. ej., 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 hidrofiliidad o lipofiliidad 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 potenciador de la administración o potenciador de la penetración. Pueden usarse diferentes sales, hidratos o solvatos de los ingredientes activos para ajustar adicionalmente las propiedades de la composición resultante.

## 6. Ejemplos

Algunas realizaciones se ilustran por los siguientes ejemplos no limitativos. Los ejemplos no deben considerarse como una limitación en el alcance de los mismos. El alcance de la invención se define solamente por las reivindicaciones adjuntas.

- 5 Ejemplo 1: preparación de (+)-2-[1-(3-etoxi-4-metoxifenil)-2-metilsulfoniletil]-4-acetilaminoisindolina-1,3-diona [Compuesto (I)]

Preparación de ácido 3-aminofáltico. Después de cargar una mezcla de 10 % de Pd/C (2.5 g), ácido 3-nitroftálico (75.0 g, 355 mmoles) y etanol (1.5 L) en un hidrogenador Parr de 2.5 L bajo nitrógeno, se cargó hidrógeno en el recipiente de reacción hasta 55 psi (379 kPa). La mezcla se agitó durante 13 horas mientras la presión de hidrógeno se mantuvo a entre 50 psi (245 kPa) y 55 psi (379 kPa). 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 en vacío para rendir un sólido. El sólido se suspendió en éter y se aisló por filtración en vacío. El sólido se secó en vacío hasta un peso constante para rendir 54 g (84 % de rendimiento) de ácido 3-aminofáltico como un producto amarillo. El producto en DMSO- $d_6$  se caracterizó por un espectro de  $^1H$  RMN que mostró los siguientes desplazamientos químicos ( $\delta$  en ppm): 3.17 (s, 2H), 6.67 (d, 1H), 6.82 (d, 1H), 7.17 (t, 1H), 8-10 (brs, 2H). El producto en DMSO- $d_6$  se caracterizó por un espectro de  $^{13}C$ -RMN que mostró los siguientes desplazamientos químicos ( $\delta$  en ppm): 112.00, 115.32, 118.20, 131.28, 135.86, 148.82, 169.15, 170.09.

Preparación de anhídrido 3-acetamidofáltico. Una mezcla de ácido 3-aminofáltico (108 g, 596 mmoles) y anhídrido acético (550 mL) se cargó en un matraz de fondo redondo de 3 bocas de 1 L equipado con un agitador mecánico, un termómetro, y un condensador. La mezcla de reacción se puso a reflujo durante 3 horas, se enfrió hasta temperatura ambiente, y se mantuvo a 0-5 °C durante otra hora. El sólido cristalino se recogió por filtración en vacío y se lavó con éter. El producto sólido se secó en vacío a temperatura ambiente hasta un peso constante para rendir 75 g (61 % de rendimiento) de anhídrido 3-acetamidofáltico como un producto blanco. El producto en  $CDCl_3$  se caracterizó por un espectro de  $^1H$  RMN que mostró los siguientes desplazamientos químicos ( $\delta$  en ppm): 2.21 (s, 3H), 7.76 (d, 1H), 7.94 (t, 1H), 8.42 (d, 1H), 9.84 (s, 1H).

Resolución de 2-(3-etoxi-4-metoxifenil)-1-(metilsulfonil)-et-2-ilamina. Una mezcla de 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) se cargó en un matraz de fondo redondo de 3 bocas de 3 L equipado con un agitador mecánico, un termómetro, y un condensador. Después de poner la mezcla de reacción a reflujo durante 1 hora, la mezcla se dejó enfriar hasta temperatura ambiente y después se agitó durante otras 3 horas 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 en vacío 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 en vacío a 30 °C hasta un peso constante, rindiendo 49.6 g (90 % de recuperación) de sal de (S)-2-(3-etoxi-4-metoxifenil)-1-(metilsulfonil)-et-2-ilamina-N-acetil-L-leucina (98.4 % ee). HPLC quiral (1/99 EtOH/20 mM  $KH_2PO_4$  a pH 7.0, Ultron Chiral ES-OVS de Agilent Technologies, 150 mm 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 %).

Preparación de (+)-2-[1-(3-etoxi-4-metoxifenil)-2-metilsulfoniletil]-4-acetilaminoisindolina-1,3-diona. Un matraz de fondo redondo de 3 bocas de 500 mL se equipó con un agitador mecánico, un termómetro, y un condensador. El recipiente de reacción se cargó con sal de (S)-2-(3-etoxi-4-metoxifenil)-1-(metilsulfonil)-et-2-ilamina N-acetil-L-leucina (25 g, 56 mmoles, 98 % ee), anhídrido 3-acetamidofáltico (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. Después de eliminar el disolvente en vacío, 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), y salmuera (250 mL x 2), y después se secó sobre sulfato de sodio anhidro. Después de evaporar el disolvente en vacío, el residuo se recristalizó de un disolvente binario que contenía una mezcla de etanol (150 mL) y acetona (75 mL). El sólido se aisló por filtración en vacío y se lavó con etanol (100 mL x 2). El producto se secó en vacío 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-inoisindolina-1,3-diona con 98 % ee. HPLC quiral (15/85 EtOH/20 mM  $KH_2PO_4$  a pH .5, Ultron Chiral 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 %). El producto en  $CDCl_3$  se caracterizó por un espectro de  $^1H$  RMN que mostró los siguientes desplazamientos químicos ( $\delta$  en ppm): 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). El producto en DMSO- $d_6$  se caracterizó por un espectro de  $^{13}C$  RMN que mostró los siguientes desplazamientos químicos ( $\delta$  en ppm): 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.

55 Ejemplo 2: preparación de {2-[(1S)-1-(3-etoxi-4-metoxifenil)-2-(metilsulfonil)etil]-3-oxoisindolin-4il}carboxamida de ciclopropilo

5 La {2-[(1S)-1-(3-etoxi-4-metoxifenil)-2-(metilsulfonyl)etil]-3-oxoisindolin-4-il}carboxamida de ciclopropilo se preparó según el procedimiento de preparación para el Ejemplo 57 de la Patente U.S. No. 6 667 316. Una mezcla agitada de 7-amino-2-[(1S)-1-(3-etoxi-4-metoxifenil)-2-(metilsulfonyl)etil]isoindolin-1-ona (1.7 g, 4.2 mmoles) y cloruro de ciclopropanocarbonilo (0.46 mL, 5.1 mmoles) en tetrahidrofurano (10 mL) se calentó a reflujo durante 15 minutos. A la mezcla se añadió metanol (4 mL) a temperatura ambiente y la mezcla se agitó durante 10 minutos. El disolvente se eliminó en vacío para rendir un aceite. El aceite se recristalizó de etanol (20 mL) para proporcionar el Compuesto (II) como un sólido blanco (1.4 g, 71 % de rendimiento); p.f. 172-174 °C; <sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>) δ: 0.86-0.93 (m, 2H, 2CHH), 1.07-1.14 (m, 2H, 2CHH), 1.46 (t, J=6.9 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.63-1.73 (m, 1H, CH), 2.95 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 3.68 (dd, J=4.4, 14.3 Hz, 1H, CHH), 3.86 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 4.07 (q, J=7.1 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>), 4.20 (d, J=16.7 Hz, 1H, CHH), 4.21 (dd, J=9.9, 14.3 Hz, 1H, CHH), 4.44 (d, J=16.7 Hz, 1H, CHH), 5.73 (dd, J=4.3, 9.9 Hz, 1H, NCH), 6.84-7.02 (m, 4H, Ar), 7.44 (t, J=7.8 Hz, 1H, Ar), 8.43 (d, J=8.3 Hz, 1H, Ar), 10.46 (s, 1H, NH); <sup>13</sup>C RMN (CDCl<sub>3</sub>) δ: 8.24, 14.61, 16.10, 41.43, 47.81, 51.55, 55.75, 55.88, 64.56, 111.46, 112.09, 116.69, 116.99, 117.76, 119.17, 129.27, 133.54, 138.06, 141.22, 148.84, 149.67, 169.96, 172.59; Anal. Calcd. para C<sub>24</sub>H<sub>28</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub>S: C, 61.00; H, 5.97; N, 5.93. Encontrado: C, 60.87; H, 6.13; N, 6.12.

## Ejemplo 3

15 Pueden prepararse comprimidos, conteniendo cada uno 50 miligramos de ingrediente activo, de la siguiente manera:

Composición (para 1000 comprimidos)	
ingrediente activo	50.0 gramos
lactosa	50.7 gramos
almidón de trigo	7.5 gramos
polietilen glicol 6000	5.0 gramos
talco	5.0 gramos
estearato de magnesio	1.8 gramos
agua desmineralizada	c.s.

20 Los ingredientes sólidos se fuerzan en primer lugar a través de un tamiz de 0.6 mm de anchura de malla. El ingrediente activo, la lactosa, el talco, el estearato de magnesio y la mitad del almidón se mezclan. El ingrediente activo es el compuesto de la invención, o una sal, solvato o estereoisómero farmacéuticamente aceptable del mismo. La otra mitad del almidón se suspende en 40 mililitros de agua y esta suspensión se añade a una disolución hirviendo del polietilen glicol en 100 mililitros de agua. La pasta resultante se añade a las sustancias pulverulentas y la mezcla se granula, si es necesario con la adición de agua. El granulado se seca toda la noche a 35 °C, se fuerza a través de un tamiz de 1.2 mm de anchura de malla y se comprime para formar comprimidos con un diámetro de aproximadamente 6 mm que son cóncavos en ambos lados.

