



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 331 451**

② Número de solicitud: 200801964

⑤ Int. Cl.:  
**C07D 311/60** (2006.01)  
**A61K 31/353** (2006.01)

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

② Fecha de presentación: **30.06.2008**

④ Fecha de publicación de la solicitud: **04.01.2010**

④ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:  
**04.01.2010**

⑦ Solicitante/s: **Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)**  
**c/ Serrano, 117**  
**28006 Madrid, ES**

⑦ Inventor/es: **Alarcón Sánchez, Balbino;**  
**Ramírez Ortíz, Ángel;**  
**Borroto Revuelta, Aldo y**  
**Morreale de León, Antonio**

⑦ Agente: **Pons Ariño, Ángel**

⑤ Título: **Inmunosupresor basado en la interrupción de la interacción TCR-Nck.**

⑤ Resumen:

Inmunosupresor basado en la interrupción de la interacción TCR-Nck.

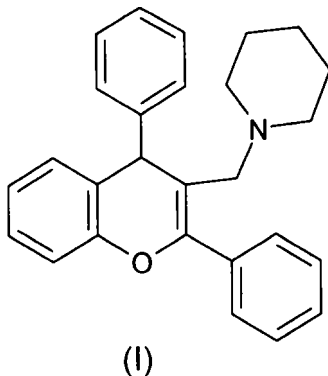
La presente invención se refiere a un compuesto de fórmula estructural (I) y sus derivados, para su uso como medicamento. Preferiblemente como agente inmunosupresor basado en la interrupción de la interacción TCR-Nck.

ES 2 331 451 A1

## DESCRIPCIÓN

Immunosupresor basado en la interrupción de la interacción TCR-Nck.

La presente invención se refiere a un compuesto de fórmula estructural (I)



y sus derivados, para su uso como medicamento. Preferiblemente como agente inmunosupresor basado en la interrupción de la interacción TCR-Nck.

### Estado de la técnica anterior

Los linfocitos T desempeñan un papel central en el rechazo de alotransplantes y, de forma más o menos directa, en la generación de enfermedades autoinmunes. Por ello los fármacos inmunosupresores actuales basan su mecanismo de acción en la inhibición de la activación de los linfocitos T. Estos inmunosupresores presentan alta toxicidad, debido a que no inhiben vías linfocitarias de modo específico.

Los linfocitos T son activados a través del receptor para antígeno (TCR) que reconoce al complejo principal de histocompatibilidad (MHC) del órgano transplantado como extraño. El TCR está formado por 6 subunidades, dos de las cuales ( $TCR\alpha$  y  $TCR\beta$ ) son responsables del reconocimiento de MHC unido a péptidos antigénicos, mientras que las otras cuatro ( $CD3\gamma$ ,  $CD3\delta$ ,  $CD3\epsilon$  y  $CD3\zeta$ ) son responsables de la transmisión de señales al citoplasma del linfocito (revisado en Alarcon, B., Gil, D., Delgado, P. and Schamel, W.W. (2003) *Immunol Rev*, **191**, 38-46). Uno de los procesos iniciales que ocurren tras la ligación del TCR por parte del MHC es la activación de las tirosina quinasas de la familia src, Lck y Fyn, que fosforilan las tirosinas de los motivos ITAM de las subunidades de CD3, que a su vez se convierten en sitios de anclaje de las tirosina quinasas de la familia Syk (ZAP70 y Syk). Hasta hace poco se pensaba que éste era el esquema lineal de transmisión de señales, y que a partir de las quinasas de la familia Syk (ZAP70 sobre todo) se producía la divergencia en la cascada de activación que resulta en la activación de diversos factores de transcripción, incluido NFAT, blanco de los fármacos inmunosupresores ciclosporina A y FK506 (Lin, J. and Weiss, A. (2001) *J Cell Sci*, **114**, 243-244). Por su parte, los autores de la presente invención descubrieron hace algunos años que, para activarse, el TCR sufre un cambio conformacional que resulta en el reclutamiento del adaptador Nck directamente a una secuencia rica en prolina (PRS) de la subunidad  $CD3\epsilon$  (Gil, D., Schamel, W.W., Montoya, M., Sanchez-Madrid, F. and Alarcon, B. (2002) *Cell*, **109**, 901-912). Esta interacción TCR-Nck se determinó como esencial para la activación de TCR mediante experimentos de sobre-expresión del dominio SH3.1 amino-terminal de Nck (el que se une a  $CD3\epsilon$ ) y mediante la introducción en los linfocitos T de el anticuerpo APA1/1, que se une a PRS y lo bloquea.

### Explicación de la invención

Un problema importante con los inmunosupresores actuales es su toxicidad, debido a que no inhiben vías linfocitarias de modo específico.

La presente invención proporciona un compuesto inmunosupresor más específico de linfocitos T y con menos efectos secundarios que los actualmente existentes, basado en la interrupción de la interacción TCR-Nck.

Para seleccionar el compuesto de la presente invención, se ha tenido en cuenta tanto el cambio conformacional del TCR, como el mecanismo de inicio de la transmisión de señales, paso fundamental para el reclutamiento de proteínas efectoras.

El cambio conformacional en el TCR, que ocurre tras la unión de anticuerpos estimuladores y de MHC, se puso primeramente de manifiesto mediante un ensayo de "pull-down", donde el TCR se une de forma inducible a una matriz de la proteína de fusión GST-Nck. Este ensayo bioquímico no permite identificar de forma individual aquellas células cuyo TCR está sufriendo el cambio conformacional. Sin embargo, los autores de la presente invención demostraron que el anticuerpo APA1/1 también reconoce el cambio conformacional (Risueno, R.M., Gil, D., Fernandez, E., Sanchez-Madrid, F. and Alarcon, B. (2005) *Blood*, **106**, 601-608). El anticuerpo se puede utilizar en preparaciones de linfocitos T en cultivo y también en cortes inmunohistoquímicos. Este reactivo permite demostrar por otro procedimiento distinto

