

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 537 518**

51 Int. Cl.:

<b>A61K 31/167</b>	(2006.01)	<b>A61K 31/4162</b>	(2006.01)	<b>A61P 37/00</b>	(2006.01)
<b>A61K 31/18</b>	(2006.01)	<b>A61K 31/4178</b>	(2006.01)		
<b>A61K 31/343</b>	(2006.01)	<b>A61K 31/4196</b>	(2006.01)		
<b>A61K 31/351</b>	(2006.01)	<b>A61K 31/427</b>	(2006.01)		
<b>A61K 31/4015</b>	(2006.01)	<b>A61K 31/435</b>	(2006.01)		
<b>A61K 31/4025</b>	(2006.01)	<b>A61K 31/445</b>	(2006.01)		
<b>A61K 31/4035</b>	(2006.01)	<b>A61K 31/451</b>	(2006.01)		
<b>A61K 31/404</b>	(2006.01)	<b>A61K 31/4525</b>	(2006.01)		
<b>A61K 31/41</b>	(2006.01)	<b>A61K 31/4704</b>	(2006.01)		
<b>A61K 31/4155</b>	(2006.01)	<b>A61K 31/495</b>	(2006.01)		

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.04.2009 E 09738328 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.02.2015 EP 2285366**

54 Título: **Moléculas que inhiben una ruta metabólica que implica la proteína tirosina quinasa Syk y procedimiento de identificación de dichas moléculas**

30 Prioridad:

**09.04.2008 FR 0801959**

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

**09.06.2015**

73 Titular/es:

**CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE  
SCIENTIFIQUE (100.0%)  
3, rue Michel-Ange  
75794 Paris Cedex 16, FR**

72 Inventor/es:

**DARIAVACH, PIONA;  
MARTINEAU, PIERRE, EMILE, ULYSSE y  
VILLOUTREIX, BRUNO**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

**ES 2 537 518 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

Moléculas que inhiben una ruta metabólica que implica la proteína tirosina quinasa Syk y procedimiento de identificación de dichas moléculas

5 La presente invención se refiere a moléculas orgánicas que pueden inhibir la unión de un anticuerpo o fragmento de anticuerpo a la proteína quinasa Syk humana, al uso de dichas moléculas en la fabricación de productos medicinales para la prevención y el tratamiento de dolencias dependientes de las rutas metabólicas que implican Syk, y un método para identificar dichas moléculas.

10 La proteína quinasa Syk ("Spleen tyrosine kinase") (PKT) es una proteína citoplasmática que es un mediador clave en la señalización dependiente de inmunorreceptores en las células implicadas en la inflamación, tales como los linfocitos B, mastocitos, macrófagos y neutrófilos. En los mastocitos y en los basófilos, la reticulación del receptor FcεRI (receptor con una afinidad elevada por la inmunoglobulina E) con IgE y los antígenos induce la fosforilación de los motivos ITAM ("Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif") de FcεRI para formar un sitio de unión para Syk que se activa a continuación. La proteína Syk activada fosforila a su vez numerosos sustratos, incluyendo las proteínas adaptadoras LAT ("linker for activation of T cells"), SLP-76 ("Src homology 2 (SH2) domain-containing leukocyte protein of 76 kD") y Vav, dando como resultado la activación de una pluralidad de cascadas de señalización, tales como las PLC-γ (phospholipase Cγ), PI3K ("phosphatidylinositol 3-kinase"), Erk ("extracellular signal-regulated kinase"), JNK ("c-jun N-terminal kinase") y p38 (véase Figura 9). Estas cascadas en su caso ocasionan la desgranulación, síntesis y liberación de mediadores lípidos y la producción y secreción de citoquinas, quimioquinas y factores de crecimiento por mastocitos y basófilos<sup>1,2</sup>.

25 En consecuencia, la proteína Syk se reconoce como una diana farmacéutica potencial, especialmente para el tratamiento de las reacciones de hipersensibilidad de tipo I entre las que se incluyen rinitis alérgica, urticaria, asma y anafilaxia debido a su papel central anterior a los complejos de señalización del inmunorreceptor que regulan la respuesta inflamatoria en leucocitos. El hecho de que Syk regule de forma positiva la señalización de FcεRI<sup>3</sup> sugiere especialmente que podría ser una diana excelente para el tratamiento de trastornos alérgicos. Además, debido a su papel central en la señalización dependiente de FcεRI, la interacción farmacéutica con Syk podría ser más ventajosa que el uso convencional de antihistaminas o agonistas del receptor del leucotrieno que inhiben una sola etapa después de las cascadas de complejo que contribuyen a los síntomas agudos y crónicos asociados con las dolencias alérgicas.

35 Ya se han desarrollado inhibidores farmacológicos de la actividad de la quinasa Syk que tienen potencial terapéutico, tales como, en particular, oligonucleótidos de sentido contrario específicos de Syk en forma de aerosoles o moléculas pequeñas que interfieren con la actividad de Syk tales como ER-27139, BAY-613606, piceatannol y R112<sup>1,4</sup>.

40 Las publicaciones de solicitud de patente internacional WO2008/033798, WO03/057695 y WO01/09134 también describen diferentes compuestos heterocíclicos utilizados como inhibidores de la proteína Syk.

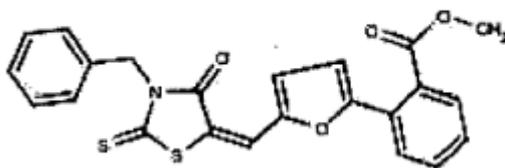
45 Además, la publicación de solicitud de patente internacional WO2004/089415 describe el uso de inhibidores de la 11b-hidroxiesteroide deshidrogenasa de tipo 1 (HDS-1) asociada con un agonista del receptor de glucocorticoides para el tratamiento de diferentes trastornos inflamatorios. Entre los inhibidores de HSD-1, el documento WO2004/089415 describe diferentes sulfonamidas y derivados de triazol. Sin embargo, estos compuestos siempre se administran junto con un agonista del receptor de glucocorticoides, y no se ha divulgado su efecto sobre la proteína Syk.

50 Sin embargo, si se tienen en cuenta los diferentes tipos de células que expresan Syk, se deben tener en cuenta los posibles efectos secundarios asociados con la exposición sistémica del sistema inmunitario a productos medicinales dirigidos al dominio de la quinasa Syk. De hecho, la proteína Syk está ampliamente distribuida en varios tipos de células, es por tanto fundamental tener en cuenta los efectos secundarios de su inhibición sobre diferentes funciones fisiológicas tales como la diferenciación, la adhesión y la proliferación celular<sup>5,6</sup>.

55 Los inventores han identificado inhibidores de la proteína Syk que actúan evitando su interacción con sus ligandos celulares naturales en lugar de dirigirse a su sitio de acción catalítica, especialmente el compuesto C-13 y los compuestos 1 a 87 mostrados en la tabla 1.

60 Un objeto de la presente invención es la molécula C-13 (2-{5-[(3-bencil-4-oxo-tioxo-1,3-tiazolidin-5-ilideno)metil]-2-furil}benzoato de metilo) que tiene la fórmula

(C-13)



como medicamento para la prevención o el tratamiento de una dolencia dependiente de una ruta metabólica que implica Syk en seres humanos o animales.

5 La presente invención tiene también por objeto moléculas orgánicamente funcionales a la molécula C-13, que se unen con la tirosina quinasa Syk y especialmente a moléculas que pueden inhibir en al menos un 5 %, preferentemente al menos un 10 %, por ejemplo al menos un 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80 o 85 % *in vitro* la unión de

10 (i) el fragmento de anticuerpo G4G11 (SEC ID N° 2), o bien,  
 (ii) el fragmento de anticuerpo G4E4 (SEC ID N° 3), o bien,  
 (iii) un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se une a la tirosina quinasa Syk humana en un epítipo que comprende al menos uno de los restos 65 a 74 de la secuencia de aminoácidos de la proteína tirosina quinasa Syk humana representada por la SEC ID N° 1, o bien,  
 15 (iv) un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se une con la proteína tirosina quinasa Syk humana e inhibe en al menos un 10 % la unión de los fragmentos de anticuerpo G4G11 o G4E4 con la proteína tirosina quinasa Syk humana (SEC ID N° 1)

20 con la proteína tirosina quinasa Syk humana o con cualquiera de sus variantes en animales, por ejemplo, la proteína tirosina quinasa Syk de murino cuya secuencia se ilustra en la Figura 8B (SEC ID N° 4), como medicamento para la prevención o el tratamiento de una dolencia dependiente de una ruta metabólica que implica Syk en seres humanos o animales.

25 La expresión "molécula funcionalmente equivalente" se refiere a una molécula, por ejemplo una molécula orgánica que tiene un peso molecular comprendido entre 50 y 2500 Da, que puede proporcionar el mismo efecto *in vitro* en un medio intracelular o extracelular *in vivo*, opcionalmente con una intensidad diferente, que una molécula dada. En particular, incluida en el alcance de la presente invención, la expresión "molécula funcionalmente equivalente a la molécula C-13" se refiere a una molécula que puede producir el mismo efecto *in vitro* en un medio intracelular o  
 30 extracelular o *in vivo* opcionalmente con una intensidad diferente, sobre la proteína tirosina quinasa Syk humana representada por la SEC ID N° 1 (Figura 8A) como molécula C-13. En particular, se refiere a moléculas que inhiben la unión de Syk con otra proteína producida en la región Syk que comprende sus dominios SH2. Más específicamente, estas moléculas no afectan la actividad enzimática de Syk. Por ejemplo, consisten en moléculas que pueden inhibir la interacción de la proteína tirosina quinasa Syk con el fragmento de anticuerpo G4G11 (SEC ID N° 2), el fragmento de anticuerpo G4E4 (SEC ID N° 3), o un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se une al mismo epítipo que el fragmento de anticuerpo G4G11 o G4E4 de la proteína Syk humana (SEC ID N° 1).

La expresión "porcentaje de inhibición" de la unión de un anticuerpo o fragmento de anticuerpo con la proteína Syk se refiere especialmente a la relación  $[(A-B)/(A \times 100)]$ , en la que A consiste en la intensidad de una señal proporcional a la cantidad de un anticuerpo o fragmento de anticuerpo unido a la proteína Syk en ausencia de una molécula de acuerdo con la invención y en la que B es la intensidad de la misma señal en presencia de una molécula de acuerdo con la invención en las mismas condiciones. La inhibición de la unión de un anticuerpo o fragmentos de anticuerpo con la proteína Syk se puede demostrar especialmente *in vitro* mediante un ensayo de desplazamiento de anticuerpo basado en la técnica ELISA tal como se describe, por ejemplo, en la solicitud internacional WO 2005106481. Este ensayo se puede realizar, por ejemplo, de acuerdo con el protocolo descrito en  
 45 el ejemplo 3-2) del presente documento.

La expresión "variantes de Syk en animales" se refiere a los genes de varias especies animales, por ejemplo ratón, rata, perro, gato u otro mamífero, que codifican una proteína que tiene una fuerte homología o identidad de  
 50 secuencia con la proteína Syk humana representada por la secuencia SED ID N° 1 (véase la Figura 8A), por ejemplo una proteína que tiene al menos 70, 75, 80, 85, 90 o 95 % de homología o identidad de secuencia con la secuencia SED ID N° 1 de la proteína Syk humana, que tiene la misma actividad tirosina quinasa y está implicada en las mismas cascadas funcionales que esta, especialmente en la cascada funcional que origina la desgranulación de mastocitos. Puede referirse especialmente a genes ortólogos, es decir, genes que aparecen en diferentes organismos, que han evolucionado a partir del mismo gen antecesor por eventos de especiación. La presente invención también se refiere a las sales farmacéuticamente aceptables, y, si aplica, a los estereoisómeros y racematos de C-13 o moléculas equivalentes de acuerdo con la invención.

La expresión "sales farmacéuticamente aceptables" se refiere a sales de adición de ácido o base orgánicas e inorgánicas relativamente no tóxicas que mantienen la actividad biológica de las moléculas de acuerdo con la invención. Los ejemplos de sales farmacéuticamente aceptables se describen especialmente en S. M. Berge et al., "Pharmaceutical Salts", J. Pharm. Sci, 1977, 66:p. 1-1940. Las sales de adición farmacéuticamente aceptables de las moléculas de acuerdo con la invención pueden ser por ejemplo las sales de bromhidrato, clorhidrato, sulfato, bisulfato, fosfato, nitrato, acetato, oxalato, valerato, oleato, palmitato, estearato, laurato, borato, benzoato, lactato, fosfato, tosilato, citrato, maleato, fumarato, succinato, tartrato, naftilato, mesilato, glucoheptanato, lactobionato, sulfamato, malonato, salicilato, propionato, metilénbis-b-hidroxinaftoato, ácido gentísico, isetionato, di-p-toluoiltartrato, metanosulfonatos, etanosulfonato, bencenosulfonato, p-toluenosulfonato, ciclohexil sulfamato y quinatoslaurilsulfonato, y equivalentes. Otras sales farmacéuticamente aceptables que pueden ser adecuadas incluyen sales metálicas, por ejemplo, sales farmacéuticamente aceptables de metales alcalinos o metales alcalinotérreos, tales como las sales de sodio, potasio, calcio y magnesio.

Estas sales farmacéuticamente aceptables se pueden preparar *in situ* durante el aislamiento y purificación de la molécula final. Como alternativa, las sales de adición de ácido o base se pueden preparar haciendo reaccionar la molécula purificada por separado en su forma ácida o básica con una base o un ácido orgánico o inorgánico y asilando la sal formada. Por ejemplo, se puede preparar una sal de adición de ácido farmacéuticamente aceptable haciendo reaccionar una molécula de acuerdo con la invención con un ácido orgánico o inorgánico adecuado (tal como por ejemplo, el ácido bromhídrico, clorhídrico, sulfúrico, nítrico, fosfórico, succínico, maleico, fórmico, acético, propiónico, fumárico, cítrico, tartárico, láctico, benzoico, salicílico, glutámico, aspártico, p-toluenosulfónico, bencenosulfónico, metanosulfónico, etanosulfónico, hexanoico o naftalenosulfónico tales como el ácido 2-naftalenosulfónico), opcionalmente en un disolvente adecuado tal como un disolvente orgánico. Cuando está presente un grupo adecuado, se puede preparar una sal de adición de base haciendo reaccionar una molécula de acuerdo con la invención con una base orgánica o inorgánica adecuada (por ejemplo, trietilamina, etanolamina, trietanolamina, colina, arginina, lisina o histidina), opcionalmente en un disolvente adecuado tal como un disolvente orgánico. Las sales así generadas se pueden aislar después mediante cristalización y filtración.