## Ejemplo 4

25 Pueden prepararse comprimidos, conteniendo cada uno 100 miligramos de ingrediente activo, de la siguiente manera:

Composición (para 1000 comprimidos)	
ingrediente activo	100.0 gramos
lactosa	100.0 gramos
almidón de trigo	47.0 gramos
estearato de magnesio	3.0 gramos

30 Todos los ingredientes sólidos se fuerzan en primer lugar a través de un tamiz de 0.6 mm de anchura de malla. El ingrediente activo, la lactosa, el estearato de magnesio y la mitad del almidón se mezclan. La otra mitad del almidón se suspende en 40 mililitros de agua y esta suspensión se añade a 100 mililitros de agua hirviendo. La pasta resultante se añade a las sustancias pulverulentas y la mezcla se granula, si es necesario con la adición de agua. El granulado se seca toda la noche a 35 °C, se fuerza a través de un tamiz de 1.2 mm de anchura de malla y se comprime para formar comprimidos con un diámetro de aproximadamente 6 mm que son cóncavos en ambos lados.

## ES 2 711 100 T3

### Ejemplo 5

Pueden prepararse comprimidos para masticar, conteniendo cada uno 75 miligramos de ingrediente activo, de la siguiente manera:

Composición (para 1000 comprimidos)	
ingrediente activo	75.0 gramos
manitol	230.0 gramos
lactosa	150.0 gramos
talco	21.0 gramos
glicina	12.5 gramos
ácido esteárico	10.0 gramos
sacarina	1.5 gramos
disolución de gelatina al 5 %	c.s.

- 5 Todos los ingredientes sólidos se fuerzan en primer lugar a través de un tamiz de 0.25 mm de anchura de malla. El manitol y la lactosa se mezclan, se granulan con la adición de disolución de gelatina, se fuerzan a través de un tamiz de 2 mm de anchura de malla, se secan a 50 °C y se fuerzan de nuevo a través de un tamiz de 1.7 mm de anchura de malla. El ingrediente activo, la glicina y la sacarina se mezclan cuidadosamente. Se añaden el manitol, el granulado de lactosa, el ácido esteárico y el talco y el conjunto se mezcla concienzudamente y se comprime para formar comprimidos con un diámetro de aproximadamente 10 mm que son cóncavos en ambos lados y tienen una ranura de rotura en el lado superior.
- 10

### Ejemplo 6

Pueden prepararse comprimidos, conteniendo cada uno 10 miligramos de ingrediente activo, de la siguiente manera:

Composición (para 1000 comprimidos)	
ingrediente activo	10.0 gramos
lactosa	328.5 gramos
almidón de maíz	17.5 gramos
polietilén glicol 6000	5.0 gramos
talco	25.0 gramos
estearato de magnesio	4.0 gramos
agua desmineralizada	c.s.

- 15 Los ingredientes sólidos se fuerzan en primer lugar a través de un tamiz de 0.6 mm de anchura de malla. Después, el ingrediente activo, lactosa, talco, estearato de magnesio y la mitad del almidón se mezclan íntimamente. La otra mitad del almidón se suspende en 65 mililitros de agua y esta suspensión se añade a una disolución hirviendo de polietilén glicol en 260 mililitros de agua. La pasta resultante se añade a las sustancias pulverulentas, y el conjunto se mezcla y se granula, si es necesario con la adición de agua. El granulado se seca toda la noche a 35 °C, se fuerza a través de un tamiz de 1.2 mm de anchura de malla y se comprime para formar comprimidos con un diámetro de aproximadamente 10 mm que son cóncavos en ambos lados y tienen una muesca de rotura en el lado superior.
- 20

### Ejemplo 7

Pueden prepararse cápsulas rellenas de gelatina seca, conteniendo cada una 100 miligramos de ingrediente activo, de la siguiente manera:

25

## ES 2 711 100 T3

---

### Composición (para 1000 cápsulas)

---

ingrediente activo	100.0 gramos
celulosa microcristalina	30.0 gramos
lauril sulfato de sodio	2.0 gramos
estearato de magnesio	8.0 gramos

---

- 5 El lauril sulfato de sodio se tamiza en el ingrediente activo a través de un tamiz de 0.2 mm de anchura de malla y los dos componentes se mezclan íntimamente durante 10 minutos. Se añade entonces la celulosa microcristalina a través de un tamiz de 0.9 mm de anchura de malla y el conjunto se mezcla de nuevo íntimamente durante 10 minutos. Finalmente, se añade el estearato de magnesio a través de un tamiz de 0.8 mm de anchura y, después de mezclar durante 3 minutos adicionales, la mezcla se introduce en partes de 140 miligramos cada una en cápsulas rellenas de gelatina seca de tamaño 0 (elongadas).

#### Ejemplo 8

Puede prepararse una disolución al 0.2 % para inyección o infusión, por ejemplo, de la siguiente manera:

---

### Composición

---

ingrediente activo	5.0 gramos
cloruro de sodio	22.5 gramos
tampón fosfato pH 7.4	300.00 gramos
agua desmineralizada	hasta 2500.0 mililitros

---

- 10 El ingrediente activo se disuelve en 1000 mililitros de agua y se filtra a través de un microfiltro. Se añade la disolución de tampón y el conjunto se lleva hasta 2500 mililitros con agua. Para preparar formas de dosificación unitarias, se introducen partes de 1.0 o 2.5 mililitros cada una en ampollas de vidrio (conteniendo cada una respectivamente 2.0 o 5.0 miligramos de ingrediente activo).

#### 15 Ejemplo 9

Puede prepararse una pomada para uso tópico, por ejemplo, de la siguiente manera:

---

### Composición

---

ingrediente activo	10 g
petrolato	80 g
aceite mineral	120 g
disolución salina al 2 %	2 L
acetónido de triamcinolona	0.5 g

---

Los ingredientes anteriores se mezclan uniformemente para formar una pomada usando un mezclador u homogeneizador convencional, mediante agitación o mediante energía ultrasónica.

#### 20 Ejemplo 10

Puede prepararse un gel para uso tópico, por ejemplo, de la siguiente manera:

## ES 2 711 100 T3

Composición	
ingrediente activo	10 g
Carboximetil celulosa	0.2 g
Glicerina	40.0 g
Tampón citrato 0.4 moles/L	25.0 g
Agua destilada	hasta 100 g

Los ingredientes anteriores se mezclan uniformemente para formar un a gel usando un mezclador u homogeneizador convencional, mediante agitación o mediante energía ultrasónica.

### Ejemplo 11

- 5 Puede prepararse una pasta para uso tópico, por ejemplo, de la siguiente manera:

Composición	
ingrediente activo	10 g
Carboximetil celulosa	2.0 g
Glicerina	25.0 g
Cetanol	2.8 g
Monoestearato de glicerilo	9.3 g
Tween 80	2.0 g
Ácido glucurónico	1.0 g
Tampón citrato 0.4 moles/l	20.0 g
Agua destilada	hasta 100 g

Los ingredientes anteriores se mezclan uniformemente para formar una pasta usando un mezclador u homogeneizador convencional, mediante agitación o mediante energía ultrasónica.

### Ejemplo 12

- 10 Puede prepararse una composición líquida para uso tópico, por ejemplo, de la siguiente manera:

Composición	
ingrediente activo	10 g
Carboximetil celulosa	0.1 g
Glicerina	15.0 g
Tampón citrato 0.4 moles/l (pH 4.5)	50.0 g
Agua destilada	hasta 100 g

Los ingredientes sólidos se dispersan/disuelven en los ingredientes líquidos uniformemente para formar un líquido usando un mezclador u homogeneizador convencional, mediante agitación o mediante energía ultrasónica.

### Ejemplo 13

- 15 Puede prepararse una pulverización para uso tópico, por ejemplo, de la siguiente manera:

Composición	
La composición líquida del Ejemplo 12	100.0 g
Freón 114	100.0 g

La composición líquida y el Freón 114 se usan para rellenar contenedores de pulverización de aluminio recubiertos con Teflón.

Ejemplo 14: Efecto del Compuesto (II) en los niveles de MxA y citoqueratina de queratinocitos

#### 5 A) Materiales.

Las unidades de leucocitos humanos (capa leucoplaquetaria) se obtuvieron de donantes de sangre sanos (Blood Center of New Jersey, East Orange, NJ, EE.UU.). La disolución salina tamponada de Hank (HBSS) se obtuvo de VWR Scientific (Radnor, PA). El Ficoll-Paque Plus se obtuvo de Amersham Bioscience (No. de cat. 17-1440-02). Las células se crecieron en medio completo que consistía en Roswell Park Memorial Institute (RPMI-1640), 5 % de suero humano, 100 U·mL<sup>-1</sup> de penicilina, 100 mg mL<sup>-1</sup> de estreptomycin, L-glutamina 2 mM (componentes de VWR Scientific). Las células dendríticas plasmacitoides (pDC) se adquirieron en AllCélulas (No. de cat. PB013). El oligonucleótido CpG-A ODN 2216 (agonista de TLR9) se obtuvo de InvivoGen. Los queratinocitos epidérmicos humanos adultos (HEKa) se obtuvieron de ScienCell (No. de cat. 2110). Los anticuerpos primarios frente a MxA se obtuvieron de Novus Biologicals, y el anticuerpo frente a citoqueratina se obtuvo de Invitrogen. Los anticuerpos secundarios, concretamente los anticuerpos anti-cabra marcado con Alexa y anti-conejo fluoresceína (IgG1) o conjugados con TRITC (IgG) se obtuvieron de Invitrogen. Los núcleos celulares se tiñeron con DAPI o 4',6-diamidino-2-fenilindol de Invitrogen. El Compuesto (II) se obtuvo según los procedimientos de preparación descritos en la presente memoria.