al “pull-down” la existencia del cambio conformacional, además de demostrar que el cambio conformacional ocurre *in vivo*. Es más, el anticuerpo reconoce las sinapsis inmunitarias formadas entre linfocitos T y células presentadoras de antígeno cargadas con un péptido agonista, pero no las sinapsis formadas por un agonista parcial/antagonista. Estos datos sugieren que el cambio conformacional en el TCR podría estar detrás de la distinción entre agonistas fuertes y débiles por parte de los linfocitos T y podría activar cascadas de activación específicas durante el reconocimiento de ligandos fuertes. Esta hipótesis parece corroborada por el hecho de que durante el desarrollo tímico el cambio conformacional (visualizado mediante tinción con APA1/1) ocurre durante el reconocimiento de ligandos que inducen selección negativa, pero no durante el reconocimiento de ligandos que inducen selección positiva (Risueno, R.M., van Santen, H.M. and Alarcon, B. (2006) *Proc Natl Acad Sci U S A.*, **103**, 9625-9630). Por otra parte, la única consecuencia conocida del cambio conformacional en el TCR es la exposición de la PRS en CD3 $\epsilon$ , aunque no se descarta que el cambio conformacional se transmita también a las regiones citoplasmáticas de las otras subunidades CD3 e influya globalmente en todo el proceso de iniciación de la transmisión de señales por el TCR, incluyendo la fosforilación en las tirosinas de los ITAMs (Minguet, S., Swamy, M., Alarcon, B., Luescher, I.F. and Schamel, W.W. (2007) *Immunity.*, **26**, 43-54). Sin embargo, el reclutamiento de Nck a la PRS de CD3 $\epsilon$  constituye un posible mecanismo de la transmisión del cambio conformacional a rutas de activación intracelulares (Gil, D., Schamel, W.W., Montoya, M., Sanchez-Madrid, F. and Alarcon, B. (2002) *Cell*, **109**, 901-912).

Con el fin de demostrar la importancia de la interacción Nck-CD3 $\epsilon$  en la activación de linfocitos T y validar esta interacción como blanco de agentes inmunomoduladores, se ha procedido al diseño de péptidos sintéticos que mimetizaran la secuencia del PRS y que pudieran bloquear el sitio de unión en Nck a CD3 $\epsilon$ . Se ha obtenido así un péptido, denominado 11R085, que es 300 veces más potente que un péptido con la secuencia silvestre en la inhibición de la interacción de CD3 $\epsilon$  con el dominio SH3.1 de Nck. Utilizando este péptido, se consigue inhibir de forma específica la proliferación de linfocitos T humanos tanto CD4+ como CD8+ en respuesta a la estimulación con anticuerpos anti-CD3, con una IC50 de aproximadamente 20  $\mu$ M, mientras que la proliferación de linfocitos T humanos dependiente de un receptor diferente, el IL2R, no es prácticamente afectada por dicho péptido, incluso a concentraciones 3 veces superiores.

Por tanto, el péptido 11R085 inhibe la activación iniciada por el TCR pero no la activación mediada por otro receptor, y por ello, es específico del blanco molecular para el que está diseñado.

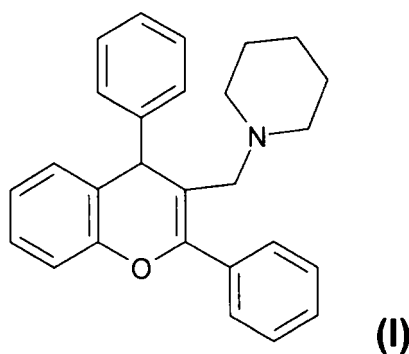
El péptido 11R085 también inhibe la producción de IL2 y la proliferación inducida por antígeno en linfocitos primarios de ratones transgénicos OT-I con una IC50 de aproximadamente 5  $\mu$ M. Queda así validada la interacción Nck-CD3 $\epsilon$  como blanco molecular para el desarrollo de inmunosupresores.

A partir de esto hecho, y utilizando estrategias bioinformáticas de selección se realizó un cribado virtual de compuestos que se unen al dominio SH3.1, tal y como se describe en los ejemplos de la invención. Tras este cribado, se seleccionaron los diez que teóricamente encajaban mejor en un bolsillo hidrofóbico del SH3.1, encargado del reconocimiento de la secuencia PRS de CD3 $\epsilon$  (ver Fig. 1). Todos estos compuestos, estructuralmente muy diferentes, tuvieron un cierto grado de actividad, pero el que presenta un mayor grado de actividad y menos toxicidad, incluso a dosis altas, (Fig.7), es el compuesto denominado CBM-1, compuesto de fórmula estructural (I).

El compuesto CBM-1 presentó buena actividad y capacidad inmunosupresora, CBM-1 inhibe la proliferación de linfocitos T humanos inducida por anticuerpos anti-CD3 pero no la proliferación dependiente de IL2. Asimismo, inhibe la proliferación de linfocitos T de ratón dependiente de antígeno y también inhibe la liberación de IL2. En linfocitos humanos estimulados con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 inhibe la producción de IFN $\gamma$ , de IL-10 y de TNF $\beta$ , así como la generación de células humanas productoras de IFN $\gamma$  en respuesta a anti-CD3 y anti-CD28. Estos datos verifican que este compuesto tiene una acción inhibitoria de la activación de linfocitos T, tanto de ratón como humanos, a concentraciones bajas de a partir de 0.1  $\mu$ M, y preferiblemente en el rango de entre 0,1 y 1  $\mu$ M.

Por tanto, CBM-1 es activo como inmunosupresor.

Por todo ello, un primer aspecto de la presente invención, se refiere a un compuesto de fórmula (I):



o cualquiera de sus derivados, entre los que se incluyen, sus sales, isómeros o mezclas de isómeros, profármacos, formas cristalinas, etc... para su uso como medicamento, preferiblemente como inmunosupresor.

## ES 2 331 451 A1

Entendiéndose por isómeros o mezclas de isómeros en la presente invención:

- 1) isómeros en disposición Z o E definidos por la posición de los sustituyentes respecto a los enlaces múltiples que presentan los compuestos,
- 2) isómeros ópticos o enantiómeros, originados por la presencia de centros quirales (átomos unidos a cuatro sustituyentes diferentes) que provocan la diferenciación entre enantiómeros respecto a su actividad óptica (rotación de la luz polarizada al pasar a través de una solución del enantiómero),
- 3) diastereoisómeros, isómeros con al menos dos centros quirales, estando los sustituyentes de uno de dichos centros dispuestos igual en ambos diastereoisómeros y los sustituyentes de al menos otro de los centros dispuestos de forma distinta entre ambos.

Entendiéndose por “pro-fármacos” de los compuestos de fórmula (I), cualquier derivado (por ejemplo, ésteres, carbamatos, amidas etc.), que, cuando se administra a un individuo, es capaz de proporcionarle, directa o indirectamente, uno o varios de los compuestos de dicha fórmula (I).

También se incorpora en la definición de derivados, “formas cristalinas” de los compuestos de fórmula (I) en estado libre o como solvatos. El término “solvato”, tal como aquí se utiliza, incluye tanto solvatos que puedan ser utilizados en la composición de un medicamento, como solvatos útiles en la preparación de dicho medicamento. Los solvatos pueden obtenerse por métodos convencionales de solvatación bien conocidos en el estado de la técnica.