En algunas realizaciones, se prefieren las sales farmacéuticamente aceptables porque proporcionan las moléculas de acuerdo con la invención con una estabilidad o solubilidad mayores, lo que facilita su formulación.

De acuerdo con una realización especialmente preferida, las moléculas orgánicas de acuerdo con la invención se unen a la proteína tirosina quinasa Syk en un sitio localizado fuera de su dominio catalítico.

También preferiblemente, las moléculas orgánicas de acuerdo con la invención tienen un peso molecular comprendido entre 50 y 2500 Dalton, por ejemplo entre 50 y 2000 Da, entre 50 y 1500 Da o entre 50 y 1000 Da.

De acuerdo con una realización particular, las moléculas de acuerdo con la invención pueden inhibir, en al menos un 5 %, preferentemente al menos un 10 %, la unión de un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se une con la proteína tirosina quinasa Syk humana en un epítipo que comprende al menos dos, preferentemente al menos 3, 4 o 5, por ejemplo 5, 6, 7, 8, 9 o 10 restos 65 a 74 de la secuencia de aminoácidos de la proteína tirosina quinasa Syk humana (SED ID N° 1), con la tirosina quinasa Syk humana. De acuerdo con una realización preferida, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo se une a la proteína tirosina quinasa Syk humana en el mismo epítipo que el fragmento de anticuerpo G4G11 o el fragmento de anticuerpo G4E4 en la proteína tirosina quinasa Syk humana, cuya secuencia se ilustra mediante la SED ID N° 1.

De acuerdo con una realización particular adicional, las moléculas de acuerdo con la invención pueden inhibir, en al menos un 5 %, preferentemente al menos un 10 %, la unión de un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se une a la proteína tirosina quinasa Syk e inhibe, en al menos un 15 %, preferentemente al menos 20, 30, 40, 50, 60, 70 u 80 %, la unión de los fragmentos de anticuerpo G4G11 o G4E4 con la proteína tirosina quinasa Syk humana (SED ID N° 1), con la proteína tirosina quinasa Syk humana.

Preferentemente, las moléculas de acuerdo con la invención se unen con la proteína Syk humana en una cavidad tridimensional que comprende el resto arginina situado en la posición 68 y los dos restos de ácido glutámico situados en las posiciones 121 y 155 de la proteína Syk, cuya secuencia se ilustra mediante la SED ID N° 1. Aún preferentemente, la cavidad tridimensional comprende además el resto serina situado en la posición 9, el resto glutamina situado en la posición 43, el resto fenilalanina situado en la posición 51, el resto isoleucina situado en la posición 66, los restos glutamato situados en las posiciones 67 y 69, el resto leucina situado en la posición 70, el resto asparagina situado en la posición 71, el resto glicina situado en la posición 72, el resto treonina situado en la posición 73, el resto quirosina situado en la posición 74 y el resto alanina situado en la posición 75 de la proteína Syk humana, cuya secuencia se ilustra mediante la SED ID N° 1.

Más preferentemente, la afinidad *in vitro*, medida por la constante de disociación (o Kd), de las moléculas de acuerdo con la invención para la proteína Syk, es menor de 100  $\mu\text{M}$ , más preferentemente, menor de 50  $\mu\text{M}$ , y especialmente preferido, menor de 25  $\mu\text{M}$ . La afinidad de las moléculas de acuerdo con la invención para la proteína Syk, por ejemplo, entre 0,01 y 100  $\mu\text{M}$ , entre 0,1 y 50  $\mu\text{M}$  o entre 0,5 y 25  $\mu\text{M}$ . La constante de disociación de las moléculas de acuerdo con la invención con respecto a la proteína Syk se pueden medir particularmente *in vitro* por

medio de espectroscopía de fluorescencia (o espectrofluorometría).

La presente invención tiene también por objeto al uso de una molécula de acuerdo con la invención para producir un producto metabólico para la prevención o el tratamiento de una dolencia dependiente de una ruta metabólica que implica Syk en seres humanos o animales.

De acuerdo con una realización especialmente preferida, las moléculas o sales de acuerdo con la invención se utilizan en la fabricación de un producto medicinal para la prevención o el tratamiento de reacciones de hipersensibilidad de tipo I.

La expresión "hipersensibilidad" se refiere a una respuesta inmune no adecuada o excesiva a un alérgeno, por ejemplo polen, sustancia para espolvorear, pelo animal o determinados alimentos, con efectos que van desde una reacción alérgica moderada (prurito cutáneo, rinitis, conjuntivitis, etc.) a reacciones sistémicas graves que dan potencialmente como resultado un choque anafiláctico y que pueden constituir, en algunos casos, una amenaza para la vida. Las reacciones de hipersensibilidad inmediata y retrasada se clasifican respectivamente en los tipos I y IV según la clasificación definida por Gell y Coombs (Gell PGH, Coombs RRA, eds.

Clinical Aspects of Immunology. 1ª ed. Oxford, Inglaterra: Blackwell; 196339). De acuerdo con esta clasificación, "la hipersensibilidad de tipo I (o atópica o anafiláctica)" es una reacción alérgica inmediata asociada con la exposición a un antígeno o alérgeno específico, por ejemplo, mediante tragado, inhalación, inyección o contacto directo, y el desencadenamiento de la secreción de inmunoglobulina E (IgE) por las células plasmáticas. La IgE se une a los receptores Fc que se encuentran sobre la superficie de los mastocitos del tejido y los basófilos de la sangre. La posterior exposición de los mastocitos y basófilos sensibilizados al mismo alérgeno ocasiona la desgranulación de las células que tienen la correspondiente IgE y la liberación de mediadores tales como la histamina, el leucotrieno o las prostaglandinas que actúan sobre los tejidos circundantes, dando lugar especialmente a la vasodilatación y la contracción del músculo liso. Las reacciones pueden ser locales o sistémicas, y los síntomas van desde una irritación moderada a la muerte súbita por choque anafiláctico. Los ejemplos de dolencias causadas por hipersensibilidad de tipo I incluyen asma alérgica, conjuntivitis alérgica, rinitis alérgica (fiebre del heno), anafilaxia, angioedema, urticaria, eosinofilia, alergias a antibióticos tales como penicilina o cefalosporina. "Hipersensibilidad de tipo II" o "respuesta inmune dependiente de anticuerpos" es una reacción que requiere por lo general de unas pocas horas a un día, asociado con interacciones entre anticuerpos (IgG, IgM) y un antígeno de la superficie de las células del paciente que tiene este antígeno, ocasionando la destrucción de dichas células y la proliferación de linfocitos B, que producen anticuerpos contra el antígeno. "Hipersensibilidad de tipo III" o "enfermedad del complejo inmune" es una reacción que se desarrolla a lo largo de varias horas, días o semanas, asociada a la presencia de cantidades similares de anticuerpos y antígenos que ocasionan la formación de un complejo inmune no adecuado para su evacuación durante la circulación en los vasos, la deposición de los mismos sobre las paredes de dichos vasos y dando lugar a respuestas inflamatorias locales o sistémicas. "Hipersensibilidad de tipo IV" o "inmunidad mediada por células" o "reacción de inmunidad retardada" es una respuesta inmune que requiere por lo general de dos a tres días de desarrollo y no está asociada con una respuesta de anticuerpos sino con la formación de un complejo entre células que expresan un antígeno del complejo mayor de histocompatibilidad I o II y linfocitos T que ocasionan la liberación de linfocinas y/o citotoxicidad mediada por linfocitos T.

Preferentemente, las moléculas o sales de acuerdo con la invención se utilizan en la fabricación de productos medicinales para la prevención o el tratamiento de reacciones de hipersensibilidad de tipo I que inhiben la desgranulación de mastocitos dependiente de IgE. Más preferentemente, las moléculas de acuerdo con la invención pueden inhibir en un 50 % la desgranulación de los mastocitos *in vitro*, a una concentración (CI50) comprendida entre 1 ng/ml y 1 mg/ml, por ejemplo a una concentración comprendida entre 1 ng/ml y 500 µg/ml, entre 1 ng/ml y 250 µg/ml, entre 1 ng/ml y 100 µg/ml, entre 1 ng/ml y 50 µg/ml, entre 1 ng/ml y 10 µg/ml, entre 1 ng/ml y 5 µg/ml o entre 1 ng/ml y 2 µg/ml. También preferiblemente, una cantidad entre 1 nM y 1 mM, por ejemplo entre 1 nM y 100 nM, entre 10 nM y 100 nM o entre 1 nM y 10 nM, de una molécula de acuerdo con la invención que puede inhibir en un 50 % la desgranulación de los mastocitos *in vitro*.

Más preferentemente, la ruta metabólica que implica Syk sobre la que actúan las moléculas o sales de acuerdo con la invención es una ruta de activación de mastocitos o basófilos.

Más preferentemente, la dolencia sobre la que actúan las moléculas o sales de acuerdo con la invención es asma alérgica, conjuntivitis alérgica, rinitis alérgica, anafilaxia, angioedema, urticaria, eosinofilia o una alergia a un antibiótico.

De acuerdo con una realización preferida, las moléculas o sales de acuerdo con la invención no tienen efecto sobre las rutas metabólicas que implican a la proteína Syk humana (SED ID N° 1) salvo aquellas que ocasionan la desgranulación de los mastocitos y/o las reacciones de hipersensibilidad de tipo I. Más preferentemente, las moléculas o sales de acuerdo con la invención no tienen efectos sobre la respuesta de anticuerpos posterior a la inmunización mediante un antígeno dependiente del tipo o sobre el alistamiento de neutrófilos dependiente de Syk.

La proteína tirosina quinasa Syk también se encuentra en la superficie de los linfocitos B, linfocitos T, neutrófilos,

eosinófilos, células NK, plaquetas, eritrocitos, osteoclastos, células epiteliales o células cancerosas. De acuerdo con una realización alternativa, la ruta metabólica que implica Syk sobre la que actúan las moléculas o sales de acuerdo con la invención es una ruta de activación de linfocitos B, linfocitos T, neutrófilos, eosinófilos, células NK, plaquetas, eritrocitos, osteoclastos, células epiteliales o células cancerosas. De acuerdo con esta realización, la dolencia sobre la que actúan las moléculas o sales de acuerdo con la invención puede ser, por tanto, artritis reumatoide, una enfermedad autoinmune, inflamación o cáncer.

De acuerdo con una realización particular, las moléculas o sales de acuerdo con la invención se pueden utilizar junto con otra molécula terapéutica. Por ejemplo, puede consistir en una molécula terapéutica también utilizada en la prevención o el tratamiento de una dolencia dependiente de una ruta metabólica que implica a Syk o, por otra parte, una molécula terapéutica utilizada en la prevención o el tratamiento de una dolencia no dependiente de una ruta metabólica que implica a Syk. De acuerdo con una realización preferida, las moléculas o sales de acuerdo con la invención se utilizan junto con una molécula utilizada en el tratamiento de la alergia o de la hipersensibilidad de tipo I o para el tratamiento de las enfermedades relacionadas con las citadas. Más preferentemente, las moléculas o sales de acuerdo con la invención se utilizan junto con epinefrina (o adrenalina), una antihistamina H1, por ejemplo difenhidramina, meclizina, flufenazina, perfenazina, proclorperazina, trifluoperazina, acrivastina, astemizol, cetirizina, levocetirizina, fexofenadina, loratadina, desloratadina, mizolastina, azelastina, levocabastina, olopatadina, cromoglicato, nedocromilo, un fármaco antiinflamatorio no esteroideo (AINE) o un fármaco antiinflamatorio esteroideo, por ejemplo cortisona, hidrocortisona (o cortisol), acetato de cortisona, prednisona, prednisolona, metilprednisolona, dexametasona, betametasona, triamicinolona, beclometasona, fludrocortisona, acetato de deoxicorticosterona o aldosterona. De acuerdo con una realización preferida adicional, las moléculas o sales de acuerdo con la invención se utilizan junto con un agente de desensibilización alérgica (o vacunación antialérgica), es decir, un tratamiento basado en dosis crecientes regulares de un alérgeno. De acuerdo con una realización particular, la molécula de acuerdo con la invención no se utiliza junto con un agonista del receptor de glucocorticoides.

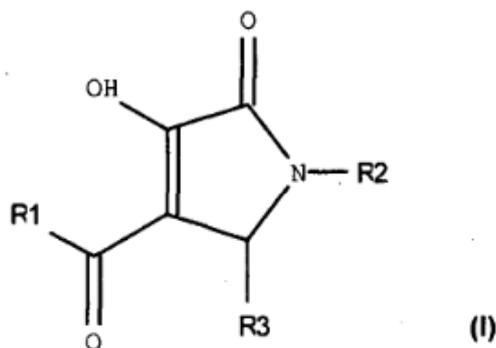
las moléculas o sales de acuerdo con la invención se pueden administrar por cualquier vía de administración, especialmente la vía oral, sublingual, nasal, ocular, local, intravenosa, intraperitoneal, rutas subcutáneas, mediante aerosol o mediante inhalación.

las moléculas o sales de acuerdo con la invención se pueden administrar especialmente a pacientes humanos, niños o recién nacidos. las moléculas o sales de acuerdo con la invención se pueden administrar también a pacientes animales, especialmente mamíferos tales como perros, gatos, ratas, ratones.

En particular, las moléculas o sales de acuerdo con la invención se administran a un paciente humano a dosis determinadas especialmente sobre la base de la dolencia del paciente, sus antecedentes médicos y su edad, por ejemplo, dosis comprendidas entre 0,1 mg/kg y 200 mg/kg.