#### 15 B) Métodos.

##### Purificación de PBMC.

20 Se dividieron leucocitos humanos (50 mL) en dos partes alícuotas de 25 mL y se añadieron a dos tubos cónicos de 50 mL que contenían 25 mL de HBSS estéril. Los tubos se mezclaron suavemente mediante inversión varias veces. Se dividió en partes alícuotas el Ficoll-Paque Plus (15 mL) a temperatura ambiente en cuatro tubos cónicos de 50 mL. Después, la mezcla de capa leucoplaquetaria/HBSS (25 mL) se puso en capas suavemente y lentamente en la parte superior del Ficoll-Paque Plus. Las muestras se centrifugaron con Centrífuga Eppendorf 5810R (Rotor A-4-81) a 450 rpm durante 35 minutos. La capa superior que contenía el plasma se desechó. La interfase que contenía células mononucleares se transfirió a dos tubos cónicos de 50 mL. Ambos tubos cónicos se llenaron hasta un volumen total de 50 mL con HBSS y se centrifugaron a 1200 rpm durante 10 minutos. Las células se lavaron de nuevo en HBSS y se centrifugaron a 1000 rpm durante 10 minutos. Se añadió tampón de lisis de células sanguíneas rojas humanas (5 mL) a los sedimentos celulares y se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente. Se añadió disolución salina tamponada con fosfato (45 mL) a los tubos cónicos y se centrifugó a 1200 rpm durante 10 minutos. Los sedimentos celulares se combinaron y se resuspendieron en 20 mL de medio completo y las células se contaron.

##### 30 Cocultivo de pDC/HEKa humanos.

El cocultivo de pDC/HEKa humanos implica la estimulación con el oligodesoxinucleótido CpG-A 2216. La estimulación con CpG-A inducirá a los pDC para secretar interferón-alfa (IFN- $\alpha$ ) que, a su vez, incita la expresión incrementada de la proteína MxA de los queratinocitos. Se sembraron en placas HEKa en placas de 6 pocillos a una densidad de  $1 \times 10^5$  células/pocillo y se incubó toda la noche en un medio de queratinocitos definido. El medio se retiró al día siguiente y se superpusieron  $1.8 \times 10^5$  células pDC, en medio pDC definido, sobre las células HEKa. El Compuesto (II) se añadió al medio para obtener concentraciones finales de 0.25  $\mu$ M, 0.5  $\mu$ M, 1  $\mu$ M y 2  $\mu$ M. Una hora después de la adición del Compuesto (II), se añadió CpG-A a cada una de estas concentraciones y se incubó toda la noche.

40 Las células se fijaron y los cocultivos se inmunotifieron con anticuerpos frente a la proteína A de resistencia a mixovirus de queratinocitos (MxA) y citoqueratina como sigue usando el ThermoScientific Cellomics Cribado de Alto Contenido (HCS) Readers usando software vHCS Scan.

Dieciocho horas después de la adición del Compuesto (II), los cocultivos se fijaron durante 30 minutos con tampón BD de fijación/permeabilización, se lavaron y se bloquearon con disolución de albúmina de suero de cabra normal/de suero bovino al 2 % durante una hora. Los cocultivos se incubaron entonces toda la noche con anticuerpos primarios frente a MxA y citoqueratina. Las células se lavaron e incubaron durante una hora con anticuerpos secundarios anti-cabra Alexa y anti-conejo fluoresceína (IgG1) o conjugados con TRITC (IgG). Los núcleos se tiñeron con DAPI o 4',6-diamidino-2-fenilindol. Los cocultivos se lavaron y se incubaron en 1X disolución salina tamponada con fosfato (PBS) y las placas se escanearon usando Thermo Scientific ArrayScan VTI HCS Reader, un instrumento modular de Cribado de Alto Contenido diseñado para imaginería de fluorescencia y análisis cuantitativo automatizado de alta capacidad de células fijadas y vivas. El resultado se analizó usando el algoritmo de Cellomics Compartmental Analysis para cuantificar los niveles de fluorescencia en los canales verde y rojo. Los datos se exportaron a hojas de trabajo de

Microsoft Excel. Los niveles de intensidad de la fluorescencia media de MxA y citoqueratina de las muestras se expresaron como porcentaje de los niveles de intensidad de la fluorescencia media de MxA y citoqueratina del Ejemplo A1. Se generaron histogramas y se realizaron análisis estadísticos usando GraphPad Prism v4.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA).

5 Las Figuras 1-2 muestran los niveles de MxA y citoqueratina de queratinocitos de las muestras promediados de cuatro experimentos independientes respecto a los niveles de MxA y citoqueratina de queratinocitos del Ejemplo A1 con pDC derivadas de donantes separados. La muestra sin estimulación con CpG-A y cultivada en presencia de células dendríticas plasmacitoides (pDC) se marca como Control AA1; la muestra con estimulación con CpG-A y cultivada en presencia de pDC se marca como Ejemplo A1; las muestras estimulación con CpG-A y Compuesto (II) (0.25  $\mu$ M, 0.5  $\mu$ M, 10 1  $\mu$ M y 2  $\mu$ M) y cultivadas en presencia de pDC se marcan como Ejemplos A2-A5, respectivamente; y la muestra con estimulación con CpG-A y cultivada en ausencia de pDC se marca como Ejemplo A6.

En referencia a las Figuras 1-2, un asterisco \* se refiere a  $p < 0.05$ ; dos asteriscos \*\* se refieren a  $p < 0.01$ ; y tres asteriscos \*\*\* se refieren a  $p < 0.0001$ , como se determina por ANOVA de una vía seguido de ensayo post-hoc de comparación múltiple de Bonferroni que compara los niveles de MxA y citoqueratina de queratinocitos de muestras con el nivel de MxA y citoqueratina de queratinocitos del Ejemplo A1.

La Figura 1 muestra que el nivel medio de MxA de queratinocitos del Ejemplo A1 es cerca del doble del nivel medio de MxA de queratinocitos del Control AA1. La estimulación del receptor semejante a Toll 9 (TLR-9) (estimulación con CpG-A) mediante el oligonucleótido CpG-A se usó para estimular la liberación de interferón-alfa (IFN- $\alpha$ ) de las pDC. La muestra con estimulación con CpG-A (Ejemplo A1) indujo un incremento de cerca de 2 veces en el nivel de MxA de queratinocitos comparado con el experimento control (Control AA1).

Los niveles de MxA de queratinocitos permanecieron inalterados cuando los queratinocitos epidérmicos humanos adultos cultivados en ausencia de pDC, se estimularon con oligonucleótido CpG-A (Ejemplo A6). El Compuesto (II) indujo una disminución en los niveles de la proteína MxA de queratinocitos del 19 % a 0.25  $\mu$ M y 39 % a 0.5  $\mu$ M de Compuesto (II). El Compuesto (II) disminuyó los niveles de MxA de queratinocitos un 29 % a 1  $\mu$ M y 40 % a 2  $\mu$ M de Compuesto (II).

La Figura 2 muestra el nivel de citoqueratina de las muestras respecto al del Ejemplo A1. El Compuesto (II) no tuvo efecto en los niveles de citoqueratina en los queratinocitos. Estos resultados (Figuras 1-2) muestran que el inhibidor de la fosfodiesterasa-4 (PDE4), el Compuesto (II), puede inhibir selectivamente los niveles de MxA de queratinocitos y, por lo tanto, tiene el potencial de modular la patofisiología inducida por IFN- $\alpha$ .

30 Ejemplo 15: comparación entre el inhibidor de JNK, inhibidores de PDE4 y cloroquina antipalúdica en la inhibición de la producción de IFN- $\alpha$  y TNF- $\alpha$

#### A) Materiales.

El Compuesto (I) y el Compuesto (II) se obtuvieron según los procedimientos de preparación descritos en la presente memoria. La cloroquina antipalúdica (No. de cat. C6628-25G) se obtuvo de Sigma Chemical Co. El inhibidor de JNK CC-930 se obtuvo según procedimientos conocidos.

#### B) Métodos.

Los niveles de IFN- $\alpha$  y TNF- $\alpha$  se midieron por el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA) obtenido de R&D System, Minneapolis, MN, conocido como kit de ELISA para IFN-alfa humano (PBL Interferon Source, No. de cat. 41100-1) y kit de ELISA Quantikine para TNF-alfa humano (ThermoScientific, No. de cat. EH3TNFA5), respectivamente.

Las PBMC humanas ( $1 \times 10^5$  células) o pDC ( $1.5 \times 10^5$  células) se sembraron en placas en placas de 96 pocillos en medio RPMI que contenía bien 10% de FBS (PBMC) o 5% de FBS (pDC). Los compuestos se diluyeron con DMSO (PBMC) o medio (pDC) a partir de una preparación madre 4mM de cada compuesto para obtener diferentes concentraciones. Las PBMC o pDC humanas se pretrataron con diferentes concentraciones de compuestos durante una hora antes de la estimulación. Las células se estimularon entonces con CpG-A ODN 2216 1 ( $\mu$ M (PBMC) o 10 ( $\mu$ M (PDC) durante 18 horas.

Las muestras con el Compuesto (II) (0.25  $\mu$ M, 0.5  $\mu$ M y 1  $\mu$ M) se marcan como Ejemplos B1-B3; las muestras con el Compuesto (I) (0.25  $\mu$ M, 0.5  $\mu$ M y 1  $\mu$ M) se marcan como Ejemplos B4-B6; las muestras con CC-930 (1.0  $\mu$ M, 2.0  $\mu$ M y 3.0  $\mu$ M) se marcan como Ejemplos B7-B9; y las muestras con cloroquina (0.5  $\mu$ M, 1.0  $\mu$ M y 2.0  $\mu$ M) se marcan como Ejemplos B10-B12. Los queratinocitos de las muestras (Ejemplos B1-B12) cultivados en presencia de pDC se estimularon con el oligonucleótido CpG-A.

Se hicieron dos experimentos control. El primer experimento control (Control BB1) se hizo con procedimientos similares mencionados anteriormente, pero sin estimulación con CpG-A y sin la adición de inhibidores. El segundo experimento control (Control BB2) se hizo con procedimientos similares mencionados anteriormente, pero sin la adición de inhibidores.