En la presente invención, se entiende por “sales”, tanto las farmacéuticamente aceptables como las que no sean farmacéuticamente aceptables pero que pueden ser útiles asimismo en la preparación de fármacos, por lo que todas las sales de los compuestos de la invención, sean o no farmacéuticamente aceptables están incluidas en el ámbito de la presente invención.

Por último, se incluye en la definición de “derivados”, aquellos compuestos de la invención que contengan uno o más átomos isotópicamente enriquecidos. Por ejemplo, compuestos con una de las fórmulas de la invención en las que uno o varios átomos de hidrógeno han sido sustituidos por átomos de deuterio o de tritio, uno o varios átomos de carbono han sido sustituidos por átomos de  $^{13}\text{C}$  o  $^{14}\text{C}$  o uno o varios átomos de nitrógeno han sido sustituidos por  $^{15}\text{N}$ .

El compuesto de fórmula (I) es capaz de unirse al dominio SH3.1 de Nck interrumpiendo la interacción TCR-Nck y por tanto, es un compuesto inmunosupresor específico de linfocitos T, que presenta ventajas claras frente a otros inmunosupresores, entre otras, originar menos efectos secundarios.

Por todo ello, un aspecto de la invención versa en el uso del compuesto de fórmula estructural (I) o cualquiera de sus derivados para preparar un medicamento para el tratamiento y/o prevención de enfermedades que cursen con la hiperproliferación de linfocitos T.

Preferiblemente estas enfermedades son enfermedades autoinmunes, enfermedades que cursan con rechazo de alotransplantes ó xenotransplantes de órganos ó tejidos, o linfomas y/o leucemias T.

Más preferiblemente las enfermedades autoinmunes son aquellas donde la activación de linfocitos T juegue un papel importante en la fase de inducción y/o en la fase efectora, y más preferiblemente las enfermedades autoinmunes sistémicas como específicas de órgano de la lista que comprende: esclerosis múltiple y variedades, lupus eritematoso sistémico, psoriasis, vitíligo, artritis reumatoide, asma, psoriasis, hepatitis autoinmune, diabetes de tipo I, miastenia gravis, espondilitis anquilosante, enfermedad de Crohn, etc.

Otro aspecto de la invención está dirigido a una composición farmacéutica que comprende el compuesto de fórmula estructural (I), o cualquiera de sus derivados anteriormente descritos, y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

En cada caso la composición se adaptará al tipo de administración utilizada. Por ello, la composición descrita anteriormente se puede presentar en una forma farmacéutica de administración por vía oral, bien en forma sólida (e.g., comprimidos, grageas, cápsulas, etc.) o líquida (e.g., soluciones, suspensiones, emulsiones, etc.), por vía parenteral (e.g., intramuscular, subcutánea, intravenosa, etc.), rectal,... o cualquier otra forma de administración clínicamente permitida y en una cantidad terapéuticamente eficaz.

Los adyuvantes y vehículos farmacéuticamente aceptables que pueden ser utilizados en dichas composiciones son los vehículos habitualmente utilizados en el estado de la técnica. La composición farmacéutica proporcionada por esta invención puede ser facilitada por cualquier vía de administración, para lo cual dicha composición se formulará en la forma farmacéutica adecuada a la vía de administración elegida.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra “comprende” y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Las siguientes figuras y ejemplos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

**Descripción de las figuras**

Fig 1. *Modelo del dominio SH3.1 y cribado virtual de compuestos con potencial de unión.*

5 Cribado virtual de compuestos que se unen al dominio SH3.1 de Nck. Modelo teórico de estructura del dominio SH3.1 de Nck (panel A). El panel B muestra cómo encaja uno de esos compuestos en la parte superior del modelo virtual.

10 Fig 2. *Efecto selectivo de los compuestos resultantes del cribado virtual en la proliferación inducida por anti-CD3.*

Proliferación evaluada por citometría de flujo de acuerdo con la pérdida de fluorescencia verde (CFSE) dentro de la población CD8+. Los distintos compuestos se representan mediante el código NSI seguido de un número. CBM-1 es el compuesto NSI-65.

15

Fig 3. *Efecto selectivo del compuesto CBM-1 en la proliferación inducida por anti-CD3.*

18 Inhibición por CBM-1 de la proliferación de linfocitos T humanos en respuesta a estimulación con anticuerpos anti-CD3. Se comparan estos resultados con los de proliferación de linfoblastos humanos dependientes de IL2.

20

Fig 4. *Inhibición de la liberación de citoquinas por CBM-1.*

25 Inhibición por CBM-1 de la secreción de citoquinas por linfocitos T humanos en respuesta a estimulación con anticuerpos anti-CD3. Se estimularon células mononucleares de la sangre periférica (PBMNC) purificadas de donantes sanos durante 72 h sobre placas recubiertas del anticuerpo anti-CD3 OKT3 en presencia de distintas dosis de CBM-1. La concentración en el sobrenadante de las citoquinas indicadas (IL-10, IFN- $\gamma$ , y TFN- $\beta$ ) se evaluó mediante citometría de flujo multiparamétrica (cytometric bead array de BD). El compuesto CBM-1 no mostró efecto sobre la liberación de IL5, IL1- $\beta$  e IL6, mientras que IL2 e IL4 no fueron detectables.

30

Fig 5. *Inhibición de la producción intracelular de IFN $\gamma$ .*

35 Expresión intracelular de IFN $\gamma$  en respuesta a la estimulación con una mezcla de anti-CD3 y anti-CD28. En la gráfica se muestra la expresión de IFN $\gamma$  intracelular (como producto del porcentaje de células positivas y de la fluorescencia media) en función de la concentración del compuesto CBM-1.

35

40 Fig 6. *Estructura por RMN del dominio SH3.1 y desplazamientos producidos tras la unión del péptido de alta afinidad 11R085.*

Estructura por RMN del dominio SH3.1 de Nck $\alpha$  (A). Las cinco láminas  $\beta$  están numeradas en forma consecutiva. N y C indican los extremos amino- y carboxi-terminal, respectivamente. (B) Comparación de los residuos desplazados por la unión del péptido de alta afinidad 11R085 al dominio SH3.1 de Nck $\alpha$  (en negro), con los residuos correspondientes de Nck $\beta$ .

45

Fig 7. *Estructura por RMN del dominio SH3.1 y desplazamientos producidos tras la unión de CBM-1.*

50

Desplazamientos de residuos aminoacídicos en el dominio SH3.1 producidos por la interacción con el compuesto CBM-1. Se representan las cadenas laterales de los aminoácidos que cambian su posición tras unirse el compuesto. Los cambios son consecuentes con la unión del compuesto CBM-1 al bolsillo prevista en el cribado virtual.