La presente invención también se refiere a un método terapéutico para el tratamiento o la prevención de una dolencia dependiente de una ruta metabólica que implica Syk en un paciente humano o animal que comprende la administración de una molécula de acuerdo con la invención al paciente en dosis, intervalos y periodos determinados especialmente sobre la base de la dolencia del paciente, sus antecedentes médicos y su edad.

Las moléculas o sales de acuerdo con la invención se seleccionan entre todas las moléculas que consisten en C-13, moléculas con números 1 a 87 presentadas en la tabla nº 1 y las moléculas que tienen cualquiera de las siguientes fórmulas (I), (II), (III) o (IV):

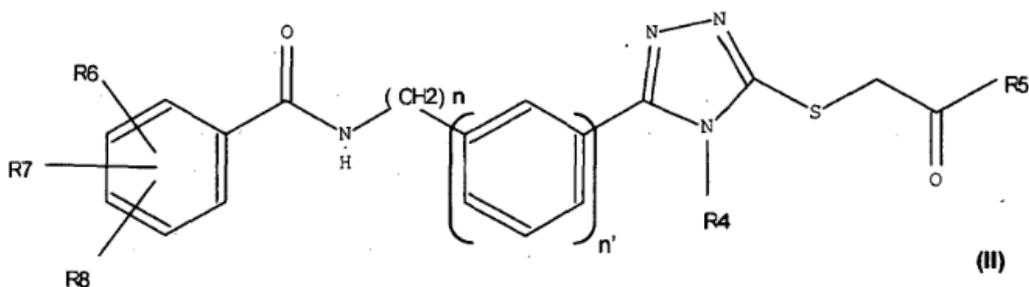


en la que

- R1 es un grupo aromático sustituido o no sustituido, o un heterociclo sustituido o no sustituido que comprende al

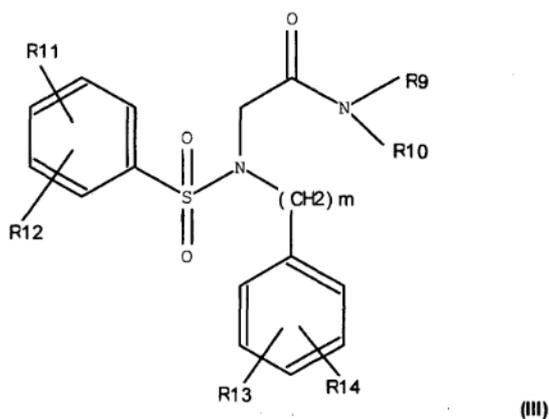
menos un átomo de S, O o N;

- R2 es un grupo aromático sustituido o no sustituido, un heterociclo sustituido o no sustituido, una cadena de carbono opcionalmente saturada, que comprende un grupo amino, una cadena de carbono opcionalmente saturada que comprende un grupo aromático sustituido o no sustituido o una cadena de carbono opcionalmente saturada que comprende un heterociclo sustituido o no sustituido que comprende al menos un átomo de S, O o N;
- R3 es un grupo fenilo, 2-piridinilo, 3-piridinilo o 4-piridinilo sustituido o no sustituido;



en la que

- $n=0$  o  $1$ ;  $n'=0$  o  $1$ ;
- R4 es una cadena de carbono opcionalmente saturada que comprende de 1 a 5 átomos de carbono, opcionalmente sustituida con un grupo aromático;
- R5 es un grupo aromático sustituido o no sustituido o un grupo amino sustituido o no sustituido;
- R6 es un átomo de hidrógeno, grupo alcoxi, grupo alquilo o halógeno;
- R7 es un átomo de hidrógeno, grupo alcoxi, grupo alquilo o halógeno;
- R8 es un átomo de hidrógeno, grupo alcoxi, grupo alquilo o halógeno;

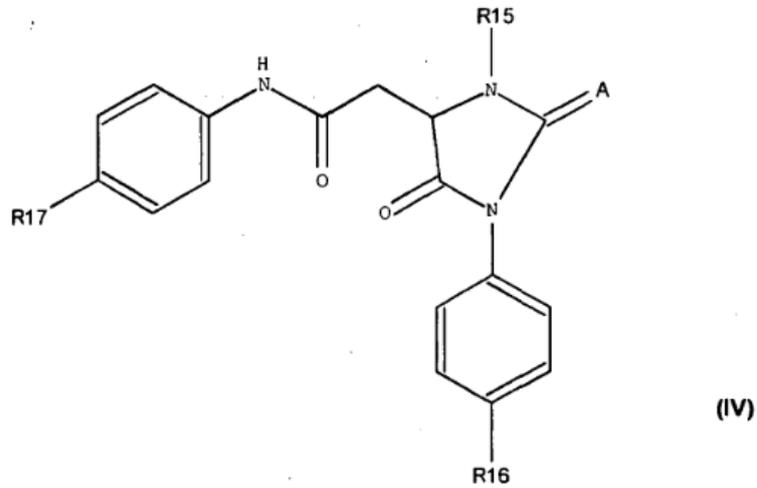


en la que

- $m = 0, 1$  o  $2$ ;
- R9 es un átomo de hidrógeno y R10 es un grupo fenilo sustituido o no sustituido, o R9 y R10 forman parte del mismo heterociclo sustituido o no sustituido, o R9 y R10 forman parte del mismo grupo aromático sustituido o no sustituido;
- R11 es un átomo de hidrógeno, grupo alcoxi o grupo alquilo;
- R12 es un átomo de hidrógeno, grupo alcoxi o grupo alquilo;

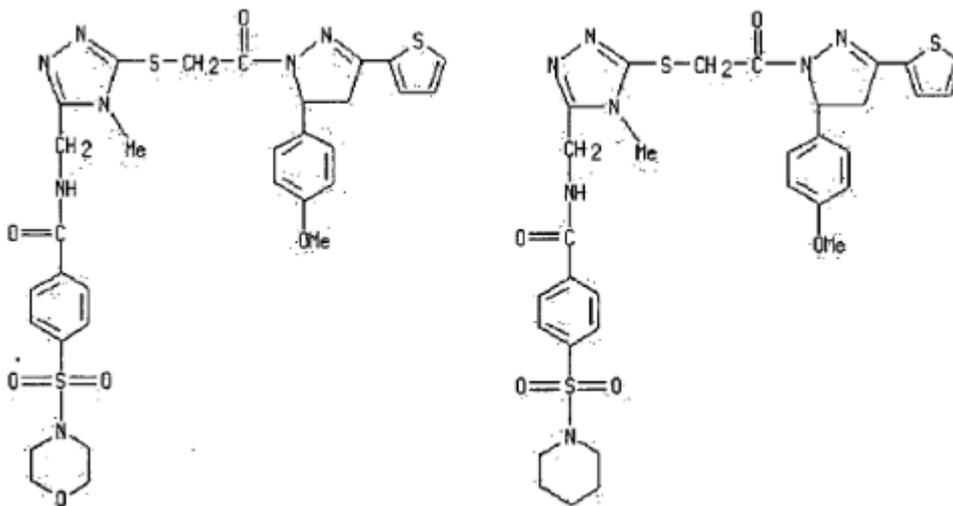
- R13 es un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo o alcoxi;
- R14 es un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo o alcoxi;

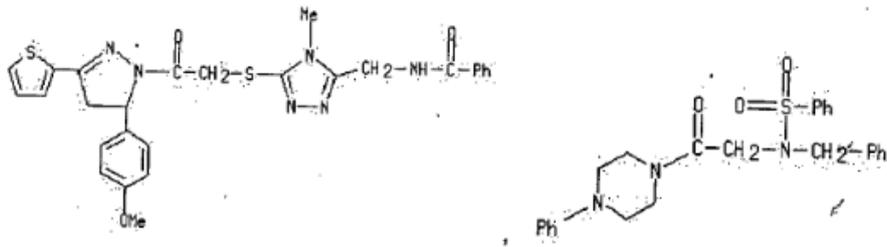
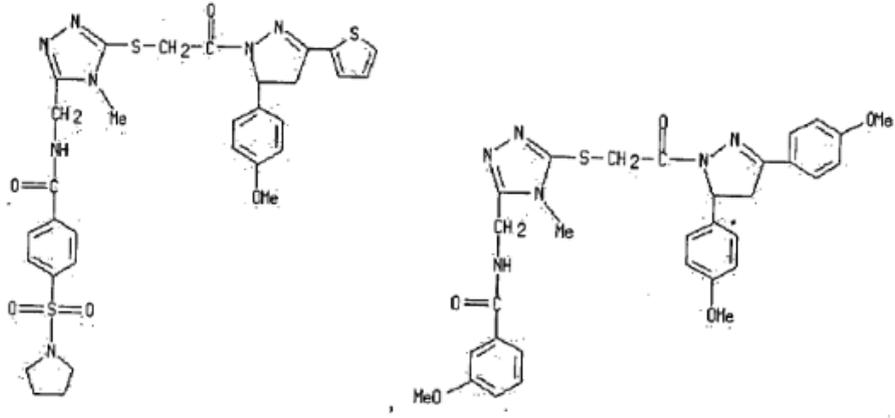
5



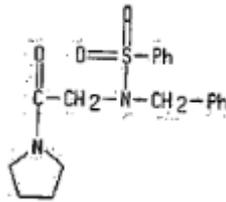
en las que

- 10 - A es un átomo de oxígeno o de azufre;
- R15 es una cadena de carbono opcionalmente saturada que comprende de 1, 2 o 3 átomos de carbono, sustituido o no sustituido por un grupo aromático sustituido o no sustituido, un heterociclo sustituido o no sustituido o un grupo amino que pertenece a un heterociclo sustituido o no sustituido;
- 15 - R16 es un átomo de hidrógeno, halógeno o grupo alcoxi;
- R17 es un átomo de hidrógeno, grupo alcoxi o grupo acetoxi.
- 20 o cuando dicha molécula se selecciona entre las moléculas de las siguientes fórmulas





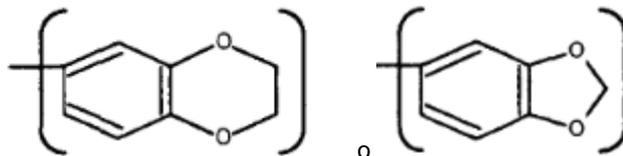
y



5 no se utiliza junto con un agonista del receptor de glucocorticoides.

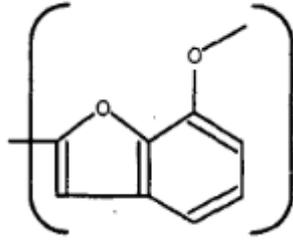
De acuerdo con una realización particular, el grupo R1 de moléculas que tienen la fórmula (I) se selecciona entre los siguientes grupos:

- 10
- un grupo fenilo, sustituido o no sustituido por un átomo de F o Cl, un grupo metilo o etilo, una N,N-dimetilsulfonamida o dos grupos seleccionados entre grupos metilo, etilo, hidroxilo, metoxi o etoxi,
  - un grupo

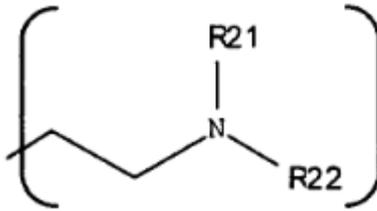


15

o

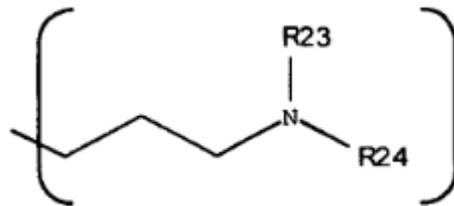


- o un grupo furano sustituido o no sustituido por un grupo metilo, etilo, hidroxilo, metoxi o etoxi,
- 5
- o un grupo tiofeno sustituido o no sustituido por un grupo metilo, etilo, hidroxilo, metoxi o etoxi; el grupo R2 de moléculas que tienen la fórmula (I) se selecciona entre los siguientes grupos:
  - o un grupo



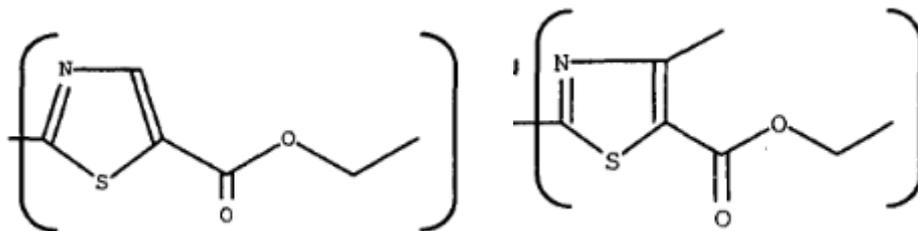
- 10
- en la que R21 y R22 son átomos de carbono, perteneciendo cada uno de ellos a una cadena de alquilo que comprende 1, 2 o 3 átomos de carbono, o perteneciendo ambos, junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos, al mismo heterociclo sustituido o no sustituido que comprende también un átomo de oxígeno o un segundo átomo de nitrógeno,
- 15

- o un grupo



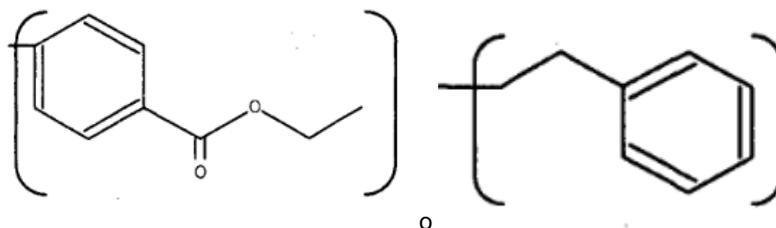
- 20
- en la que R23 y R24 son átomos de carbono, perteneciendo cada uno de ellos a una cadena de alquilo que comprende 1, 2 o 3 átomos de carbono, o perteneciendo ambos, junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos, al mismo heterociclo sustituido o no sustituido que comprende también un átomo de oxígeno o un segundo átomo de nitrógeno,
- 25

- o un grupo



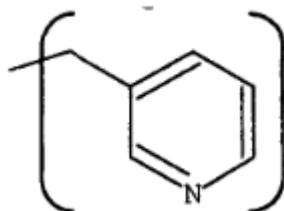
o

- 30
- o



o

5

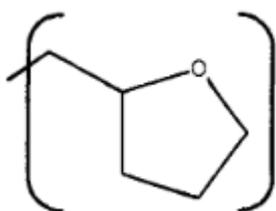


el grupo R3 de moléculas que tienen las fórmulas (I) se selecciona entre los siguientes grupos:

- 10
- o un grupo 2-piridinilo, 3-piridinilo o 4-piridinilo no sustituido,
  - o un grupo fenilo sustituido o no sustituido con un grupo benzoxi, y/o mediante un grupo hidroxilo, y/o mediante un grupo metilo, y/o mediante un grupo etilo, y/o mediante un grupo propilo, y/o mediante uno o dos átomos de Br, F o Cl, y/o mediante de uno a tres grupos hidroxilo, metoxi o etoxi.