Se recogió el sobrenadante después de 18 horas. Se ensayaron los niveles de IFN- $\alpha$  y TNF- $\alpha$  por ELISA según las instrucciones del fabricante.

Las Figuras 3-4 muestran los resultados experimentales del ELISA para IFN- $\alpha$  y del ELISA para TNF- $\alpha$  de las muestras.

- 5 En referencia a las Figuras 3-4, un asterisco \* se refiere a  $p < 0.05$ ; dos asteriscos \*\* se refieren a  $p < 0.01$ ; tres asteriscos \*\*\* se refieren a  $p < 0.0001$ , como se determina por ANOVA de una vía seguido de ensayo post-hoc de comparación múltiple de Bonferroni que compara los niveles de IFN- $\alpha$  y TNF- $\alpha$  de las muestras con los niveles de IFN- $\alpha$  y TNF- $\alpha$  del Control BB2.

- 10 Los gráficos mostrados en las Figuras 3-4 se obtuvieron de 4 experimentos independientes de ELISA para IFN- $\alpha$  y 2 experimentos independientes de ELISA para TNF- $\alpha$ . El Compuesto (II) (Ejemplos B1-B3) y el Compuesto (I) (Ejemplos B4-B6) inhibieron la producción de IFN- $\alpha$  ( $P < 0.0001$ ) y TNF- $\alpha$  respecto a la estimulación con CpG-A (Control BB2). CC-930 (Ejemplos B7-B9) indujo una inhibición de aproximadamente el 25 % de la producción de IFN- $\alpha$  y TNF- $\alpha$ , que es más baja que usando el Compuesto (I) y el Compuesto (II), respecto a la estimulación con CpG-A (Control BB2).  
15 La cloroquina (Ejemplos B10-B12) indujo una inhibición de aproximadamente el 75 % de la producción de IFN- $\alpha$  a concentraciones 1.0  $\mu\text{M}$  y 2.0  $\mu\text{M}$  de cloroquina e indujo una inhibición de aproximadamente el 50 % de la producción de TNF- $\alpha$  a 2  $\mu\text{M}$  de cloroquina.

Ejemplo 16: efecto del inhibidor de JNK, inhibidores de PDE4 y cloroquina antipalúdica en MxA y citoqueratina de queratinocitos en el cocultivo pDC-queratinocitos

A) Materiales.

- 20 El Compuesto (I) y el Compuesto (II) se obtuvieron según los procedimientos de preparación descritos en la presente memoria. La cloroquina antipalúdica se obtuvo de Sigma Chemical Co. (No. de cat. C6628-25G). El inhibidor de JNK CC-930 se obtuvo según procedimientos conocidos.

B) Métodos.

- 25 El cocultivo de pDC/HEKa humanos implica la estimulación con el oligodesoxinucleótido CpG-A. La estimulación con CpG-A- inducirá a las pDC para secretar interferón-alfa (IFN- $\alpha$ ) que, a su vez, incita la expresión incrementada de la proteína MxA de los queratinocitos. Se sembraron en placas HEKa en placas de 6 pocillos a una densidad de  $1 \times 10^5$  células/pocillo y se incubó toda la noche en un medio de queratinocitos definido. El medio se retiró al día siguiente y después se superpusieron  $1.8 \times 10^5$  células pDC, en medio pDC definido, sobre las células HEKa. El Compuesto (II) se añadió al medio para obtener concentraciones finales de 0.25  $\mu\text{M}$ , 0.5  $\mu\text{M}$  y 1  $\mu\text{M}$ . Una hora después de la adición  
30 del Compuesto (II), se añadió CpG-A a cada una de las concentraciones y se incubó toda la noche. Se usaron aquí las mismas muestras del Ejemplo 15.

Las células se fijaron y los cocultivos se inmunotifieron con anticuerpos frente a la proteína A de resistencia a mixovirus de queratinocitos (MxA) y citoqueratina como sigue usando el ThermoScientific Cellomics Cribado de Alto Contenido (HCS) Readers usando software vHCS Scan.

- 35 Dieciocho horas después de la adición del Compuesto (II), los cocultivos se fijaron durante 30 minutos con tampón BD de fijación/permeabilización, se lavaron y se bloquearon con disolución de albúmina de suero de cabra normal/de suero bovino al 2 % durante una hora. Los cocultivos se incubaron entonces toda la noche con anticuerpos primarios frente a MxA y citoqueratina. Las células se lavaron e incubaron durante una hora con anticuerpos secundarios anti-cabra Alexa y anti-conejo fluoresceína (IgG1) o conjugados con TRITC (IgG). Los núcleos se tificaron con DAPI o 4',6-diamidino-2-fenilindol. Los cocultivos se lavaron y se incubaron en 1X disolución salina tamponada con fosfato (PBS) y las placas se escanearon usando Thermo Scientific ArrayScan VTI HCS Reader, un instrumento modular de Cribado  
40 de Alto Contenido diseñado para imaginería de fluorescencia y análisis cuantitativo automatizado de alta capacidad de células fijadas y vivas. El resultado se analizó usando el algoritmo de Cellomics Compartmental Analysis para cuantificar los niveles de fluorescencia en los canales verde y rojo. Los datos se exportaron a hojas de trabajo de Microsoft Excel. Los niveles de intensidad de la fluorescencia media de MxA y citoqueratina de las muestras se expresaron como porcentaje de los niveles de intensidad de la fluorescencia media de MxA y citoqueratina del Control  
45 BB2.

Los niveles de MxA y citoqueratina de queratinocitos de las muestras mostrados en las Figuras 5-6 se obtuvieron de 4 experimentos independientes.

- 50 En referencia a las Figuras 5-6, un asterisco \* se refiere a  $p < 0.05$ ; dos asteriscos \*\* se refieren a  $p < 0.01$ ; y tres asteriscos \*\*\* se refieren a  $p < 0.0001$ , como se determina por ANOVA de una vía seguido de ensayo post-hoc de comparación múltiple de Bonferroni que compara los niveles de MxA y citoqueratina de queratinocitos de las muestras con el nivel de MxA y citoqueratina de queratinocitos del Control BB2..

- 55 La estimulación con CpG-A (Control BB2) indujo un incremento de cerca de 4 veces en los niveles de MxA de queratinocitos respecto al DMSO (Control BB1). Entre los compuestos ensayados, el Compuesto (I) (Ejemplos B4-B6)

tiene la mayor capacidad para inhibir la producción de la MxA de queratinocitos. CC-930 (Ejemplos B7-B9) mostró una disminución del 32 % en el nivel de MxA de queratinocitos a 1  $\mu\text{M}$  de CC-930 (que fue estadísticamente significativo por ANOVA de una vía ( $P < 0.05$ )), mientras el Compuesto (II) mostró una disminución del 13-15 % en el nivel de MxA de queratinocitos.

5 Aunque se mostró un resultado de disminución de los niveles de MxA de queratinocitos por el Compuesto (II) a 0.5  $\mu\text{M}$  en el Ejemplo 14, es posible que la variabilidad de pDC entre donantes pueda ser atribuible a la ausencia de efecto significativo del Compuesto (II). Como el Compuesto (I) y el Compuesto (II) inhibieron eficientemente la producción de IFN- $\alpha$  y TNF- $\alpha$ , es probable que los genes inducibles por IFN- $\alpha$  esté modulados por la inhibición de PDE4. En el Ejemplo 14 también se midió la intensidad de fluorescencia media de la citoqueratina como un marcador de los queratinocitos.

El Compuesto (II), el Compuesto (I) y CC-930 no tuvieron un efecto significativo en la citoqueratina de queratinocitos, lo que indica que los compuestos no suprimieron indiscriminadamente la producción de proteínas de queratinocitos.

Ejemplo 17: examen de la firma de IFN tipo 1 en PBMC

Producción de IFN- $\alpha$  en PBMC humanas estimuladas con CpG-A

15 Se usaron siete donantes en los experimentos de expresión génica. Estos donantes se examinaron para determinar los niveles de proteína IFN- $\alpha$  (pg/mL) de las células mononucleares de sangre periférica (hPBMC) estimuladas con CpG-A por el ELISA para IFN- $\alpha$ .

A) Materiales.

20 Las unidades de leucocitos humanos (capa leucoplaquetaria) se obtuvieron de donantes de sangre sanos (Blood Center of New Jersey, East Orange, NJ, EE.UU.). La disolución salina tamponada de Hank (HBSS) se obtuvo de VWR Scientific (Radnor, PA). El Ficoll-Paque Plus se obtuvo de Amersham Bioscience (No. de cat. # 17-1440-02). Las células se crecieron en medio completo que consistía en Roswell Park Memorial Institute (RPMI-1640), 5 % de suero humano, 100  $\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$  de penicilina, 100  $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  de estreptomycin, L-glutamina 2 mM (componentes de VWR Scientific). El oligonucleótido CpG-A ODN 2216 (agonista de TLR9) se obtuvo de InvivoGen. El mini kit RNeasy para la preparación de ARN se obtuvo de Qiagen (No. de cat. 74104). La enzima transcriptasa inversa Taqman se obtuvo de Applied Biosystems (No. de cat. N808-0234). Los ensayos de expresión génica prefabricados TaqMan® para MX1, IRF-7, OAS1, OASL, CXCL9 (MIG), CXCL10 (IP-10), CXCL11, STAT1, IFIT1, MCP1, PLSCR1, XIAPAF1, IFI44, MX2, OAS2 y LY6E se adquirieron en Applied Biosystems.

B) Métodos.