55

Fig 8. *Toxicidad de CBM-1.*

La línea celular de linfocitos T humanos Jurkat y la línea celular linfoblastoide B humana Raji fueron incubadas con las concentraciones indicadas de CBM-1 durante 48 horas. La toxicidad del compuesto fue estimada mediante exclusión de yoduro de propidio y citometría de flujo. Las dos líneas celulares permanecieron con el 100% de viabilidad tras 48 h, incluso a la dosis más alta de compuesto.

60

Fig 9. *Comparación de la secuencia primaria del dominio SH3.1 de Nck $\alpha$  con las del dominio SH3.1 de Nck $\beta$ , así como con las de los dominios SH3.2 y SH3.3 de Nck $\alpha$ .*

65

Las posiciones de las láminas  $\beta$  y los bucles conectores en el dominio SH3.1 de Nck $\alpha$  están indicadas. Las flechas negras indican los residuos fuertemente desplazados tras la unión del compuesto CBM-1.

## ES 2 331 451 A1

### Ejemplos

A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores, que desarrollan el enfoque llevado a cabo para identificar el compuesto de la invención y comprobar su eficacia.

#### Ejemplo 1

*Efecto de inhibidores peptídicos de la interacción Nck-CD3ε en la activación de linfocitos T*

Con el fin de demostrar la importancia de la interacción Nck-CD3ε en la activación de linfocitos T y validar esta interacción como blanco de agentes inmunomoduladores, se procedió primero al diseño de péptidos sintéticos que mimetizaran la secuencia del PRS y que pudieran bloquear el sitio de unión en Nck a CD3ε. Se consiguió un péptido, denominado 11R085, que es 300 veces más potente que un péptido con la secuencia silvestre en la inhibición de la interacción de CD3ε con el dominio SH3.1 de Nck. Utilizando este péptido, se consiguió inhibir de forma específica la proliferación de linfocitos T humanos tanto CD4+ como CD8+ en respuesta a la estimulación con anticuerpos anti-CD3 con una IC50 de 20 μM, mientras que la proliferación de linfocitos T humanos dependiente de un receptor diferente, el IL2R, no fue prácticamente afectada por el péptido a concentraciones 3 veces superiores. Esto sugería que el péptido 11R085 inhibe la activación iniciada por el TCR pero no la activación mediada por otro receptor, y que por lo tanto era específico del blanco molecular para el que está diseñado. El péptido 11R085 también inhibió la producción de IL2 y la proliferación inducida por antígeno en linfocitos primarios de ratones transgénicos OT-1 con una IC50 de 5 μM. Quedaba así validada la interacción Nck-CD3ε como blanco molecular para el desarrollo de inmunosupresores.

#### Ejemplo 2

*Selección por cribado *in silico* de compuestos con potencial de bloqueo de la interacción Nck-CD3ε y evaluación de su capacidad inmunosupresora*

Se han utilizado técnicas de modelado molecular (Fiser, A., Feig, M., Brooks, C.L., 3rd and Sali, A. (2002) *Acc Chem Res.*, 35, 413-421) para obtener por homología la estructura del dominio SH3.1 de Nckα basándonos en su secuencia y en la estructura de unos 50 dominios SH3 conocidos de otras proteínas. De esta forma se ha llegado a un modelo teórico de estructura que puede ajustarse con una muy buena fiabilidad a la estructura real del dominio. Partiendo de esta estructura se hizo un cribado virtual con software propio de una colección de más de 300.000 compuestos puestos a disposición por la empresa norteamericana Chembridge y se seleccionaron los diez compuestos que teóricamente encajaban mejor en un bolsillo hidrofóbico del SH3.1, supuestamente encargado del reconocimiento de la secuencia PRS de CD3ε (ver Fig. 1). Estos compuestos se utilizaron posteriormente para realizar los ensayos de inhibición de la proliferación de linfocitos T humanos estimulados con anticuerpos anti-CD3.

#### Ejemplo 3

*Efecto selectivo de los compuestos resultantes del cribado virtual en la proliferación inducida por anti-CD3*

Para la siguiente ronda de selección de los compuestos resultantes del cribado virtual con potencial de bloqueo de la interacción Nck-CD3ε, se marcaron PBMNC purificadas de donantes sanos mediante fluorescencia y se incubaron durante 5 días sobre placas recubiertas del anticuerpo anti-CD3 OKT3 en presencia de distintas dosis de dichos compuestos. La proliferación de los linfocitos T se evaluó por citometría de flujo de acuerdo con la pérdida de fluorescencia verde (CFSE) dentro de la población CD8+.

Todos los compuestos ensayados tuvieron un cierto grado de actividad bloqueante de la proliferación de los linfocitos, pero el mejor y menos tóxico fue el compuesto denominado CBM-1 (compuesto de fórmula estructural (I)), como se muestra en la figura 2 (Fig. 2), donde CBM-1 está representado por el compuesto NSI-65.

#### Ejemplo 4

*Efecto selectivo de CBM-1 en la proliferación inducida por anti-CD3*

Se marcaron PBMNC purificadas de donantes sanos con CFSE y se incubaron durante 5 días sobre placas recubiertas del anticuerpo anti-CD3 OKT3 en presencia de distintas dosis de varios compuestos indicados, entre ellos CBM-1. La proliferación se evaluó por citometría de flujo de acuerdo con la pérdida de fluorescencia verde (CFSE) dentro de las poblaciones CD4+ y CD8+. Se realizó en paralelo un experimento de proliferación de linfoblastos humanos dependiente de IL2. Se estimularon PBMNC purificadas de donantes sanos con PHA durante 48 h y se marcaron con CFSE. Posteriormente se cultivaron por 3 días en presencia de 100 IU/ml de IL2 humana recombinante en presencia de las concentraciones de los compuestos utilizados, particularmente de CBM-1.

## ES 2 331 451 A1

El compuesto CBM-1 inhibió la proliferación inducida por anti-CD3 de linfocitos CD4+ con una IC50 de 2  $\mu$ M y la de linfocitos CD8+ con una IC50 de 3  $\mu$ M (Fig. 3). El efecto inhibitor de otros de los compuestos fue ligeramente inferior. CBM-1 no inhibió sin embargo significativamente la proliferación de linfoblastos humanos dependiente de IL2 a concentraciones de 20  $\mu$ M, indicando que su especificidad frente a la proliferación dependiente de la activación de TCR pero no frente a la dependiente de IL2R. Este dato apoya un mecanismo de acción selectivo sobre el TCR.