15 De acuerdo con una realización particular, cuando el grupo R3 de moléculas que tiene la fórmula (I) es un grupo fenilo, el grupo R2 de moléculas que tiene la fórmula (I) no es un grupo aromático o un heterociclo.

20 De acuerdo con una realización particular, el grupo R4 de moléculas que tienen la fórmula (II) es una cadena de carbono opcionalmente sustituida que comprende 1, 2 o 3 átomos de carbono; el grupo R5 es un grupo fenilo o un grupo amino secundario sustituido por un grupo fenilo sustituido o no sustituido, o mediante un grupo



25 el grupo R6 de moléculas que tiene la fórmula (II) es un átomo de hidrógeno o de cloro o un grupo metilo, etilo, hidroxilo, metoxi o etoxi; el grupo R7 de moléculas que tiene la fórmula (II) es un átomo de hidrógeno o de cloro o un grupo metilo, etilo, hidroxilo, metoxi o etoxi; y el grupo R8 de moléculas que tiene la fórmula (II) es un átomo de hidrógeno o de cloro o un grupo metilo, etilo, hidroxilo, metoxi o etoxi.

30 De acuerdo con una realización particular,

– el grupo R9 de moléculas que tiene la fórmula (III) es un átomo de hidrógeno y el grupo R10 es un grupo fenilo sustituido o no sustituido, o los grupos R9 y R10 pertenecen al mismo heterociclo sustituido o no sustituido que comprende dos átomos de nitrógeno y 4 átomos de carbono;

35 – el grupo R11 de moléculas que tiene la fórmula (III) es un átomo de hidrógeno o un grupo metilo, etilo, hidroxilo, metoxi o etoxi;

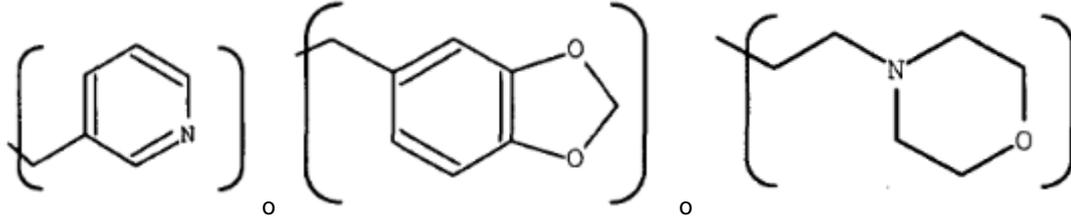
40 – el grupo R12 de moléculas que tiene la fórmula (III) es un átomo de hidrógeno o un grupo metilo, etilo, hidroxilo, metoxi o etoxi;

– el grupo R13 de moléculas que tiene la fórmula (III) es un átomo de hidrógeno o un grupo metilo, etilo, hidroxilo, metoxi o etoxi;

– y el grupo R14 de moléculas que tiene la fórmula (III) es un átomo de hidrógeno o un grupo metilo, etilo, hidroxilo, metoxi o etoxi.

De acuerdo con una realización particular adicional, el grupo R15 de moléculas que tiene la fórmula (IV) es un grupo

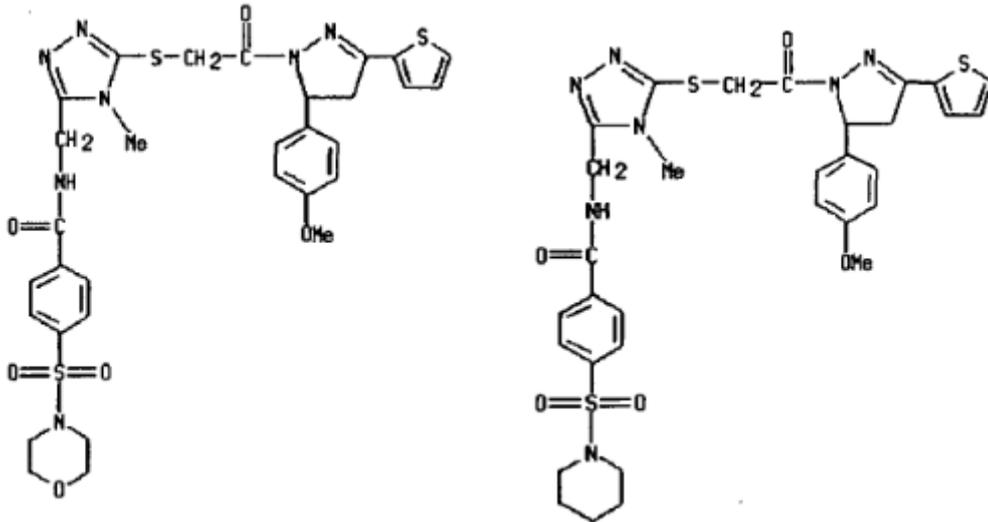
5



el grupo R16 de moléculas que tiene la fórmula (IV) es un átomo de hidrógeno o de cloro o un grupo metilo, etilo, hidroxilo, metoxi o etoxi y el grupo R17 de moléculas que tiene la fórmula (IV) es un grupo metilo, etilo, hidroxilo, metoxi, etoxi, acetoxi, metoxicarbonilo o etoxicarbonilo.

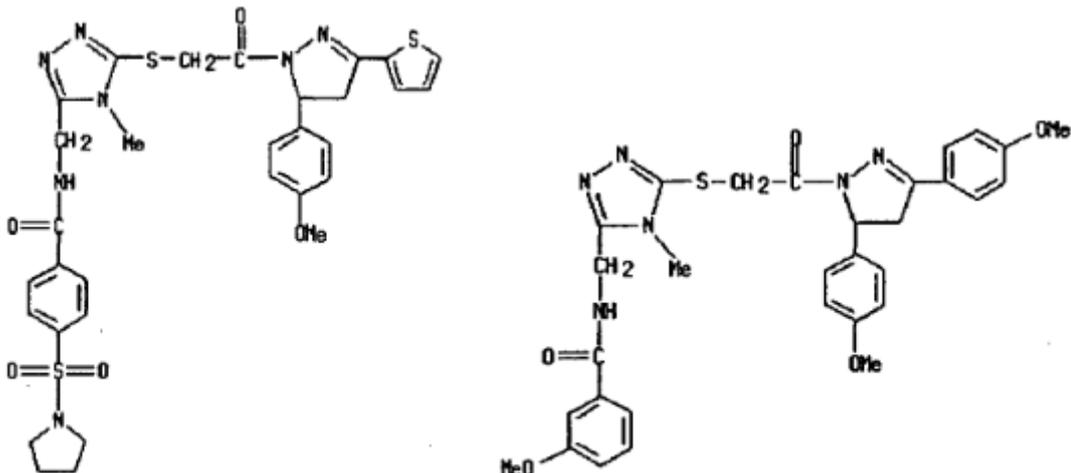
10

De acuerdo con una realización particular, la molécula de acuerdo con la invención no es



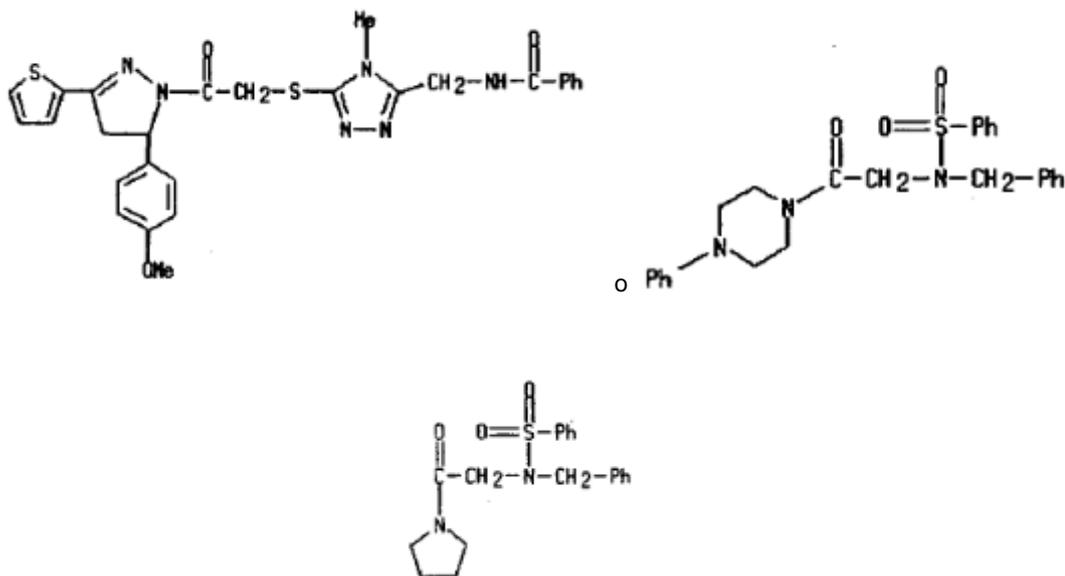
15

o



20

o



5 La expresión cadena de carbono se refiere a una cadena orgánica que tiene átomos de carbono adyacentes en una formación que puede ser lineal o cíclica, ramificada o no ramificada, unida mediante enlaces covalentes, como una red de las anteriores. Una cadena de carbono de acuerdo con la presente invención puede ser por ejemplo una

10 formación de cadena lineal de uno a veinte, preferentemente de 1 a 12, 1 a 10, 1 a 6, 1 a 5 o 1 a 4 átomos de carbono. En particular, puede consistir en un grupo alquilo, es decir, derivado de un alcano (molécula de hidrocarburo saturado lineal o ramificado) debido a la pérdida de un átomo de hidrógeno, por ejemplo un grupo metilo, un grupo etilo, un grupo propilo lineal o ramificado o un grupo butilo lineal o ramificado o una cadena de hidrocarburo insaturado lineal o ramificado, por ejemplo, un grupo etenilo o etinilo. Se entiende que los electrones de la capa exterior (4 en número) de cada átomo de carbono que forma la red de la cadena de carbono no está

15 implicado en un enlace covalente con otro átomo de carbono o con un heteroátomo, participan en un enlace covalente con un átomo de hidrógeno.

El término heteroátomo se refiere a un átomo diferente de carbono o hidrógeno, por ejemplo oxígeno, nitrógeno, azufre, fósforo o halógenos.

20 El término grupo aromático o arilo se refiere a un sistema cíclico insaturado que cumple la regla de aromaticidad de Hückel. Por ejemplo, puede consistir en un grupo fenilo (grupo derivado de un núcleo de benceno).

25 El término heterociclo se refiere a un sistema cíclico en el que uno o una pluralidad de átomos de carbono está sustituida por un heteroátomo tal como, por ejemplo, oxígeno, nitrógeno o azufre. En particular, puede consistir en heterociclos aromáticos, tales como pirrol, tiofeno, furano y piridina, o de heterociclos saturados, tales como azúcares, u osas. Por ejemplo, un heterociclo de acuerdo con la invención comprende de 2 a 8 átomos de carbono y de 1 a 4 heteroátomos, preferentemente comprende 2, 3, 4 o 5 átomos de carbono y 1, 2, 3 o 4 heteroátomos.

30 Cada átomo que pertenece a una cadena de carbono, grupo aromático, ciclo o heterociclo de acuerdo con la presente invención puede estar sustituido mediante un enlace covalente mediante uno o una pluralidad de halógenos, por ejemplo flúor, cloro, yodo o bromo, y/o mediante uno o una pluralidad de grupos orgánicos, por ejemplo uno o una pluralidad de grupos aromáticos (tales como un grupo fenilo), cíclico, heterocíclico (tal como un grupo furano o tiofeno), alquilo (tales como un grupo metilo, grupo etilo, grupo propilo lineal o ramificado o un grupo butilo ramificado), grupos alcoxi (tal como un grupo metoxi (OCH<sub>3</sub>) o etoxi (OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)), carboxilo (tal como un grupo carboxi (COON)), carbonilo (tal como un grupo acetoxi (OCOCH<sub>3</sub>) o metoxicarbonilo (COOCH<sub>3</sub>) o etoxicarbonilo (COOCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)), amina primaria, secundaria o terciaria, amida (tal como un grupo acetamida) o sulfonamida (tal como un grupo N,N-dimetil-sulfonamida). Se entiende que un ciclo o heterociclo saturado, insaturado o cíclico aromático puede estar fusionado con otro ciclo, por ejemplo mediante un enlace simple o doble entre dos átomos de

35 carbono.

La presente invención también se refiere a una composición farmacéutica que comprende una molécula de acuerdo con la invención y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

45 De acuerdo con una realización, la composición farmacéutica de acuerdo con la invención también comprende una molécula terapéutica adicional. Por ejemplo, puede consistir en una molécula terapéutica también utilizada en la prevención o el tratamiento de una dolencia dependiente de una ruta metabólica que implica a Syk o, por otra parte,

una molécula terapéutica utilizada en la prevención o el tratamiento de una dolencia no dependiente de una ruta metabólica que implica a Syk. De acuerdo con una realización particular, la composición farmacéutica de acuerdo con la invención no comprende un agonista del receptor de glucocorticoides.