30 Purificación de PBMC.

35 Se dividieron leucocitos humanos (50 mL) en dos partes alícuotas de 25 mL y se añadieron a dos tubos cónicos de 50 mL que contenían 25 mL de HBSS estéril. Los tubos se mezclaron suavemente mediante inversión varias veces. Se dividió en partes alícuotas el Ficoll-Paque Plus (15 mL) a temperatura ambiente en cuatro tubos cónicos de 50 mL. Después, la mezcla de capa leucoplaquetaria/HBSS (25 mL) se puso en capas suavemente y lentamente en la parte superior del Ficoll-Paque Plus. Las muestras se centrifugaron con Centrífuga Eppendorf 5810R (Rotor A-4-81) a 450 rpm durante 35 minutos. La capa superior que contenía el plasma se desechó. La interfase que contenía células mononucleares se transfirió a dos tubos cónicos de 50 mL. Ambos tubos cónicos se llenaron hasta un volumen total de 50 mL con HBSS y se centrifugaron a 1200 rpm durante 10 minutos. Las células se lavaron de nuevo en HBSS y se centrifugaron a 1000 rpm durante 10 minutos. Se añadió tampón de lisis de células sanguíneas rojas humanas (5 mL) a los sedimentos celulares y se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente. Se añadió disolución salina tamponada con fosfato (45 mL) a los tubos cónicos y se centrifugó a 1200 rpm durante 10 minutos. Los sedimentos celulares se combinaron y se resuspendieron en 20 mL de medio completo y las células se contaron.

45 Las PBMC humanas ( $1 \times 10^5$  células) se sembraron en placas de 96 pocillos en medio RPMI que contenía 10% de FBS. Algunas células se estimularon entonces con CpG-A ODN 2216 (1  $\mu\text{M}$ ) durante 18 horas. Algunas células no se estimularon con CpG-A ODN 2216. Se recogió el sobrenadante después de 18 horas. Los niveles de IFN- $\alpha$  y TNF- $\alpha$  se ensayaron por el kit ELISA para IFN-alfa y el kit ELISA Quantikine para TNF-alfa según las instrucciones del fabricante.

50 Las muestras de los Donantes 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7 con estimulación con CpG-A se marcan como Ejemplos D2, D4, D6, D8, D10, D12 y D14, respectivamente; mientras las muestras de los Donantes 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7 sin estimulación con CpG-A se marcan como Ejemplos D1, D3, D5, D7, D9, D11 y D13, respectivamente.

55 La Figura 7 muestra que hay un incremento de 10 a 1000 veces en los niveles de IFN- $\alpha$  en las PBMC de 7 donantes después de la estimulación con CpG-A (es decir, los Ejemplos D2, D4, D6, D8, D10, D12 y D14) comparado con las muestras sin estimulación con CpG-A (es decir, los Ejemplos D1, D3, D5, D7, D9, D11 y D13). Se usa una escala diferente del eje de las y del gráfico mostrado en la Figura 7 para representar las muestras con y sin estimulación con CpG-A con el fin de demostrar la diferencia en la concentración de IFN- $\alpha$ .

Ejemplo 18: examen de la firma de IFN tipo 1 en PBMC

Efecto de compuestos en la inhibición de la producción de IFN- $\alpha$  en hPBMC estimuladas con CpG-A

A) Materiales.

5 El Compuesto (I) y el Compuesto (II) se obtuvieron según los procedimientos de preparación descritos en la presente memoria. La cloroquina antipalúdica (No. de cat. C6628-25G), la cloroquina (No. de cat. C6628-25G) y la hidroxiclороquina (No. de cat. H0915) se obtuvieron de Sigma Chemical Co., St. Louis, MO. La quinacrina (No. de cat. Q8133) se obtuvo de LKT laboratories. El inhibidor de JNK CC-930 se obtuvo según procedimientos conocidos.

B) Métodos.

Purificación de PBMC.

10 Se dividieron leucocitos humanos (50 mL) en dos partes alícuotas de 25 mL y se añadieron a dos tubos cónicos de 50 mL que contenían 25 mL de HBSS estéril. Los tubos se mezclaron suavemente mediante inversión varias veces. Se dividió en partes alícuotas el Ficoll-Paque Plus (15 mL) a temperatura ambiente en cuatro tubos cónicos de 50 mL. Después, la mezcla de capa leucoplaquetaria/HBSS (25 mL) se puso en capas suavemente y lentamente en la parte superior del Ficoll-Paque Plus. Las muestras se centrifugaron con Centrífuga Eppendorf 5810R (Rotor A-4-81) a 450 rpm durante 35 minutos. La capa superior que contenía el plasma se desechó. La interfase que contenía células mononucleares se transfirió a dos tubos cónicos de 50 mL. Ambos tubos cónicos se llenaron hasta un volumen total de 50 mL con HBSS y se centrifugaron a 1200 rpm durante 10 minutos. Las células se lavaron de nuevo en HBSS y se centrifugaron a 1000 rpm durante 10 minutos. Se añadió tampón de lisis de células sanguíneas rojas humanas (5 mL) a los sedimentos celulares y se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente. Se añadió disolución salina tamponada con fosfato (45 mL) a los tubos cónicos y se centrifugó a 1200 rpm durante 10 minutos. Los sedimentos celulares se combinaron y se resuspendieron en 20 mL de medio completo y las células se contaron.

25 Las PBMC humanas ( $1 \times 10^5$  células) se sembraron en placas en placas de 96 pocillos (PBMC) en medio RPMI que contenía 10% de FBS. Los compuestos se diluyeron con DMSO a partir de una preparación madre 4mM de cada compuesto para obtener diferentes concentraciones. Las PBMC humanas se pretrataron con diferentes concentraciones de compuestos durante una hora antes de la estimulación. Las células se estimularon entonces con CpG-A ODN 2216 ( $1 \mu\text{M}$ ) durante 18 horas.

30 La muestra con DMSO se marca como Control E1; las muestras con CC-930 (0.1, 0.5 y  $10 \mu\text{M}$ ) se marcan como Ejemplos E2-E4, respectivamente; las muestras con Compuesto (II) (0.1, 0.5 y  $5 \mu\text{M}$ ) se marcan como Ejemplos E5-E7, respectivamente; las muestras con Compuesto (I) (0.5 y  $5 \mu\text{M}$ ) se marcan como Ejemplos E8-E9, respectivamente; la muestra con lenalidomida ( $10 \mu\text{M}$ ) se marca como Ejemplo E10; la muestra con talidomida ( $10 \mu\text{M}$ ) se marca como Ejemplo E11; las muestras con cloroquina (0.5, 1,5 y  $10 \mu\text{M}$ ) se marcan como Ejemplos E12-E15, respectivamente; las muestras con hidroxiclороquina (0.5, 1 y  $5 \mu\text{M}$ ) se marcan como Ejemplos E16-E18, respectivamente; y las muestras con quinacrina (0.5 y  $5 \mu\text{M}$ ) se marcan como Ejemplos E19-E20, respectivamente. Las muestras (Control E1 y Ejemplos E2-E20) contenían CpG-A  $1 \mu\text{M}$ .

35 Se recogió el sobrenadante después de 18 horas. Los niveles de IFN- $\alpha$  de las muestras se midieron por el ELISA para IFN- $\alpha$  obtenido de PBL Interferon Source, Piscataway, NJ, conocido como kit ELISA para IFN-alfa humano. Los niveles de IFN- $\alpha$  de las muestras se ensayaron con el ELISA según las instrucciones del fabricante.

40 La inhibición de la producción de IFN- $\alpha$  por compuestos individuales se determinó en los cultivos de hPBMC estimulados con CpG-A. Las concentraciones de los compuestos, incluyendo CC-930, Compuesto (II), Compuesto (I), lenalidomida, talidomida, cloroquina, hidroxiclороquina y quinacrina, ensayadas en estos experimentos se tomaron de aproximadamente sus concentraciones  $C_{\text{máx}}$ .

En referencia a la Figura 8, un asterisco \* se refiere a  $p < 0.05$ ; dos asteriscos \*\* se refieren a  $p < 0.01$ ; y tres asteriscos \*\*\* se refieren a  $p < 0.0001$ , como se determina por ANOVA de una vía seguido de post-ensayo de comparación múltiple de Dunnett que compara los niveles de IFN- $\alpha$  de las muestras con el nivel de IFN- $\alpha$  del Control E1.

45 La Figura 8 muestra que el Compuesto (II) y el Compuesto (I) a su concentración  $C_{\text{máx}}$  de  $0.5 \mu\text{M}$  y  $5 \mu\text{M}$  indujeron una inhibición significativa de la producción de IFN- $\alpha$ . CC-930 inhibió la producción de IFN- $\alpha$  solo cuando la concentración de CC-930 fue  $10 \mu\text{M}$ . La lenalidomida y la talidomida ( $10 \mu\text{M}$ ) no afectaron la producción de IFN- $\alpha$ . La quinacrina inhibió la producción de IFN- $\alpha$ . La cloroquina y la hidroxiclороquina indujeron la inhibición de la producción de IFN- $\alpha$  solo cuando las concentraciones de cloroquina e hidroxiclороquina fueron  $5 \mu\text{M}$ .