### Ejemplo 5

10 *Inhibición de la secreción de citoquinas por linfocitos T humanos en respuesta a estimulación con anticuerpos anti-CD3*

El efecto del compuesto CBM-1 sobre la producción de citoquinas fue medido en un ensayo en que PBMNC humanas fueron estimuladas con anticuerpos anti-CD3. El sobrenadante de estas células fue recogido a las 72 h y se midieron varias citoquinas simultáneamente por un ensayo de citometría de flujo. Estos experimentos demostraron que el compuesto tuvo un potente efecto inhibitor sobre citoquinas Th1 como IFN $\gamma$  (IC50 de 0,3  $\mu$ M), TNF $\beta$  (IC50 de 0,2  $\mu$ M) e IL10 (IC50 de 0,2  $\mu$ M) y no tuvo efecto sobre la producción de IL5 e IL6 hasta concentraciones de 30  $\mu$ M (Fig 4). Los datos indican por lo tanto que CBM-1 inhibe selectivamente la producción de algunas citoquinas por linfocitos T, pero no de otras. Es decir, CBM-1 muestra un grado de selectividad en la inhibición de rutas intracelulares de transmisión de señales.

### Ejemplo 6

25 *Inhibición de la expresión de IFN $\gamma$  intracelular por células T CD4+ de ratón en respuesta a la estimulación con anticuerpos anti-CD3*

Para demostrar si los inhibidores previenen la diferenciación de linfocitos Th0 a Th1, se realizaron ensayos de diferenciación *in vitro*. Se estimularon células de bazo de ratones C57BL/6 con anticuerpos anti-CD3 + anti-CD28 durante 48 h en presencia de las concentraciones de CBM-1 indicadas y se incubaron 6 horas más con brefeldina A, encontrándose que CBM-1 inhibe la generación de linfocitos Th1 secretores de IFN $\gamma$  con una IC50 de 0,8  $\mu$ M. Las células se tiñeron primero con CD4-PE y después de fijar y permeabilizar se tiñeron con anticuerpo anti-IFN $\gamma$ . En la gráfica (Fig. 5) se muestra la expresión de IFN $\gamma$  intracelular (como producto del porcentaje de células positivas y de la fluorescencia media) en función de la concentración de CBM-1.

### Ejemplo 7

40 *Determinación por RMN de la estructura tridimensional del dominio SH3.1 de Nck $\alpha$*

En paralelo, se determinó por RMN (en colaboración con el laboratorio de los Prof. María Angeles Jiménez y Manuel Rico, del Instituto de Química-Física Rocasolano, CSIC, Madrid), la estructura tridimensional del dominio SH3.1 de Nck $\alpha$  con y sin el péptido 11R085 (Fig. 6). Esto permitió validar la predicción del modelo de estructura *in silico* utilizado para el cribado virtual. Además, permitió medir los desplazamientos químicos ocasionados en la estructura por el compuesto CBM-1 (Fig. 7).

Los resultados indican que el compuesto CBM-1 interacciona estructuralmente con la proteína aproximadamente en la forma predicha por los estudios bioinformáticos. El compuesto se une en un bolsillo hidrofóbico en el que participan los residuos Trp41 y Tyr50/Phe53, provocando una distorsión y desplazamiento de la lámina  $\beta$ 2 y de residuos en el bucle distal (Fig. 7 y Fig. 9). Los desplazamientos de residuos en el dominio SH3.1 validan la predicción sobre la interacción del dominio SH3.1 con CBM-1 a nivel molecular y son consecuentes con el modelo.

55

60

65

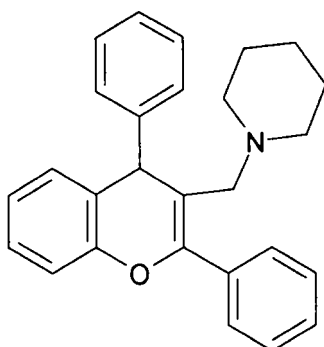
REIVINDICACIONES

1. Compuesto de fórmula (I):

5

10

15



20

y cualquiera de sus derivados para su uso como medicamento.

2. Uso del compuesto según reivindicación 1 para preparar un medicamento.

25

3. Uso del compuesto según reivindicación 2 para preparar un medicamento para el tratamiento y/o prevención de enfermedades que cursan con la activación de linfocitos T ó con la hiperproliferación o proliferación anormal de los mismos.

30

4. Uso del compuesto según reivindicación 3, donde las enfermedades que cursan con la activación de linfocitos T son enfermedades autoinmunes.

35

5. Uso del compuesto según reivindicación 4 donde las enfermedades autoinmunes se seleccionan de la lista que comprende: esclerosis múltiple y sus variedades, lupus eritematoso sistémico, psoriasis, vitíligo, artritis reumatoide, asma, psoriasis, hepatitis autoinmune, diabetes de tipo I, miastenia gravis, espondilitis anquilosante y enfermedad de Crohn.

40

6. Uso del compuesto según reivindicación 3 donde las enfermedades que cursan con la activación de linfocitos T, son enfermedades que cursan con rechazo de alotransplantes ó xenotransplantes de órganos ó tejidos.

45

7. Uso del compuesto según reivindicación 3 donde las enfermedades que cursan con la activación de linfocitos T, son linfomas o leucemias T.

50

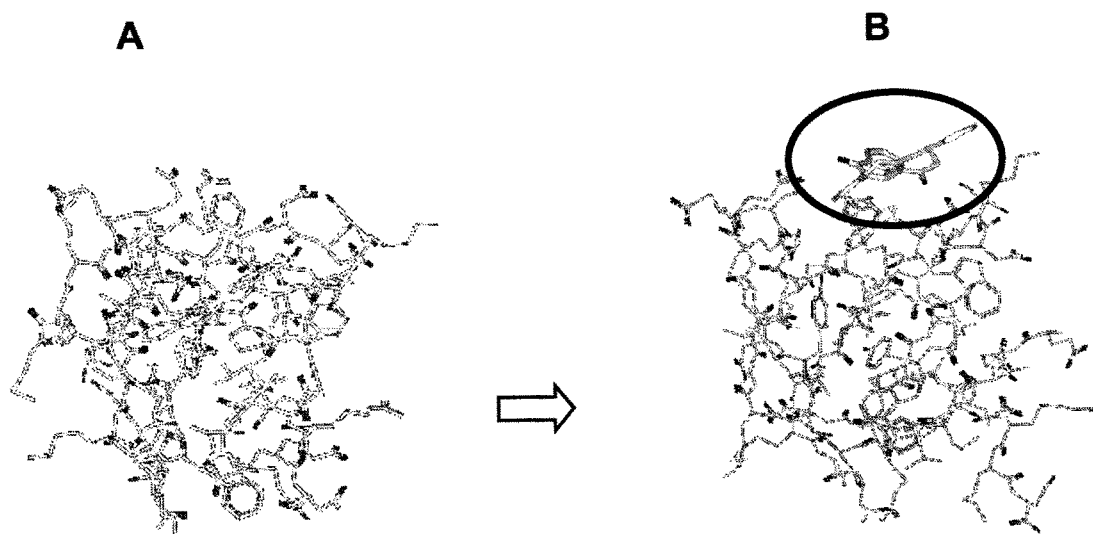
8. Composición farmacéutica que comprende el compuesto según reivindicación 1 y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