5 De acuerdo con una realización particular adicional, la composición farmacéutica de acuerdo con la invención se puede usar junto con una o una pluralidad de composiciones farmacéuticas adicionales. Por ejemplo, puede tratarse de composiciones farmacéuticas también utilizadas en la prevención o el tratamiento de una dolencia dependiente de una ruta metabólica que implica a Syk o, por otra parte, composiciones farmacéuticas utilizadas en la prevención o el tratamiento de una dolencia no dependiente de una ruta metabólica que implica a Syk. De acuerdo con esta  
10 realización, la composición farmacéutica de acuerdo con la invención y la composición o composiciones farmacéuticas adicionales se pueden administrar de forma simultánea o de forma alternativa, por la misma vía de administración o por diferentes vías. De acuerdo con una realización particular, la composición farmacéutica de acuerdo con la invención no se utiliza junto con un agonista del receptor de glucocorticoides.

15 La presente invención también se refiere a un método para identificar una molécula orgánica que tiene un peso molecular comprendido entre 50 y 2500 Dalton que se une a la proteína tirosina quinasa Syk and y puede inhibir en al menos un 5 %, preferentemente al menos un 10 %, por ejemplo al menos un 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80 u 85 % *in vitro* la unión de (I) un fragmento de anticuerpo G4G11 (SED ID N° 2), o (II) un fragmento de anticuerpo G4E4 (SED ID N° 3), o (III) un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se une a la tirosina quinasa Syk  
20 humana en un epítipo que comprende al menos uno de los restos 65 a 74 de la secuencia de aminoácidos de la proteína tirosina quinasa Syk humana representada por la SEC ID N° 1, o (IV) un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se une con la proteína tirosina quinasa Syk humana e inhibe en al menos un 10 % la unión de los fragmentos de anticuerpo G4G11 o G4E4 con la proteína tirosina quinasa Syk humana (SEC ID N° 1), a la proteína tirosina quinasa Syk humana o con cualquiera de sus variantes en animales, que comprende al menos las siguientes etapas:  
25

a) cribado, a partir de un biblioteca de moléculas orgánicas candidatas que tienen un peso molecular comprendido entre 50 y 2500 Da, de las que tengan posibilidades de unirse a la proteína Syk en la cavidad de unión tridimensional de la proteína Syk seleccionada entre las moléculas que tienen la fórmula C-13, I, II, III, IV o  
30 1 a 87 tal como se ha indicado anteriormente;

b) seleccionándose entre las moléculas identificadas en a) las que pueden inhibir al menos un 5 %, preferentemente al menos un 10 %, por ejemplo al menos un 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80 u 85 % *in vitro* la unión del anticuerpo o fragmento de anticuerpo (I), (II), (III) o (IV) con la proteína Syk.  
35

De acuerdo con una realización especialmente preferida, la molécula de la etapa a) seleccionada entre las moléculas que tienen la fórmula C-13, I, II, III, IV o 1 a 87 es la molécula C-13, la molécula (59) o la molécula (51).

De acuerdo con una realización preferida, el método de acuerdo con la invención comprende una etapa adicional antes de la etapa a) para identificar la cavidad de unión tridimensional de la proteína Syk de la molécula seleccionada entre las moléculas que tienen la fórmula C-13, I, II, III, IV o 1 a 87. Esta etapa anterior se puede llevar a cabo especialmente mediante “*anclaje in silico*”.  
40

La expresión “*anclaje in silico*” o “anclaje molecular” o “anclaje virtual” se refiere al uso de una herramienta bioinformática para predecir y modelizar la posición de un ligando en una macromolécula. En particular, las herramientas de *anclaje in silico* se pueden utilizar para calcular la probabilidad de que un compuesto químico dado pueda anclarse a una molécula diana activa, por ejemplo en una cavidad de unión tridimensional anteriormente identificada.  
45

De acuerdo con una realización preferida, el método de acuerdo con la invención comprende una etapa adicional c) para seleccionar entre las moléculas identificadas en b) aquellas que pueden inhibir en un 50 % *in vitro* la desgranulación de los mastocitos a una concentración (CI50) comprendida entre 1 ng/ml y 1 mg/ml, por ejemplo a una concentración comprendida entre 1 ng/ml y 500 µg/ml, entre 1 ng/ml y 250 µg/ml, entre 1 ng/ml y 100 µg/ml, entre 1 ng/ml y 50 µg/ml, entre 1 ng/ml y 10 µg/ml, entre 1 ng/ml y 5 µg/ml o entre 1 ng/ml y 2 µg/ml.  
50

De acuerdo con una realización especialmente preferida de los usos y métodos descritos anteriormente, la molécula de acuerdo con la invención se selecciona entre el grupo que consiste en la molécula C-13 y las moléculas número 1 a 87 presentadas en la tabla 1.  
55

Los inventores han identificado estas moléculas en el marco de un proyecto realizado después de un estudio anterior (Dauvillier et al., 20027), en el cual expresaron los fragmentos de anticuerpos scFv (“single chain variable domain”) (o “intracelular antibodies” o “intrabodies”), G4G11 (SED ID N° 2) y G4E4 (SED ID N° 3) en una línea celular de mastocitos. Este estudio demostró los efectos inhibidores de estos “intracelular antibodies” o “intrabodies” sobre la liberación de mediadores alérgicos inducidos mediante la estimulación con FcεRI sobre la membrana de los mastocitos. Los fragmentos de anticuerpos scFv, G4G11 y G4E4, se aislaron a partir de una biblioteca combinatoria cribada mediante una proteína recombinante que contenía los dominios SH2 de Syk y una región A interdominio que  
60  
65

separa los anteriores, es decir, una parte de la proteína Syk que no comprende el dominio quinasa de Syk<sup>8</sup>.

El método ADA (“antibody displacement assay”) es un método desarrollado por los inventores y descrito en el documento WO2005106481, especialmente para identificar un ligando que puede modular de forma selectiva una cascada funcional que implica una diana, que comprende una primera etapa para identificar un anticuerpo intracelular que puede unirse con la diana y modular la cascada funcional en cuestión, una segunda etapa para cribar, a partir de una biblioteca de moléculas orgánicas pequeñas, ligandos que modulen la unión entre la diana y el anticuerpo intracelular que potencialmente se realizarán *in vitro* en un ensayo extracelular, y una tercera etapa para identificar, entre los ligandos obtenidos en la etapa 2, aquellos capaces de modular la cascada funcional en la célula.

Los inventores sugirieron la teoría por la cual los fragmentos de anticuerpo G4G11 y G4E4 se unen a una región de Syk que interactúa con uno o más ligandos esenciales de la cascada funcional que da lugar a la desgranulación. Teniendo en cuenta los límites de uso de los anticuerpos intracelulares en tratamientos, tales como la transferencia eficaz del gen que codifica el anticuerpo en las células diana<sup>9</sup>, los inventores deseaban aislar moléculas orgánicas que actuaran como miméticos funcionales del anticuerpo G4G11 y adecuados para un uso más sencillo en tratamientos. Con este fin, utilizaron el método ADA para cribar una biblioteca de 3000 moléculas orgánicas pequeñas e identificar los posibles inhibidores de la respuesta alérgica.

Entre las 3000 moléculas orgánicas pequeñas ensayadas, los inventores identificaron la molécula pequeña C-13 (2-{5-[(3-bencil-4-oxo-2-tioxo-1,3-tiazolidin-5-ilideno)metil]-2-furil}benzoato de metilo) y demostraron su capacidad para modular la interacción entre el fragmento de anticuerpo G4G11 o G4E4 con Syk *in vitro* e inhibir la desgranulación de mastocitos inducida por FcεRI *in vitro*.

Los inventores demostraron especialmente el hecho de que el compuesto C-13 inhibe el choque anafiláctico cuando se administra por vía oral y tiene propiedades antialérgicas prometedoras, que ilustran las importantes posibilidades terapéuticas de los productos medicinales candidatos aislados usando el enfoque descrito en el presente documento.

Los inventores también demostraron el hecho de que C-13 se une con Syk en una cavidad recientemente identificada situada entre ambos dominios SH2 y el interdominio A de Syk (Figura 1). La cavidad de unión de C-13 conforma una zona de interacción única que es específica de Syk, y no se corresponde con un sitio de unión conocido de ligandos fisiológicos de Syk tales como el péptido ITAM doblemente fosforilado sobre los restos tirosina (Figura 1A). Los resultados obtenidos sugieren que C-13 inhibe la interacción de Syk con algunos de los sustratos moleculares de la misma, tanto directamente, porque C-13 ocupa una superficie sobre la que un ligando de Syk establecería un contacto directo, y/o mediante un efecto alostérico.

Los estudios bioquímicos realizados sobre mastocitos demuestran, por tanto, que C-13 inhibe la fosforilación de SLP-76 dependiente de FcεRI sobre los restos tirosina, lo que contribuye a la función de adaptación de la misma para la unión y/o la estabilización de Btk, PLC-γ y Vav en el complejo de señalización macromolecular formado con LAT<sup>22, 28-30</sup> (Figura 2). Esto afecta la fosforilación y la actividad catalítica de Btk y la renovación de PLC-γ cerca de Syk y/o Btk para su fosforilación completa, que es necesaria para mantener el flujo de calcio y la exocitosis<sup>21-35</sup>. De hecho, C-13 inhibió las respuestas de mastocitos tempranas (liberación de β-hexosaminidasa) y retardada (secreción de TNF-α) inducidas por la agregación en los receptores FcεRI con un valor estimado de la CI50 de 2 μM (Figura 3).

De forma significativa, la administración oral de una sola dosis de C-13 inhibió la anafilaxia pasiva sistémica (PSA, por sus siglas en inglés) inducida por IgE con un valor estimado de la CI50 de 110 mg/kg (Figura 4), lo que confirma las prometedoras propiedades antialérgicas de este compuesto. Por el contrario, una única administración oral de 100 mg/kg de C-13 no alteró el reclutamiento de neutrófilos dependiente de Syk inducido por tioglicolato en la cavidad peritoneal en presencia de la toxina de *Bordetella pertussis* (Figura 5A). Además, los inventores demostraron que, a pesar del hecho que la proliferación de linfocitos B dependiente de BCR *in vitro* se inhibía por C-13 de una forma dependiente de la dosis (Figura 5B), las respuestas de anticuerpo de los ratones inmunizados con un antígeno dependiente del timo no se vieron alteradas por la administración oral de 150 mg/kg de C-13 (Figura 5C). Por tanto, la molécula C-13 no afecta algunas respuestas dependientes de Syk pero no dependientes de los mastocitos *in vivo* en dosis y periodos de administración que son adecuadas para inhibir una respuesta alérgica intensa.

Teniendo en cuenta la falta de efecto tóxico aparente después de la administración oral o local de C-13 durante un periodo comprendido entre una hora y 12 días, C-13 se puede considerar con el primer miembro potencial de una nueva familia de inhibidores de Syk adecuados para su administración por vía oral que tienen un efecto antiinflamatorio. El enfoque de cribado de moléculas farmacéuticas descrito en el presente documento representa una plataforma genérica, en la que el uso inicial de anticuerpos posibilita la detección de dominios en la molécula diana que tienen potencial terapéutico, facilitando de esta forma el diseño de moléculas química (mediante cribado *in silico* y/o *in vitro* que puedan actuar como miméticos de anticuerpos funcionales y potenciales inhibidores de la interacción entre proteínas. Además, los inventores demostraron que estas moléculas pequeñas pueden inducir la respuesta deseada en modelos celulares y de animales, respaldando el concepto en apoyo de la sustitución de

macromoléculas de gran tamaño que son difíciles de administrar por moléculas orgánicas pequeñas adecuadas para su administración por vía oral.

El posible sitio de unión a Syk se predijo *in silico*, guiándose por la ubicación del epítipo de G4G11. Se identificó de esta forma una cavidad candidata situada cerca del epítipo de G4G11, en la interfase situada entre los dos dominios SH2 y el aglutinante intradominio de Syk y que comprende los restos Ser 9, Gln 43, Phe 51, Ile 66, Glu 67, Arg 68, Glu 69, Leu 70, Asn 71, Gly 72, Thr 73, Tyr 74, Ala 75, Glu 121 y Glu 155 (Figura 1C). Los experimentos de mutagénesis dirigida confirmaron que los restos Arg 68, Glu 121 y Glu 155 de la proteína Syk humana (SED ID N° 1) tienen un papel fundamental en la interacción con C-13, suprimiendo la mutación de dichos restos la inhibición producida por C-13, mientras que se mantuvo la unión de scFv G4G11 (Figs. 1A, 1C). Estos resultados parecen confirmar la teoría por la que la cavidad de unión de C-13 o Syk está situada cerca del sitio de unión del intracuerpo G4G11.

Los inventores realizaron después un *anclaje* virtual en una biblioteca de moléculas para identificar moléculas candidatas que tuvieran las mejores propiedades de unión a dicha cavidad tridimensional, y sometieron a ensayo la capacidad de dichas moléculas candidatas para inhibir la unión de scFv G4G11 a Syk. Estas moléculas se proporcionan en la [tabla 1](#) (véase el ejemplo 2). También se sometió a ensayo la capacidad de estas moléculas para inhibir la desgranulación de mastocitos *in vitro*. Con las moléculas número 59 y 61 en particular, la concentración que inhibe la desgranulación de los mastocitos en un 50 % *in vitro* es de aproximadamente 5  $\mu$ M (véase la Figura 6).

Los resultados proporcionados en la parte experimental y especialmente en la tabla 1 demuestran que las moléculas o sales de acuerdo con la invención inhiben las reacciones de hipersensibilidad de tipo I, especialmente la desgranulación de mastocitos dependiente de IgE, y también pueden interferir *in vivo* con la anafilaxia pasiva cutánea y sistémica en ratones BALB/c.

#### Breve descripción de las figuras

Figura 1. Unión de C-13 con Syk *in vitro*. A. Estructura química de C-13. Estructura tridimensional prevista y validada para C-13 (o "Compuesto 13") que comprende los restos Ser 9, Gln 43, Phe 51, Arg 68, Glu 121 y Glu 155 (representación en malla); el epítipo G4G11 comprende los restos 65 a 74 de la proteína Syk humana representada por la SED ID N° 1. B. Unión del fragmento scFv G4G11 con Syk medida con el método ADA en presencia de C-13 (■). Unión de C-13 con Syk medida usando espectroscopia de fluorescencia (○) ( $K_d=4,8 \pm 0,2 \mu$ M). C. Unión de G4G11 con Syk mutantes con el método ADA. Inhibición significativa con C-13 comparada con DMF: \*\* $P<0,01$ .