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Un compuesto para uso en un método para tratar alopecia areata en un ser humano, en donde el método comprende administrar a un paciente que tiene la enfermedad una cantidad terapéuticamente efectiva del compuesto, en donde el compuesto es (+)-2-[1-(3-etoxi-4-metoxifenil)-2-metilsulfoniletil]-4-acetilaminoisindolina-1,3-diona, o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, que carece sustancialmente de su enantiómero (-).
- 10 2. Una composición farmacéutica para uso en un método para tratar alopecia areata en un ser humano, en donde el método comprende administrar a un paciente que tiene la enfermedad una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de (+)-2-[1-(3-etoxi-4-metoxifenil)-2-metilsulfoniletil]-4-acetilaminoisindolina-1,3-diona, o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, que carece sustancialmente de su enantiómero (-).
3. La composición farmacéutica para uso según la reivindicación 2, en donde la composición farmacéutica comprende además una cantidad terapéuticamente efectiva de un segundo agente activo.
- 15 4. La composición farmacéutica para uso según la reivindicación 2 o 3, en donde la composición farmacéutica comprende además uno o más excipientes, diluyentes o vehículos.
5. El compuesto o composición farmacéutica para uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde el compuesto se administra como una sal farmacéuticamente aceptable, como un solvato farmacéuticamente aceptable o como el compuesto libre.
- 20 6. El compuesto o composición farmacéutica para uso según la reivindicación 5, en donde el solvato es un hidrato.
7. El compuesto o composición farmacéutica para uso de cualquiera según las reivindicaciones 1-6, en donde el método comprende además administrar al paciente un segundo agente activo.
8. El compuesto o composición farmacéutica para uso según la reivindicación 7, en donde el segundo agente activo es un antiinflamatorio, un compuesto inmunomodulador, un antipalúdico, un inmunosupresor, un antibiótico, un antiviral, una inmunoglobulina, un fármaco que potencia la inmunidad, una hormona, PGE2 o una combinación de los mismos.
- 25 9. El compuesto o composición farmacéutica para uso de cualquiera según las reivindicaciones 1-8, en donde la composición farmacéutica o el compuesto o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo se administra oralmente, parenteralmente, o tópicamente.
- 30 10. El compuesto o composición farmacéutica para uso según la reivindicación 9, en donde la composición farmacéutica o el compuesto o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo se administra tópicamente en una forma de dosificación de pomada, crema, gel, pasta, polvo para uso externo, loción, pulverización, linimento, emplasto, aerosol, disolución, emulsión o suspensión.
11. El compuesto o composición farmacéutica para uso de cualquiera según las reivindicaciones 1-8, en donde la composición farmacéutica o el compuesto o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo se administra oralmente en una forma de dosificación de un comprimido o una cápsula.
- 35 12. El compuesto o composición farmacéutica para uso según la reivindicación 11, en donde la composición farmacéutica o el compuesto o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo se administra oralmente en 5 mg, 10 mg, 15 mg, 20 mg o 25 mg de un comprimido o una cápsula.
- 40 13. El compuesto o composición farmacéutica para uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en donde la cantidad terapéuticamente efectiva es de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 1000 mg al día, de aproximadamente 5 mg a aproximadamente 500 mg al día, de aproximadamente 10 mg a aproximadamente 200 mg al día, 10 mg dos veces al día, 20 mg dos veces al día, 30 mg dos veces al día, o 40 mg una vez al día.
14. El compuesto o composición farmacéutica para uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en donde la composición farmacéutica o el compuesto o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo se administra una vez o dos veces al día.
- 45 15. El compuesto o composición farmacéutica para uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en donde la composición farmacéutica o el compuesto o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo se administra cíclicamente.