55

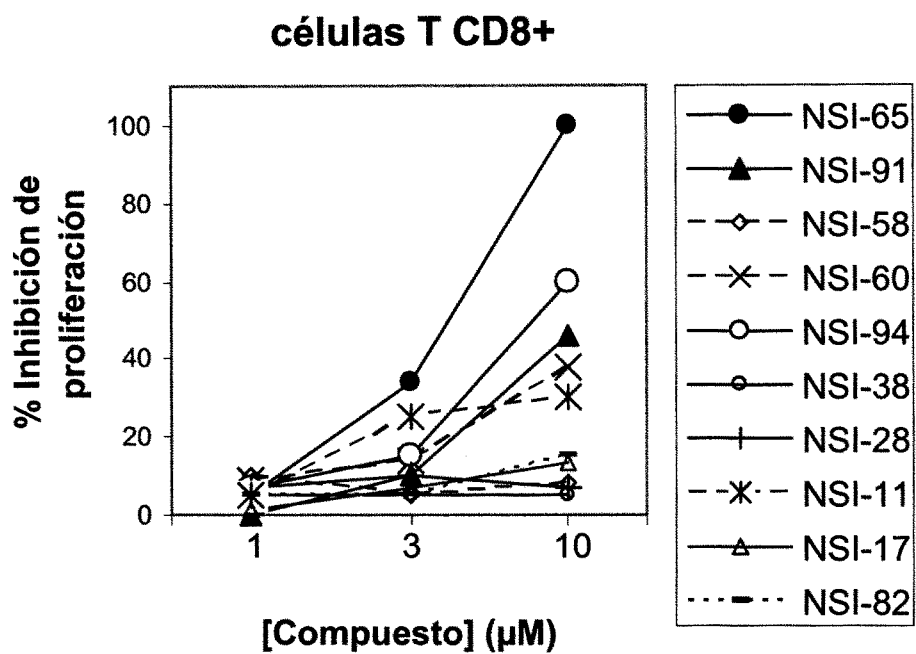
60

65

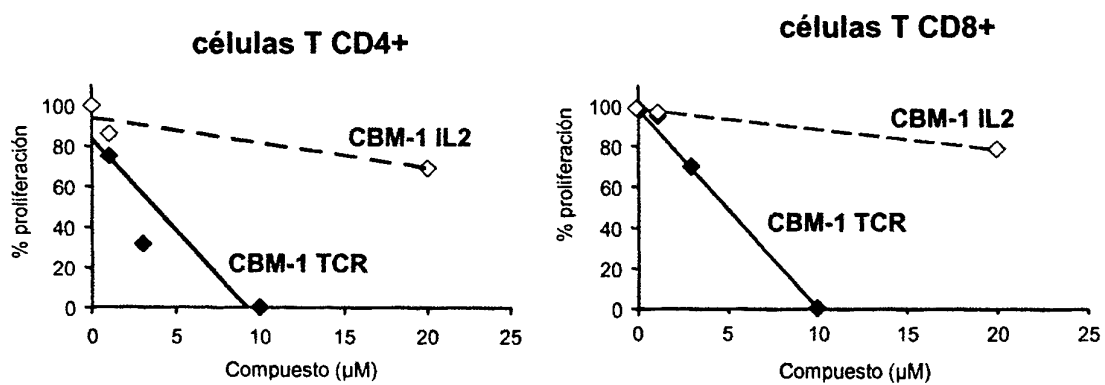




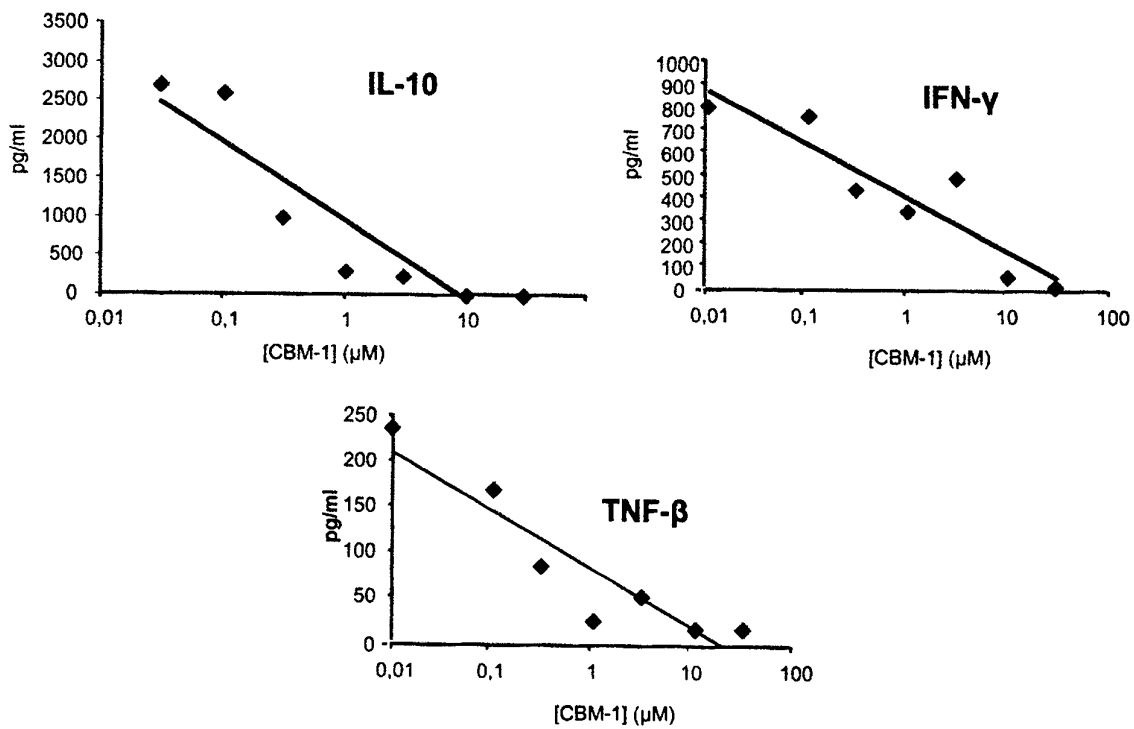
**FIG. 1**



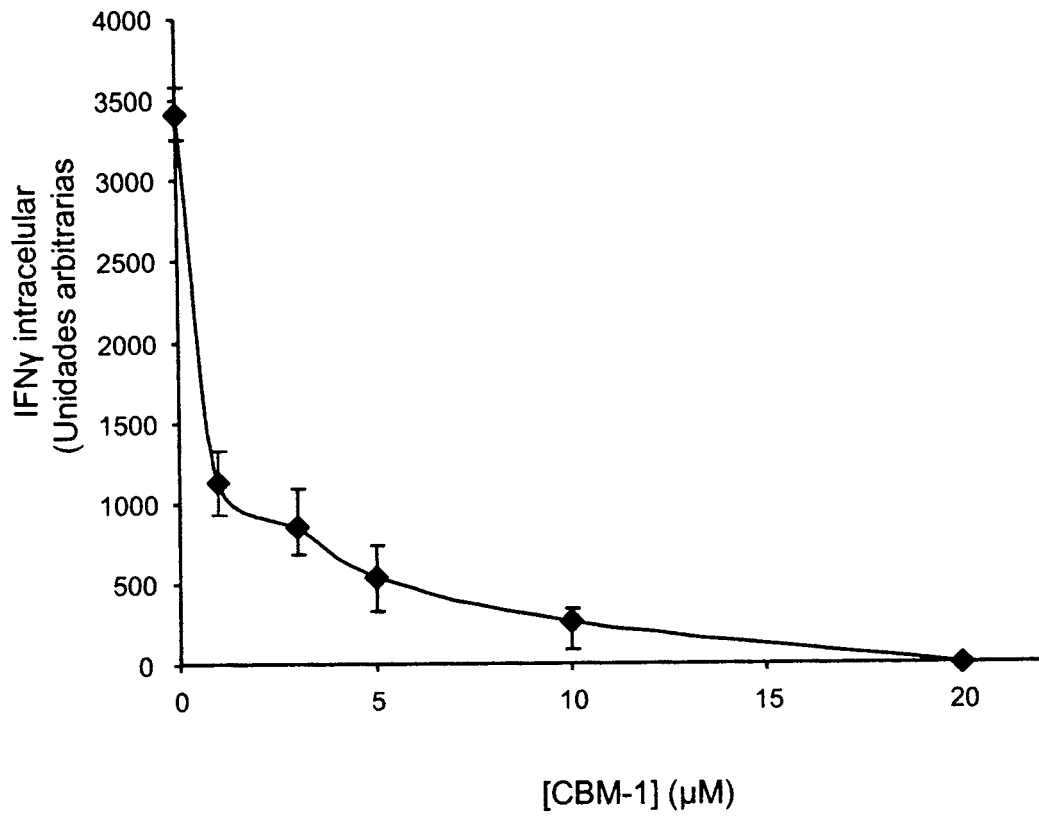
**FIG. 2**



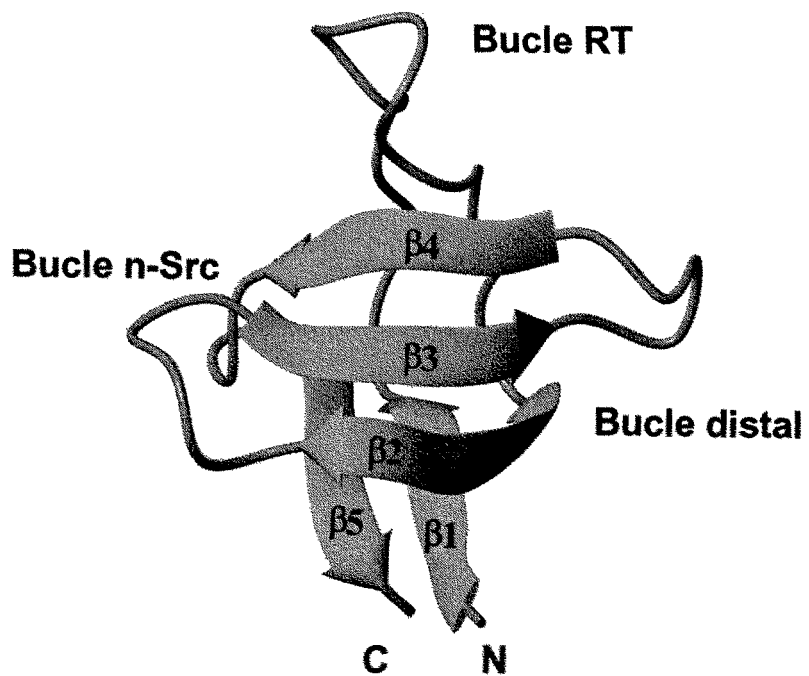
**FIG. 3**



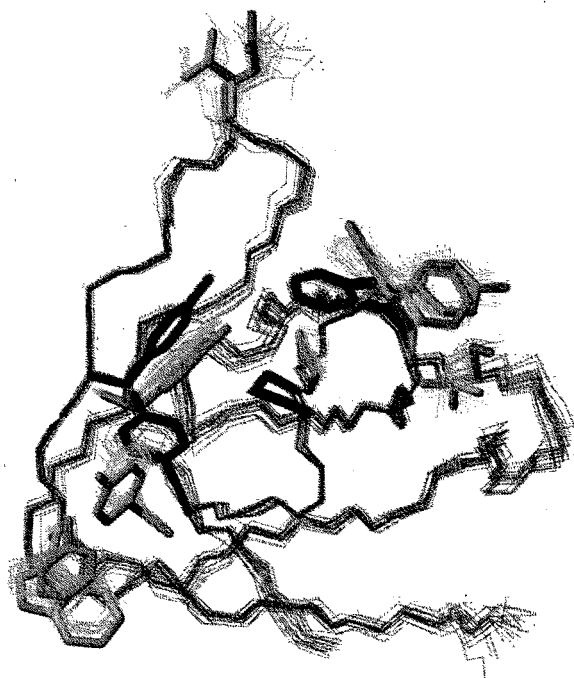
**FIG. 4**



**FIG. 5**



**FIG. 6A**



**FIG. 6B**

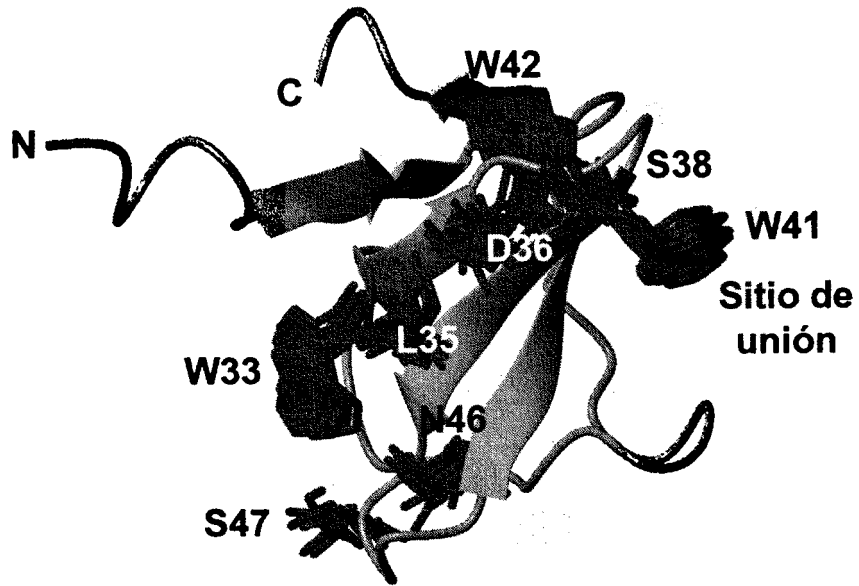


FIG. 7

Toxicidad 48 h

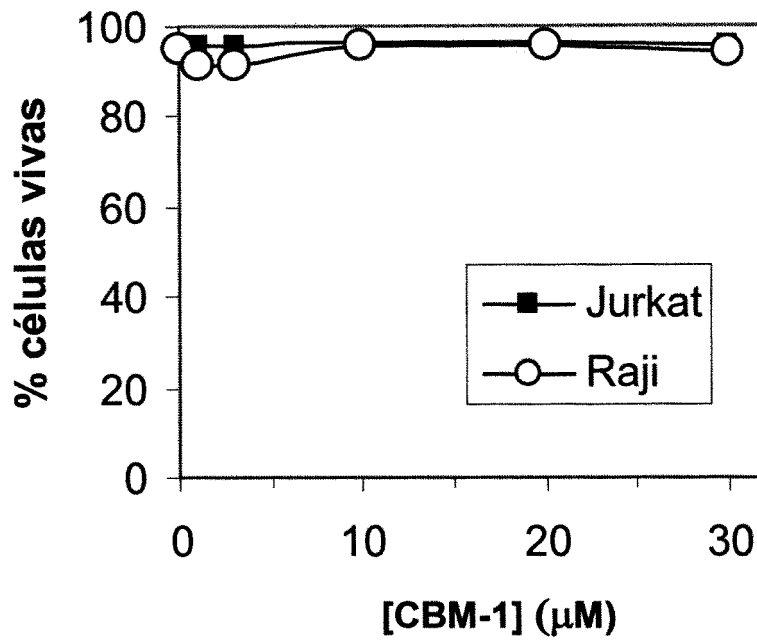
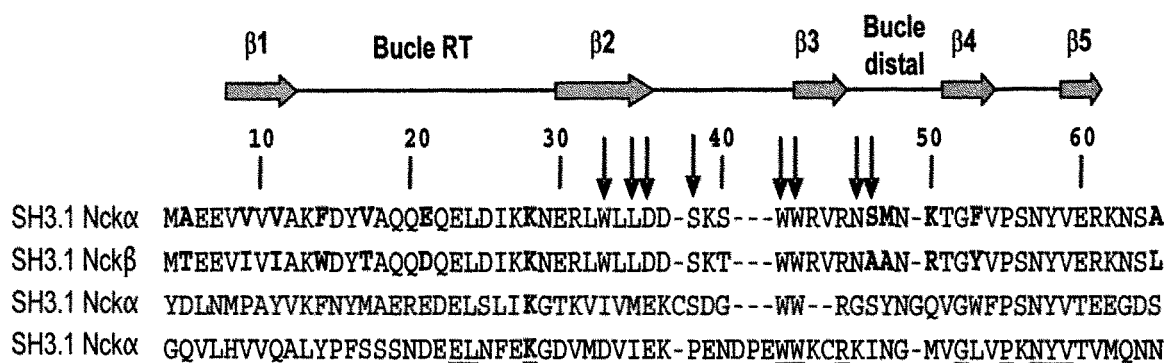


FIG. 8



**FIG. 9**



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 331 451

② Nº de solicitud: 200801964

③ Fecha de presentación de la solicitud: **30.06.2008**

④ Fecha de prioridad:

## INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.: **C07D 311/60** (2006.01)  
**A61K 31/353** (2006.01)

### DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	WO 2003096982 A2 (CYTOVIA y SHIRE BIOCHEM) 27.11.2003, reivindicaciones, en especial reivindicaciones 1-16,40; fórmulas IIa y III, página 40.	1-9
A	WO 2001034591 A2 (CYTOVIA) 17.05.2001, resumen; reivindicación 1.	1-9
A	WO 2002092076 A1 (CYTOVIA y SHIRE BIOCHEM) 21.11.2002, resumen; reivindicación 1.	1-9

#### Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

#### El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe

05.10.2009

Examinador

P. Fernández Fernández

Página

1/4

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C07D, A61K

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC,WPI,CAS,REGISTRY



Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 05.10.2009

**Declaración**

<b>Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)</b>	Reivindicaciones 1-9	<b>SÍ</b>
	Reivindicaciones	<b>NO</b>
<b>Actividad inventiva (Art. 8.1 LP 11/1986)</b>	Reivindicaciones 1-9	<b>SÍ</b>
	Reivindicaciones	<b>NO</b>

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de **aplicación industrial**. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

**Base de la Opinión:**

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como ha sido publicada.

**1. Documentos considerados:**

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	WO 03/096982	27-11-2003

**2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración**

La solicitud se refiere a un compuesto de fórmula (I) (reivindicación 1) y al uso de este compuesto para preparar un medicamento útil en el tratamiento de enfermedades que implican una hiperproliferación de linfocitos T así como a la composición farmacéutica que comprende el compuesto de fórmula I.

El documento D1 se considera el más relevante del estado de la técnica. Divulga derivados de 4H-cromenos útiles para controlar el crecimiento de células alteradas y de aplicación en enfermedades que conllevan un aumento de linfocitos T, tal como enfermedades autoinmunes (página 40 y reivindicación 40 de D1). Entre los compuestos divulgados en D1 los correspondientes a las fórmulas IIa y III (ver páginas 16 y 18) son los más próximos al compuesto de fórmula I de la reivindicación 1 de la solicitud, este compuesto no se encuentra entre los divulgados en D1 ni parece posible concluir que los sustituyentes en posiciones 2 y 3 del compuesto I conlleven ventajas en su actividad. Por ello, tanto la reivindicación 1, que se refiere al compuesto (I), como las reivindicaciones 2-9, que describen el uso de este compuesto y la composición farmacéutica que lo comprende, para preparar un medicamento útil en enfermedades autoinmunes, tienen novedad y actividad inventiva, tal como establecen los Art. 6.1 y 8.1 de la Ley de Patentes 11/1986.