Figura 2. C-13 inhibe la activación de mastocitos inducida por Fc $\epsilon$ R1. A. Las inmunotransferencias realizadas con lisados de células RBL-2H3 se analizaron mediante inmunotransferencias con los anticuerpos específicos. Se examinaron las actividades quinasa *in vitro* de las inmunotransferencia de Syk, Btk y Lyn. B. Los lisados celulares de RBL-2H3 y de C. BMMC se sometieron a electroforesis y las proteínas se analizaron mediante inmunotransferencia. Estos datos son representativos de al menos dos experimentos.

Figura 3. C-13 inhibe la liberación de calcio y la desgranulación dependientes de Fc $\epsilon$ R1. A. Análisis FACS del flujo de calcio dependiente de IgE en células RBL-2H3. B. Liberación de  $\beta$ -hexosaminidasa en células RBL-2H3 sensibilizadas con IgE/DNP. C. Liberación de  $\beta$ -hexosaminidasa y, D. Titulación de TNF- $\alpha$  en células BMMC sensibilizadas con IgE/DNP; C-13: 3  $\mu$ M. E. Análisis FACS de la expresión superficial de FC $\epsilon$ R1 en células RBL-2H3. (0=0,25 % DMF). Inhibición significativa con C-13 comparada con DMF: \*\* $P<0,01$  y \* $P<0,05$ .

Figura 4. Estudios *in vivo* en ratones BALB/c. A-C. Respuesta PSA. A. Evolución de la temperatura, B. Cuantificación de la extravasación de azul de Evans, C. Fotografía que representa la extravasación de azul de Evans de acuerdo con una administración oral de 130 mg/kg de C-13, un compuesto irrelevante (IR) o el vector (T); Animal no tratado (NT). Las orejas y cola de los ratones que recibieron el compuesto irrelevante (IR) o el vector solo (T) se volvieron de un marcado color azul, los ratones tratados con C-13 se volvieron de color azul claro y los de los ratones no tratados tenían un color normal. D. Respuesta PCA: Cuantificación de la extravasación de azul de Evans. Inhibición significativa con C-13 comparada con un compuesto irrelevante: \*\* $P<0,01$ ; comparado con e vehículo +DNP-KLH: \* $P<0,05$ .

Figura 5. Efectos *in vivo* e *in vitro* de C-13 sobre los neutrófilos y los linfocitos B. A. Reclutamiento de neutrófilos en la cavidad peritoneal tras inyectar tioglicolato o el vehículo en presencia de la toxina de *Bordetella Pertussis* (donde se especifica) (n=4). B. Proliferación de linfocitos B *in vitro* inducida por anti-IgM. C. Concentración de inmunoglobulina sérica 12 días después de la inmunización con TNP-KLH (n=4).

Figura 6. Efecto de las moléculas número 59 (ref. Chembridge 7501888) y 61 (ref. Chembridge 7722851) sobre la desgranulación de células RBL-2H3. El nivel de liberación de  $\beta$ -hexosaminidasa en las células RBL-2H3 sensibilizadas con IgE/DNP se determinó en presencia A. de la molécula n° 59 y B. de la molécula n° 61 a concentraciones comprendidas entre 0 y 40  $\mu$ M.

Figura 7. Secuencias de aminoácidos de los intracuerpos scFv A. G4G11 (SED ID N° 2) y B. G4E4 (SED ID N° 3).

Figura 8. Secuencia de aminoácidos de la proteína Syk humana. A. (SEC ID N° 1) que corresponde al n° de acceso NP—003168 (NCBI) y B. proteína Syk de murino que corresponde al n° de acceso NP—035648 (NCBI). Los restos que se identificaron como parte de la cavidad de unión tridimensional de C-13 a la proteína Syk humana (A) y su equivalente en la proteína Syk de murino (B) se muestran en **negrita y subrayado**.

Figura 9. Representación esquemática de las rutas metabólicas que implican la tirosina quinasa Syk en mastocitos.

Figura 10. Ensayo de toxicidad de C-13 sobre células BMMC. Las células BMMC se incubaron a 37 °C. en presencia de 2,5 µM o 5 µM de C-13, 0,25 % DMF o estaurosporina. El porcentaje de células BMMC vivas después de 3 horas y después de 5 días se detectaron mediante un marcado doble con Anexina V y yoduro de propidio. La viabilidad de las células BMMC incubadas en presencia de 2,5 µM o 5 µM de C-13 o 0,25 % DMF no se vio afectada de forma notable después de 3 horas (78 %, 74 % y 79 % respectivamente) o cinco días (62, 56 y 57 %, respectivamente). Por otra parte, la viabilidad de las células BMMC tratadas en las mismas condiciones con estaurosporina se redujo a un nivel del 16 % después de solamente 3 horas.

## Ejemplos

### Ejemplo 1 Identificación de la molécula C-13 potencialmente adecuada para su administración oral para evitar el choque anafiláctico

#### 1) Identificación del Compuesto 13 (C-13) y de su cavidad de unión en Syk

Los inventores desarrollaron el método ADA (Antigen Displacement Assay) para identificar moléculas pequeñas que puedan desplazar la asociación con scFv G4G11 con Syk. De los elementos de una biblioteca de 3000 moléculas químicas, 15 moléculas pequeñas mostraron poder competir con la unión de scFv G4G11 a Syk y, de estos compuestos, los citados a partir de ahora en el presente documento como C-13 (Figura 1A) mostraron el mejor potencial de inhibición con un valor estimado de la CI50 de 4 µM (Figura 1B). Este resultado está de acuerdo con el valor de la constante de disociación (o Kd) igual a 4,8 µM obtenida por medición mediante espectroscopía de fluorescencia (o espectrofluorometría) de la afinidad *in vitro* de C-13 por Syk (Figure 1B). Para comprender el modo de acción de C-13, los inventores identificaron en primer lugar el sitio de unión de G4G11 usando el método SPOT<sup>16</sup>. Se identificó un epítipo situado en el extremo N del dominio SH2 de Syk, que comprende los aminoácidos 65-74 y conservado al 100 % en secuencias de ratón, rata y ser humano.

Sobre la base de esta información, y la estructura tridimensional conocida del complejo peptídico formado mediante los dominios SH2 de Syk y los motivos ITAM<sup>17</sup>, los inventores utilizaron soluciones informáticas para localizar un posible sitio de unión para C-13. Se identificó una cavidad candidata que comprende los restos Ser 9, Gln 43, Phe 51, Ile 66, Glu 67, Arg 68, Glu 69, Leu 70, Asn 71, Gly 72, Thr 73, Tyr 74, Ala 75, Glu 121 y Glu 155 de la proteína Syk humana (véase la Figura 8A, SEC ID N° 1) y situada cerca del epítipo de G4G11 (Figura 1C). Un análisis estructural especificó que los restos Ser 9, Gln 43, Phe 51, Arg 68, Glu 121 y Glu 155 podrían estar implicados en la unión del ligando, y podrían mutarse sin afectar negativamente la estructura tridimensional de la proteína. Para validar más detalladamente esta cavidad, estos seis aminoácidos se mutaron individualmente, y los mutantes Syk se sometieron al ensayo ADA. Los restos Arg 68, Glu 121 y Glu 155 demostraron tener un papel significativo en la interacción con la molécula pequeña, ya que su mutación eliminó la inhibición ocasionada por C-13, mientras que se mantuvo la unión de scFv G4G11 (Figura 1C). Estos datos confirmaron el hecho de que la cavidad de unión de C-13 a Syk está situada cerca del sitio de unión de G4G11.

#### 2) Activación de mastocitos inducida por FcεRI

Para examinar las similitudes funcionales con G4G11, los inventores analizaron los efectos biológicos de C-13 sobre la activación de mastocitos. La incubación de células RBL-2H3 con C-13 no afectó a la fosforilación y la actividad quinasa de Syk inducida por FcεRI (Figura 2A) y, de acuerdo con ello, el nivel global de fosforilación de tirosina de todas las proteínas celulares conocidas por ser esencialmente dependientes de Syk era el normal (Figs. 2B, C). Análogamente al intracuerpo G4G11, C-13 inhibió la fosforilación y la actividad quinasa de Syk inducida por FcεRI de Btk (Figura 2A) y la fosforilación de PLC-γ1 y PLC-γ2, las dos isoformas de PLC-γ expresadas en mastocitos (Figs. 2A, C). PTK Lyn fosforila tanto Syk como Btk, ocasionando su activación completa y la posterior fosforilación de PLC-γ18. Puesto que C-13 no afectó a la activación de Lyn dependiente de FcεRI (Figura 2A), se puede concluir que la reducción en el nivel de fosforilación de Btk y PLC-γ podría ser debida a un defecto en lo que respecta a su ubicación correcta en la cercanía de la PTK anterior.

#### 3) Análisis de la cascada de señalización dependiente de Fyn y Lyn

En mastocitos, la cascada de señalización Fyn/Gab2/PI3K ocasiona la activación de PI3K y la generación de PI-

3,4,5-P3, que recluta numerosas proteínas que contienen un dominio de homología de la pleckstrina (PH), incluyendo Btk y PLC- $\gamma$  en la membrana plasmática<sup>19</sup>. El análisis de la fosforilación de Akt, un marcador de la actividad de PI3K, indicó que C-13 no afectó la cascada dependiente de Fyn (Figs. 2B, C), lo que sugiere que el nivel reducido de la fosforilación de Btk y PLC- $\gamma$  no se debía a un defecto en su localización en la membrana, conocida por ser un factor esencial en el aumento de los flujos de calcio<sup>20</sup>.

El reclutamiento de Btk y PLC- $\gamma$  en la membrana también requiere la cascada de señalización formal Lyn/Syk/LAT/SLP-76. La fosforilación de LAT por Syk ocasiona la translocación de SLP-76 al complejo organizado mediante LAT21, donde SLP-76 se sitúa simultáneamente con Syk22. Esta ubicación permite que Syk fosforile las tirosinas del extremo N de SLP-7623, que se convierten en sitios de unión para Vav, Nck y Btk. LAT y SLP-76 (mediante su dominio rico en prolina que recluta PLC- $\gamma$ ) interactúa para situar a PLC- $\gamma$  en dicho complejo de membrana, permitiendo la fosforilación y la activación de PLC- $\gamma$  mediante Btk24 y/o Syk25. El uso de anticuerpos fosfoespecíficos demostró que C-13 inhibe la fosforilación de SLP-76, pero aumenta la fosforilación de LAT de forma dependiente de la dosis (Figura 2A). Los inventores sugirieron la teoría por la que la inhibición de la fosforilación de SLP-76 podría permitir que una mayor cantidad de LAT interactúe con Syk, ocasionando de esta forma un aumento en su nivel de fosforilación. Estos resultados demuestran que la reducción en la fosforilación de SLP-76 no era debida a un defecto en términos de su reclutamiento hacia LAT, y dio como resultado un defecto de ubicación simultánea de Btk y, en menor medida, el de Vav con SLP-76 (Figura 2A). Sin embargo, no se inhibió la fosforilación de Vav, conocida por ser independiente de su reclutamiento hacia SLP-7628 (Figura 2A).

#### 4) Activación de MAPK

La asociación de SLP-76 con Vav y/o Nck tiene un papel fundamental en la activación óptima de las quinasas MAP en los mastocitos<sup>27</sup>. Los inventores demostraron que C-13 afecta ligeramente la activación de la quinasa MAP (evaluada mediante su nivel de fosforilación): una concentración elevada de C-13 reduce el nivel de fosforilación de ERK1/2, mientras que los niveles de fosforilación de p38 y JNK permanecen normales (Figs. 2B, C).

#### 5) Flujo de calcio y desgranulación

La unión de Btk y Vav a SLP-76 es fundamental para regular la actividad de PLC- $\gamma$  en la membrana, la movilización de calcio y la exocitosis granular<sup>27, 28</sup>. Los inventores demostraron que la asociación de PLC- $\gamma$  con LAT quedaba inhibida por C-13 de forma dependiente de la dosis (Figura 2A). Consistente con el defecto en lo que respecta a la fosforilación de PLC- $\gamma$ 1 y PLC- $\gamma$ 2, los mastocitos mostraron un intervalo reducido en el flujo de calcio en respuesta a la unión de Fc $\epsilon$ RI (Figura 3A), y las respuestas alérgicas temprana y retardada inducidas por Fc $\epsilon$ RI en BMMC ("bone marrow derived mast cell") y en la línea celular RBL-2H3 quedaron también debilitadas de forma dependiente de la dosis, basándose en la medición de la liberación de  $\beta$ -hexosaminidasa y de la secreción de TNF- $\alpha$  (Figs. 3B, C, D). Los resultados también demostraron que C-13 no tiene efectos tóxicos sobre los mastocitos. De hecho, la desgranulación inducida por ionomicina (Figura 3B), o la viabilidad celular en BMMC (véase la Figura 10) no se vio afectada de forma detectable por el tratamiento con C-13. Además, los defectos observados en lo que respecta a la activación de mastocitos no se deben a un nivel reducido de la expresión superficial de Fc $\epsilon$ RI, ya que el análisis mediante citometría de flujo indicó que las células incubadas con C-13 expresan niveles de Fc $\epsilon$ RI similares a las células de control (Figura 3E).