Figura 1

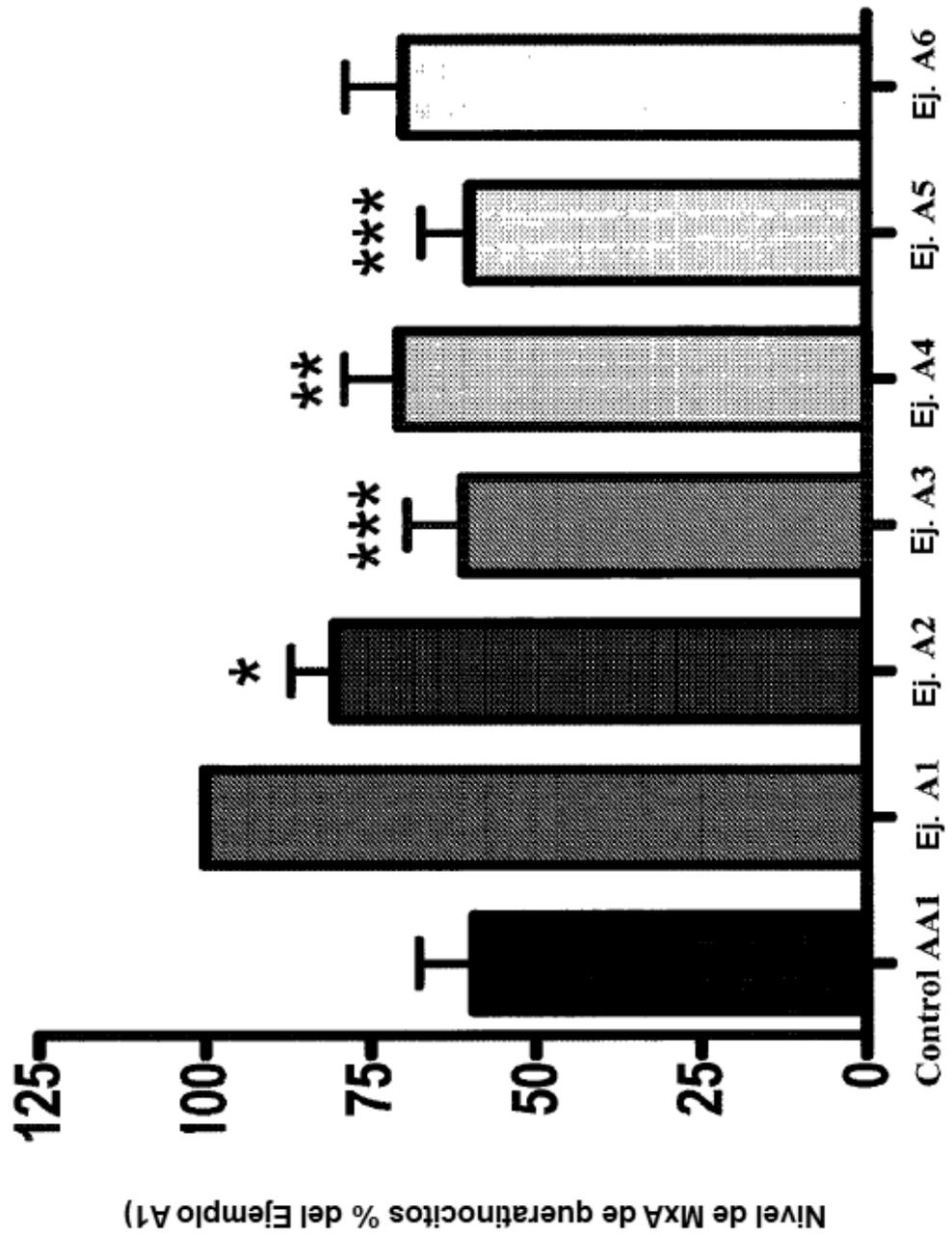


Figura 2

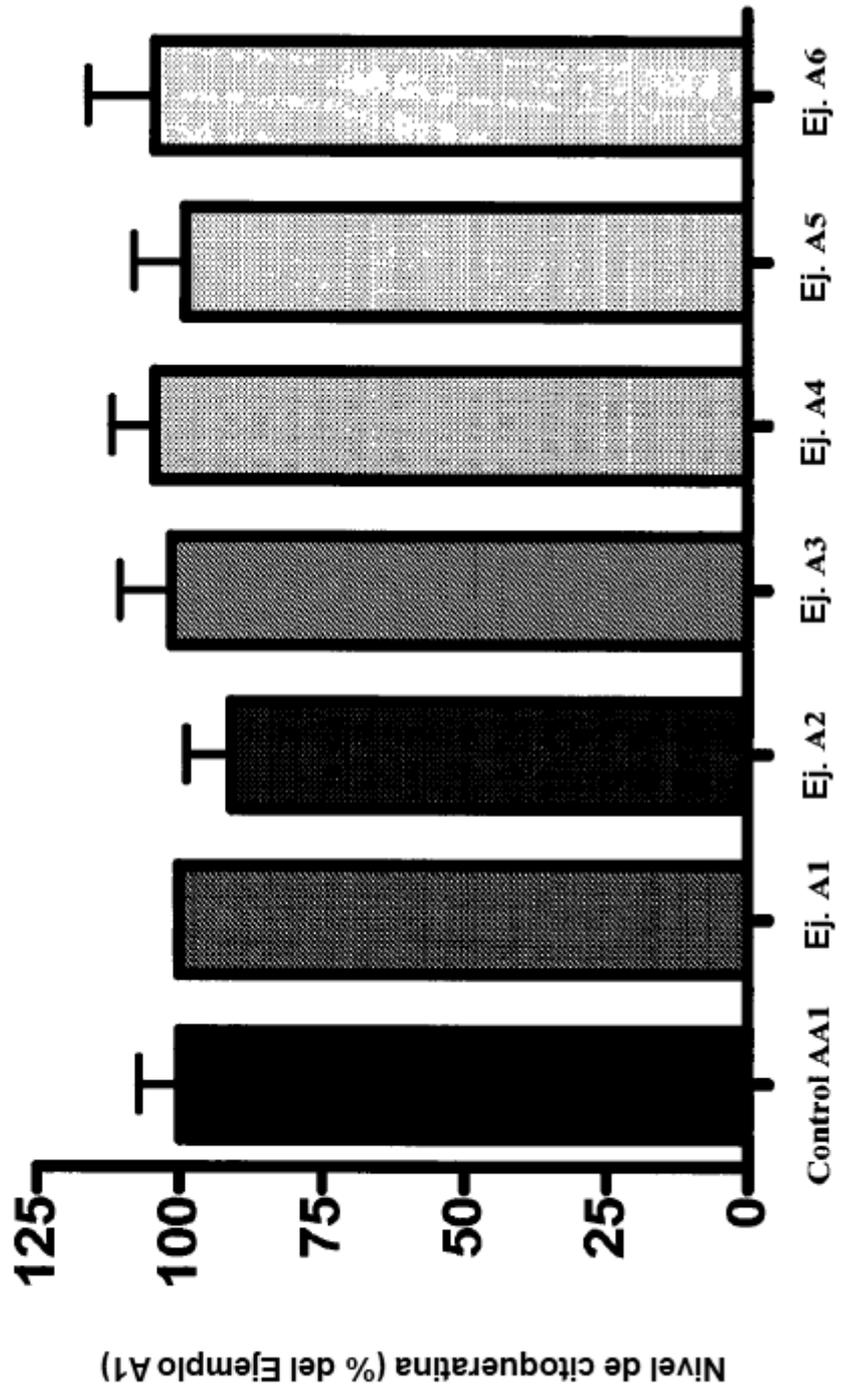


Figura 3

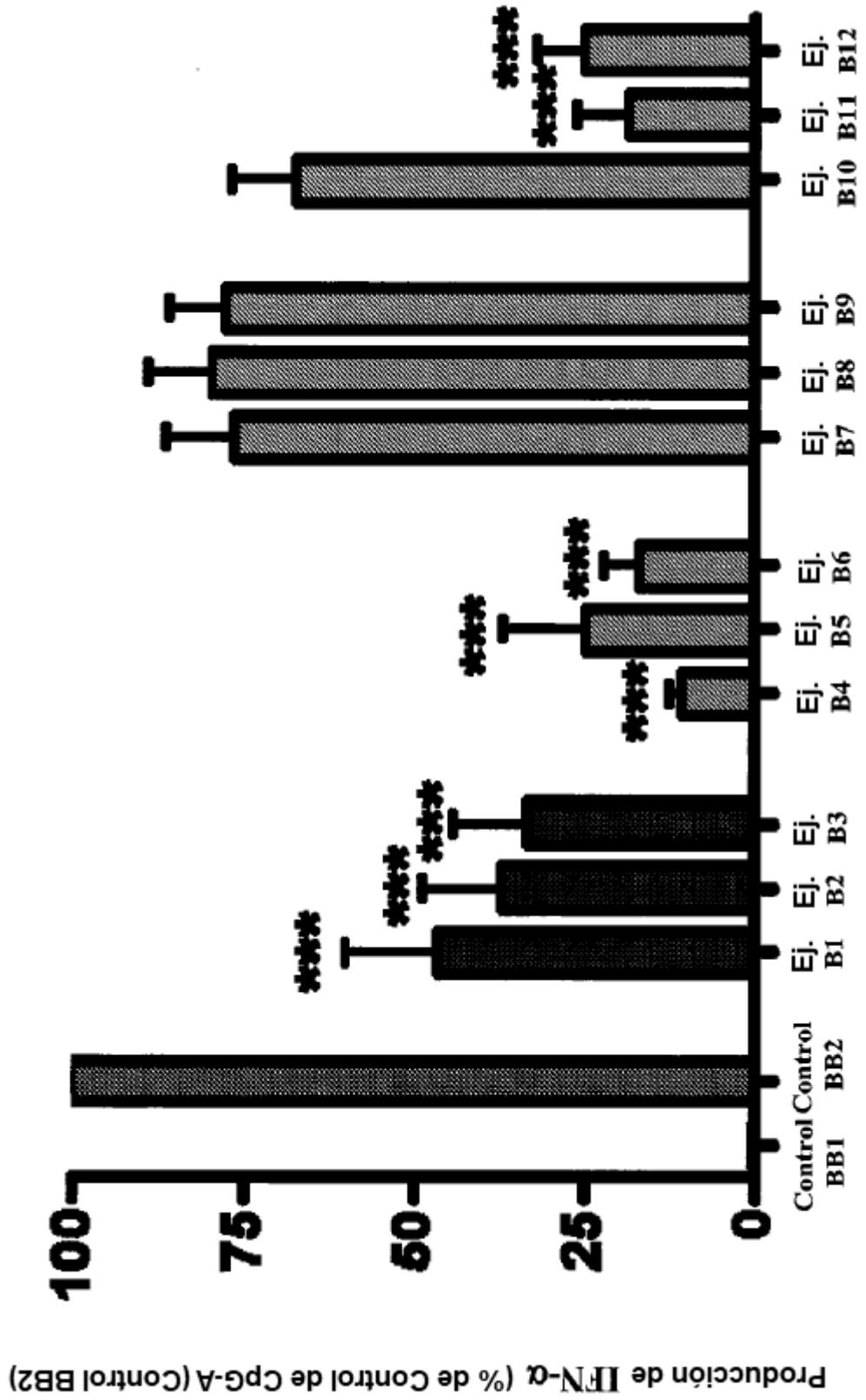


Figura 4