#### 6) Anafilaxia pasiva sistémica (PSA) y cutánea (PCA)

Finalmente, para ampliar estas observaciones a las funciones de los mastocitos *in vivo*, los inventores ensayaron los efectos de C-13 sobre la anafilaxia pasiva sistémica (PSA) y cutánea (PCA) inducida en ratones BALB/c mediante la administración de moléculas de IgE específicas de DNP seguido de estimulación intravenosa con el heptano DNP-KLH. Esto imita la anafilaxia sistémica, como se demuestra por los cambios cardiopulmonares inmediatos y el aumento en la permeabilidad vascular. La intensidad de la anafilaxia sistémica se determinó midiendo tanto la disminución de la temperatura corporal como el aumento en la permeabilidad vascular tras la administración del antígeno. Tras la administración oral de C-13 (y antes de la estimulación con el antígeno), los animales parecían estar sanos, sin signos evidentes de toxicidad. La administración de una única dosis de 100 mg/kg de C-13 inhibió la hipotermia y aceleró la recuperación de los animales (Figura 4A). Sobre la base de la cuantificación de la extravasación del azul de Evans, se determinó que C-13 inhibía el aumento en la permeabilidad vascular con un valor estimado de la CI50 de 110 mg/kg (Figs. 4B y 4C). C-13 también demostró un efecto inhibitorio sobre la PCA en un valor estimado de la CI50 de 25  $\mu$ m (Figura 4D).

#### Ejemplo 2 Identificación usando la cavidad de unión de C-13 de otros inhibidores potenciales de la desgranulación celular

Usando la cavidad de unión identificada en el ejemplo 1-1, se llevó a cabo un anclado virtual en un conjunto de 350.000 moléculas incluidas en la biblioteca de compuestos químicos de ChemBridge Corporation (San Diego, USA) para identificar las 1000 moléculas que presentaban las mejores propiedades de unión en dicha cavidad.

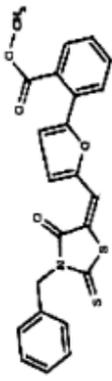
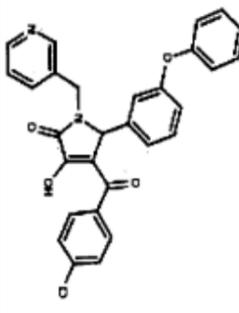
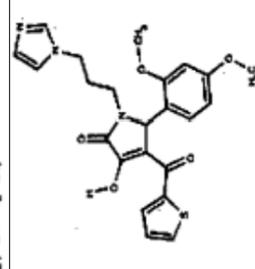
A continuación se aplicó el método ADA a cada una de estas 1000 moléculas para medir su capacidad para inhibir la

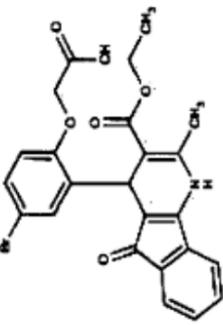
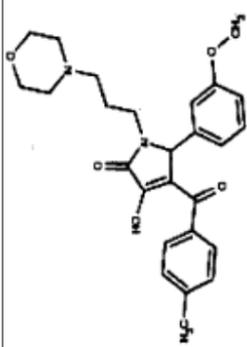
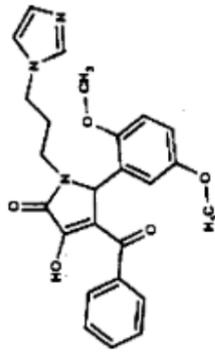
unión de scFv G4G11 a Syk. Las 87 moléculas con la mejor tasa de inhibición (entre 11 y 86,5 %) se proporcionan en la tabla 1.

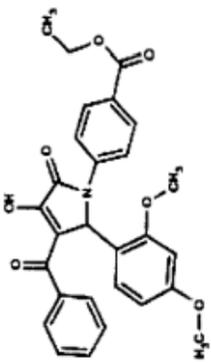
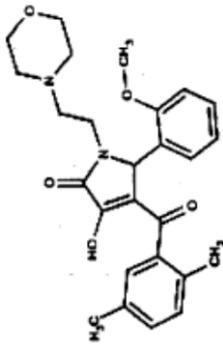
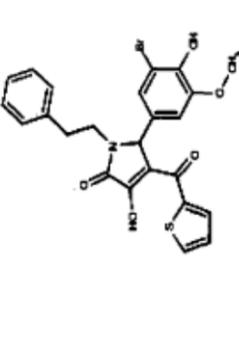
5 Estas 87 moléculas también se sometieron a ensayo *in vitro* para evaluar su capacidad para inhibir la desgranulación de células RBL-2H3 (véase la tabla 1). Las dos moléculas que mostraron el mejor potencial (moléculas nº 59 y 61) se sometieron a ensayo a varias concentraciones en células RBL-2H3 para evaluar más detalladamente la concentración que inhibe la desgranulación en un 50 % (véase Figura 6).

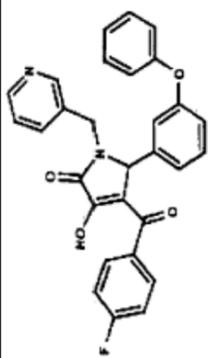
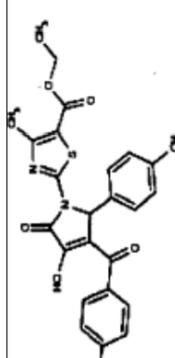
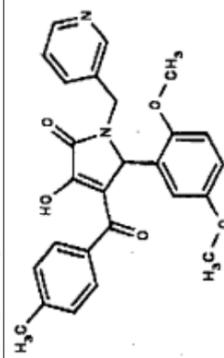
10 Finalmente, se midió la afinidad *in vitro* de la molécula C-13 y de algunas de las 87 moléculas anteriormente mencionadas con la proteína Syk mediante espectroscopia de fluorescencia (o espectrofluorometría), y se expresó mediante el valor de la constante de disociación (o Kd) en  $\mu\text{mol/litre}$  ( $\mu\text{M}$ ).

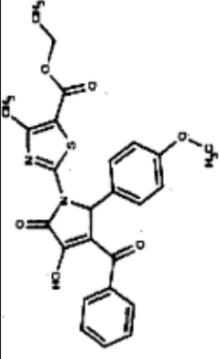
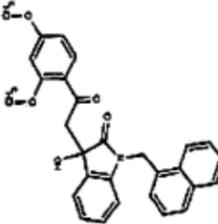
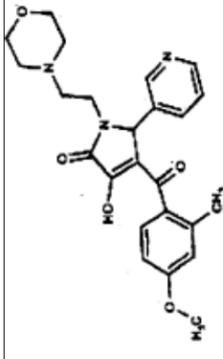
TABLA 1  
C-13 y las 87 moléculas identificadas usando C-13 y el fragmento de anticuerpo G4G

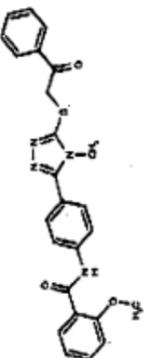
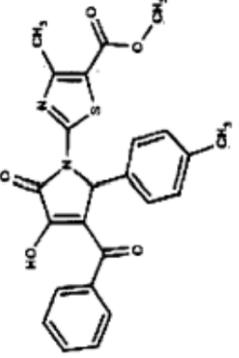
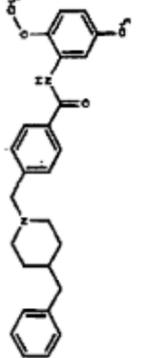
Estructura	CB ref.	Nombre	Orden	Inhib <i>in vitro</i>	Cl50 desgranulación	Kd	Nº	Gp
 <p><b>C<sub>23</sub> H<sub>17</sub> N O<sub>4</sub> S<sub>2</sub></b></p>	6197026	2-(5-((3-bencil-4-oxo-2-tioxo-1,3-tiazolidin-5-ylideno)metil)-2-furil)benzoatodemetilo	—	81 %	1 µg/ml	4,8 µM	C-13	—
 <p><b>C<sub>29</sub> H<sub>21</sub> Cl N<sub>2</sub> O<sub>4</sub></b></p>	6752784	4-(4-dorobenzoi)-3-hidroxi-5-(3-fenoxifenil)-1-(3-piridinimetil)-1,5-dihidro-2H-pirrol-2-ona	611	86,5	> 10 µg/ml	5 µM	1	I
 <p><b>C<sub>23</sub> H<sub>23</sub> N<sub>3</sub> O<sub>5</sub> S</b></p>	6670340	5-(2,4-dimetoxifenil)-3-hidroxi-1-[3-(1H-imidazol-1-il)propil]-4-(2-tienilcarbonil)-1,5-dihidro-2H-pirrol-2-ona	792	81	> 10 µg/ml	16,3 µM	2	I

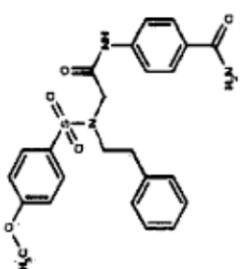
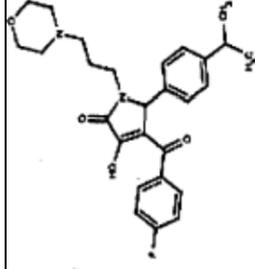
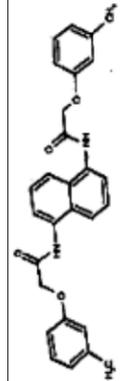
Estructura	CB ref.	Nombre	Orden	Inhib <i>in vitro</i>	Cl50 desgranulación	Kd	Nº	Gp
 <p><chem>CCOC(=O)COC1=CC=C(Br)C=C1C2=C(C)Nc3ccccc3C2=O</chem></p> <p><math>C_{24} H_{20} Br N O_6</math></p>	6422575	Acido {4-bromo-2-[3-(etoxicarbonil)-2-metil-5-oxo-4,5-dihidro-1H-indeno[1,2-b]piridin-4-il]fenoxi}acético	706	81	>10 µg/ml	6,2 µM	3	—
 <p><chem>COc1ccc(cc1)C2=C(O)N(CCCN3CCOCC3)C2=O</chem></p> <p><math>C_{26} H_{30} N_2 O_5</math></p>	6882059	3-hidroxi-5-(3-metoxifenil)-4-(4-metilbenzoi)-1-[3-(4-morfolinil)propil]-1,5-dihidro-2H-pirrol-2-ona	243	79,5	>10 µg/ml	9,4 µM	4	I
 <p><chem>COc1ccc(cc1OC)C2=C(O)N(CCC3=CN=CN3)C2=O</chem></p> <p><math>C_{25} H_{25} N_3 O_5</math></p>	7111786	4-benzoi-5-(2,5-dimetoxifenil)-3-hidroxi-1-[3-(1H-imidazol-1-il)propil]-1,5-dihidro-2H-pirrol-2-ona	557	77,5	>10 µg/ml	—	5	I

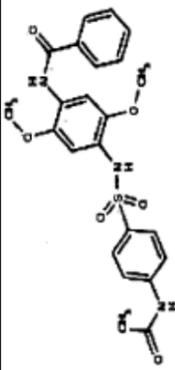
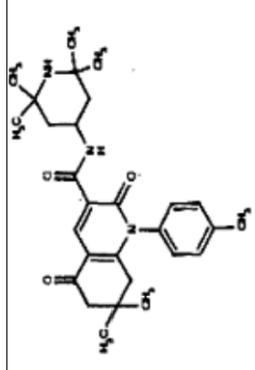
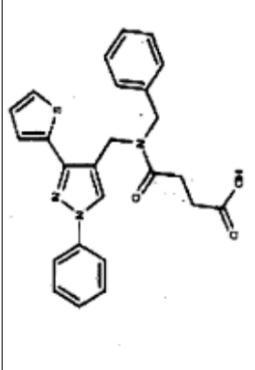
Estructura	CB ref.	Nombre	Orden	Inhib <i>in vitro</i>	CI50 desgranulación	Kd	Nº	Gp
 <p><chem>Cc1ccc(cc1)OC(=O)c2ccc(cc2)N3C(=O)C(O)C(=O)C3c4c(O)c(OC)c(OC)c4</chem></p> <p><math>C_{28}H_{25}NO_7</math></p>	6203863	4-[3-benzoyl-2-(2,4-dimethoxyphenyl)-4-hydroxy-5-oxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl]benzoato de metilo	423	73,5	>10 µg/ml	6,1 µM	6	I
 <p><chem>Cc1ccc(C)c1C(=O)c2c(O)c3c(N4CCOCC4)ccc3c2OC</chem></p> <p><math>C_{26}H_{30}N_2O_5</math></p>	7347627	4-(2,5-dimetilbenzoyl)-3-hidroxi-5-(2-metoxifenil)-1-[2-(4-morfolinil)etil]-1,5-dihidro-2H-pirrol-2-ona	775	72	>10 µg/ml	—	7	I
 <p><chem>Cc1ccc(O)c1C(=O)c2c(O)c3c(N4CCc5ccccc5)ccc3c2OCc6cc(O)c(Br)cc6</chem></p> <p><math>C_{24}H_{20}BrNO_5S</math></p>	7489416	5-(3-bromo-4-hidroxi-5-metoxifenil)-3-hidroxi-1-(2-feniletil)-4-(2-tienilcarbonil)-1,5-dihidro-2H-pirrol-2-ona	648	71	>10 µg/ml	—	8	I

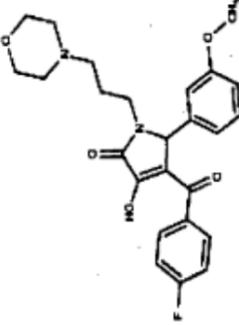
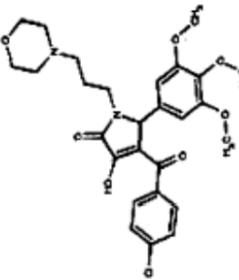
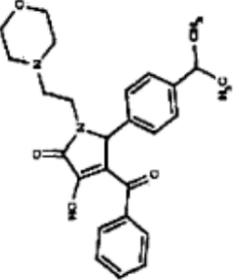
Estructura	CB ref.	Nombre	Orden	Inhib <i>in vitro</i>	CI50 desgranulación	Kd	Nº	Gp
 <p><chem>C28H21FN2O4</chem></p>	6719738	4-(4-fluorobenzol)-3-hidroxi-5-(3-fenoxifenil)-1-(3-piridinilmetil)-1,5-dihidro-2H-pirrol-2-ona	977	71	>10 µg/ml	—	9	I
 <p><chem>C25H21FN2O5S</chem></p>	6650234	2-[3-(4-fluorobenzol)-4-hidroxi-2-(4-metilfenil)-5-oxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il]-4-metil-1,3-thiazole-5-carboxilatodemetilo	946	71	~10 µg/ml	6,3 µM	10	I
 <p><chem>C26H24N2O5</chem></p>	6652639	5-(2,5-dimetoxifenil)-3-hidroxi-4-(4-metilbenzol)-1-(3-piridinilmetil)-1,5-dihidro-2H-pirrol-2-ona	829	70,5	>10 µg/ml	—	11	I