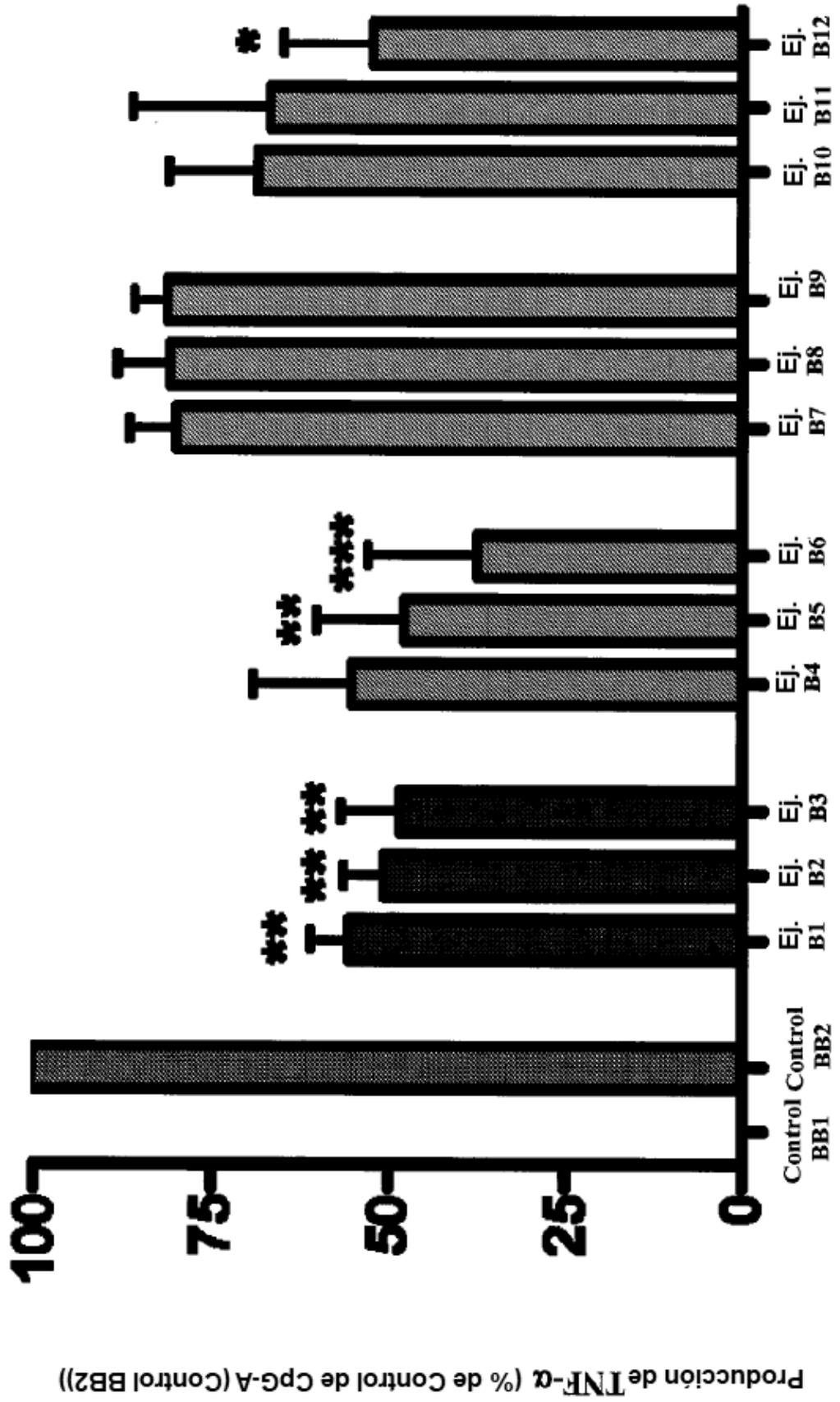


Figura 5

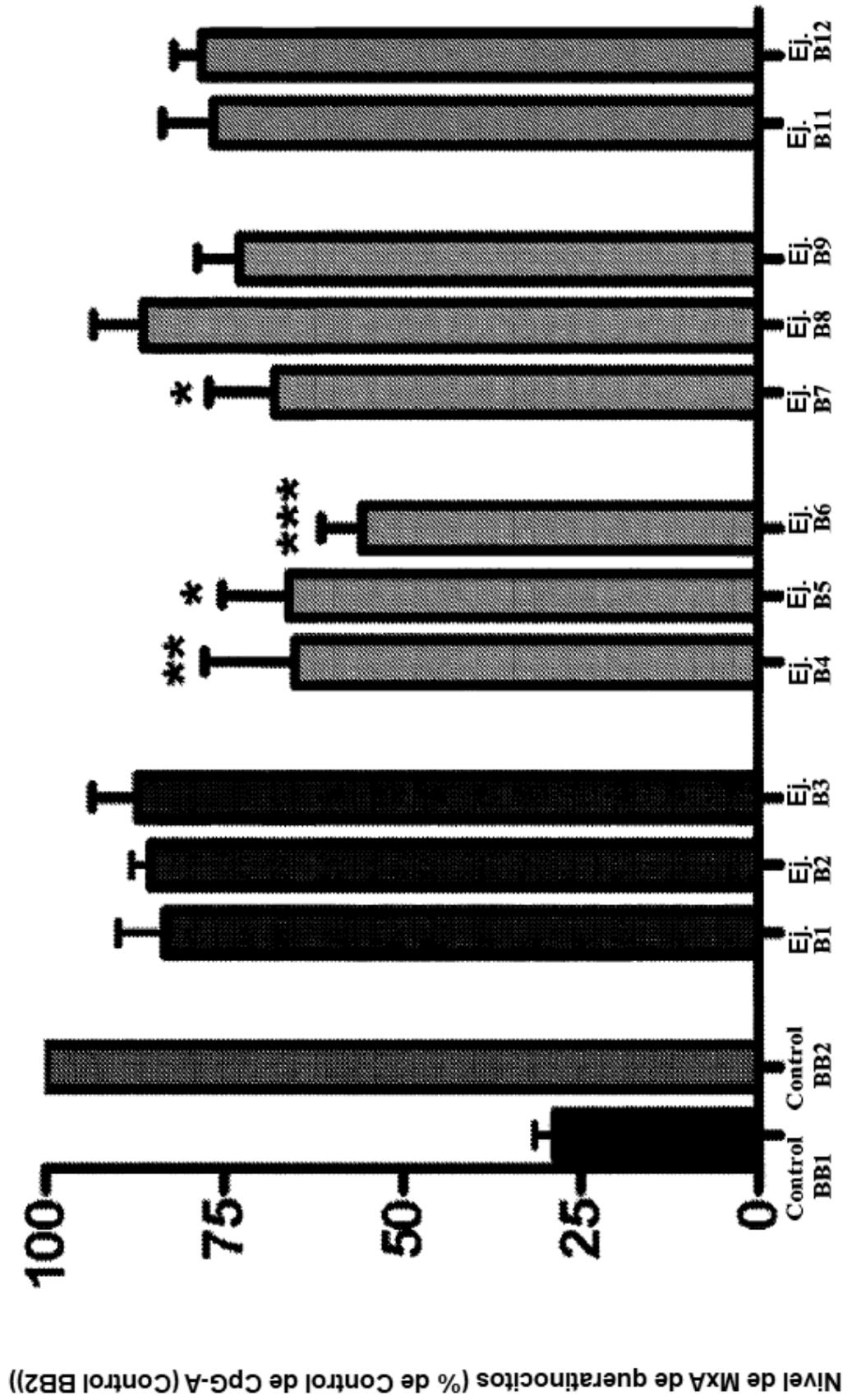


Figura 6

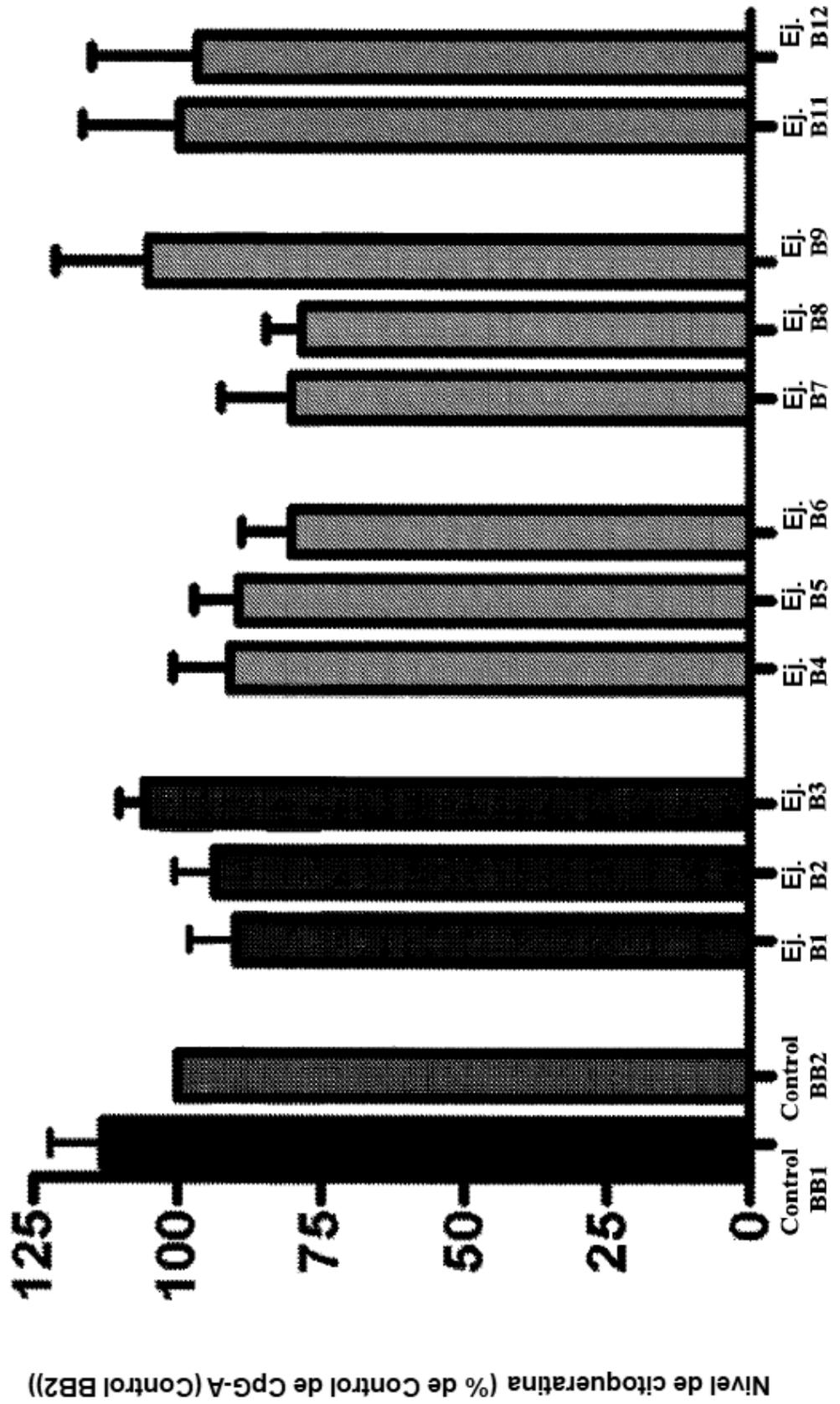


Figura 7

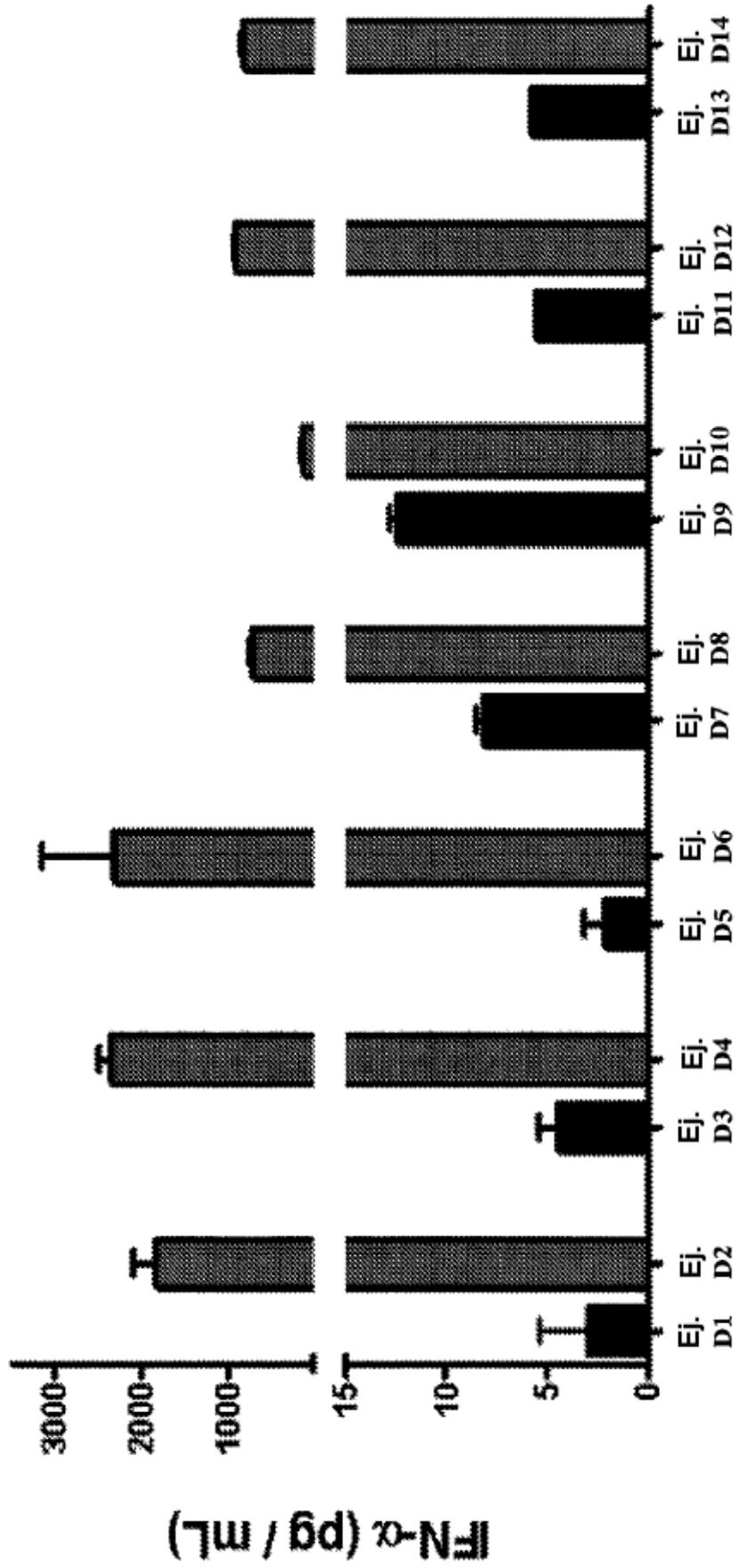


Figura 8