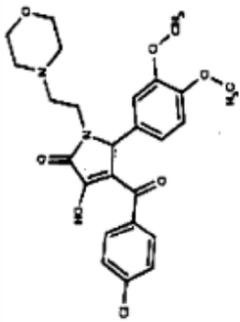
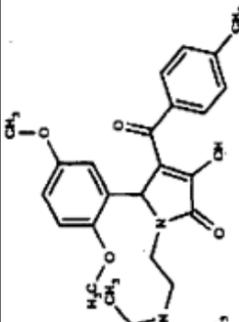
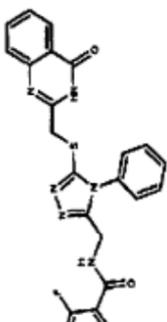
Estructura	CB ref.	Nombre	Orden	Inhib <i>in vitro</i>	CI50 desgranulación	Kd	Nº	Gp
 <p><chem>Cc1cc(OC)nc(C(=O)OC)c1C(=O)N2C(=O)C(=O)C2c3ccccc3</chem></p> <p><math>C_{25}H_{22}N_2O_6S</math></p>	6673225	2-[3-benzoyl-4-hydroxy-2-(4-metoxifenil)-5-oxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il]-4-metil-1,3-thiazole-5-carboxilato de metilo	301	69	>10 µg/ml	—	12	I
 <p><chem>COC1=CC=C(C=C1)C(=O)N2C(=O)C(O)C2c3cc4c5ccccc5c4n3</chem></p> <p><math>C_{29}H_{25}N_2O_5</math></p>	6800873	3-[2-(2,4-dimetoxifenil)-2-oxoetil]-3-hidroxi-1-(1-naftilmetil)-1,3-dihidro-2H-indol-2-ona	250	67,5	>10 µg/ml	4,6 µM	13	—
 <p><chem>COC1=CC=C(C=C1)C(=O)N2C(=O)C(O)C2c3cc4c5ccccc5c4n3</chem></p> <p><math>C_{24}H_{27}N_3O_5</math></p>	6879058	3-hidroxi-4-(4-metoxi-2-metilbenzoyl)-1-[2-(4-morfolinil)etil]-5-(3-piridinil)-1,5-dihidro-2H-pirrol-2-ona	758	67,5	>10 µg/ml	—	14	I

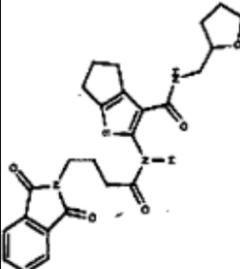
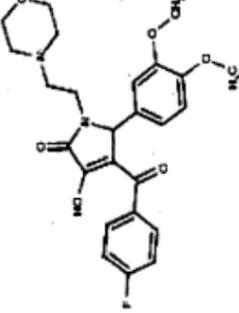
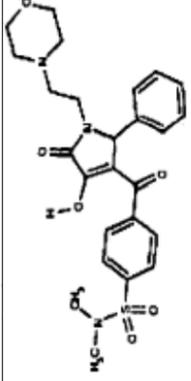
Estructura	CB ref.	Nombre	Orden	Inhib <i>in vitro</i>	CI50 desgranulación	Kd	Nº	Gp
 <p><chem>Cc1ccc(cc1)C(=O)Nc2ccc(cc2)N3C(=O)N(Cc4ccccc4)S3</chem></p>	6282824	2-metoxi-N-(4-(4-metil-5-((2-oxo-2-feniletil)itio)-4H-1,2,4-triazol-3-il)fenil)benzamida	905	67,5	~2,5 µg/ml	5,6 µM	15	II
 <p><chem>Cc1ccc(cc1)C(=O)N2C(=O)C(=O)C2c3c[nH]c3C(=O)N(C)C(=O)O</chem></p>	6750319	2-[3-benzoil-4-hidroxi-2-(4-metilfenil)-5-oxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il]-4-metil-1,3-tiazole-5-carboxilatodemetilo	850	67	>10 µg/ml	—	16	I
 <p><chem>Cc1ccc(cc1)C(=O)Nc2ccc(cc2)N(Cc3ccccc3)C4CCN(CC4)Cc5ccc(OC)c(C)c5</chem></p>	6474819	4-[(4-bencil-1-piperidinil)metil]-N-(2-metoxi-5-metilfenil)benzamida	954	63	>10 µg/ml	17,9 µM	17	—

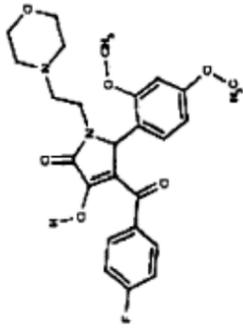
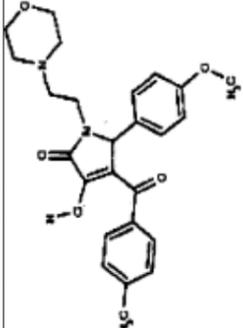
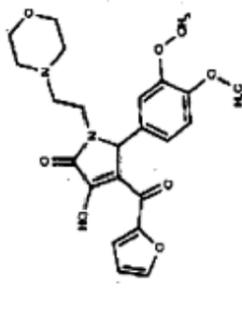
Estructura	CB ref.	Nombre	Orden	Inhib <i>in vitro</i>	CI50 desgranulación	Kd	Nº	Gp
 <chem>CN(C)C(=O)NCCN(S(=O)(=O)c1ccc(OC)cc1)CCc2ccccc2</chem> <p><math>C_{24}H_{25}N_3O_5S</math></p>	6498669	4-[(N-[(4-metoxifenil)sulfonyl]-N-(2-feniletil)glicil]amino)benzamida	808	63	> 10 µg/ml	0,8 µM	18	III
 <chem>CC(C)C1=CC=C(C=C1)C2=C(O)C(=O)N(C2)CCCN3CCOCC3</chem> <p><math>C_{27}H_{31}FN_2O_4</math></p>	6651552	4-(4-fluorobenzoi)-3-hidroxi-5-(4-isopropilfenil)-1-[3-(4-morfolinil)propil]-1,5-dihidro-2H-pirrol-2-ona	100	60	> 10 µg/ml	—	19	I
 <chem>CC1=CC=C(C=C1)OC(=O)Nc2ccc3c(c2)ccc4c3c(Oc5ccc(C)cc5)nc(=O)O4</chem> <p><math>C_{28}H_{26}N_2O_4</math></p>	6453860	N,N'-1,5-nafteno-diilbis[2-(3-metilfenoxi)acetamida]	145	60	> 10 µg/ml	—	20	—

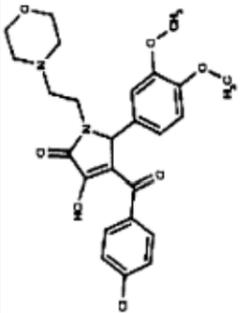
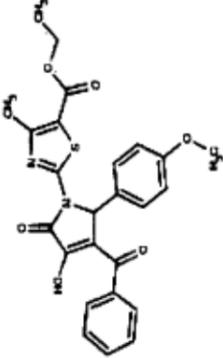
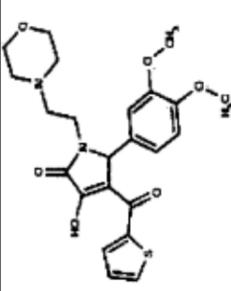
Estructura	CB ref.	Nombre	Orden	Inhib <i>in vitro</i>	CI50 desgranulación	Kd	Nº	Gp
 <p><chem>CC(=O)Nc1ccc(cc1)S(=O)(=O)Nc2cc(OC)c(NC(=O)c3ccccc3)cc2OC</chem></p> <p><math>C_{23}H_{23}N_3O_6S</math></p>	6853966	N-[4-((4-(acetilamino)fenil)sulfonil)amino)-2,5-dimetoxifenil]benzamida	11	58	>10 µg/ml	—	21	—
 <p><chem>CC1(C)CC2(C)CC(C1)C(=O)N(C2)C3=CC=C(C=C3)C4=CC(=O)N(C4)C5=CC=C(C=C5)C6=CC=C(C=C6)C7=CC=C(C=C7)C8=CC=C(C=C8)C9=CC=C(C=C9)C(=O)N8</chem></p> <p><math>C_{28}H_{37}N_3O_3</math></p>	6866968	7,7-dimetil-1-(4-metilfenil)-2,5-dioxo-N-(2,2,6,6-tetrametil-4-piperidinil)-1,2,5,6,7,8-hexahidro-3-quinolinacarboxamida	255	57,5	>10 µg/ml	—	22	—
 <p><chem>OC(=O)CC(=O)N(Cc1cc2c(c1)nn(c2)C3=CC=CC=C3)Cc4ccccc4</chem></p> <p><math>C_{25}H_{23}N_3O_3S</math></p>	7938324	Ácido 4-(bencil[[1-fenil-3-(2-tienil)-1H-pirazol-4-il]metil]amino)-4-oxobutanoico	795	57	>10 µg/ml	—	23	—

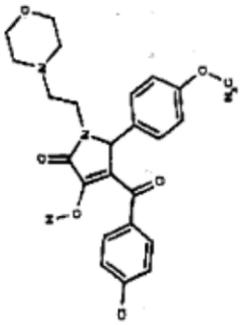
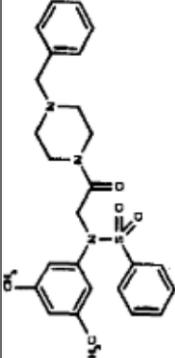
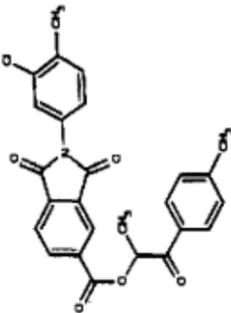
Estructura	CB ref.	Nombre	Orden	Inhib <i>in vitro</i>	CI50 desgranulación	Kd	Nº	Gp
 <p><chem>C25 H27 F N2 O5</chem></p>	6905988	4-(4-fluorobenzol)-3-hidroxi-5-(3-metoxifenil)-1-[3-(4-morfolinil)propil]-1,5-dihidro-2H-pirrol-2-ona	843	57	>10 µg/ml	—	24	I
 <p><chem>C27 H31 Cl N2 O7</chem></p>	6885782	4-(4-clorobenzol)-3-hidroxi-1-[3-(4-morfolinil)propil]-5-(3,4,5-trimetoxifenil)-1,5-dihidro-2H-pirrol-2-ona	249	56,5	>10 µg/ml	—	25	I
 <p><chem>C26 H30 N2 O4</chem></p>	6663684	4-benzol-3-hidroxi-5-(4-isopropilfenil)-1-[2-(4-morfolinil)etil]-1,5-dihidro-2H-pirrol-2-ona	530	56,5	>10 µg/ml	—	26	I

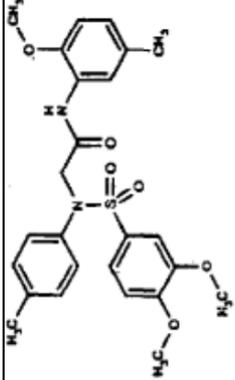
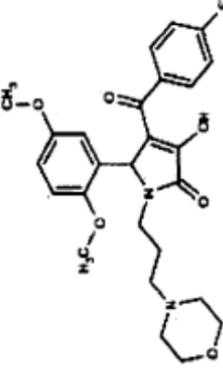
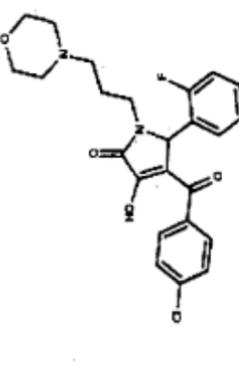
Estructura	CB ref.	Nombre	Orden	Inhib <i>in vitro</i>	CI50 desgranulación	Kd	Nº	Gp
 <p><chem>C25 H27 Cl N2 O6</chem></p>	6672500	4-(4-clorobenzoi)-5-(3,4-dimetoxifenil)-3-hidroxi-1-[2-(4-morfolinil)etil]-1,5-dihidro-2H-pirrol-2-ona	194	55	>10 µg/ml	—	27	I
 <p><chem>C26 H32 N2 O5</chem></p>	7721949	1-[2-(dietilamino)etil]-5-(2,5-dimetoxifenil)-3-hidroxi-4-(4-metilbenzoi)-1,5-dihidro-2H-pirrol-2-ona	139	54	>10 µg/ml	—	28	I
 <p><chem>C25 H19 F N6 O2 S</chem></p>	7966545	2-fluoro-N-[(5-[(4-oxo-3,4-dihidro-2-quinazolil)metil]tio)-4-fenil-4H-1,2,4-triazol-3-il)]metil]benzamida	773	53,5	~10 µg/ml	6,7 µM	29	—

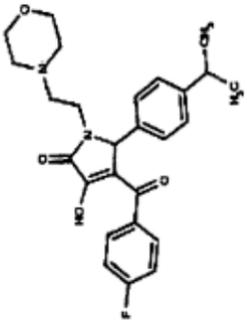
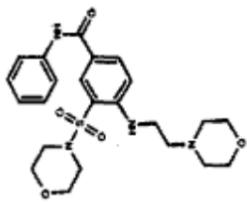
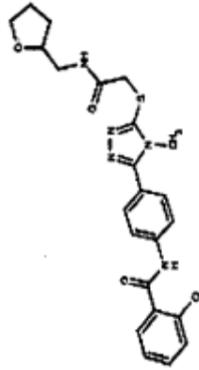
Estructura	CB ref.	Nombre	Orden	Inhib <i>in vitro</i>	Cl50 desgranulación	Kd	Nº	Gp
 <p><chem>C25 H27 N3 O5 S</chem></p>	7437580	2-[[4-(1,3-dioxo-1,3-dihidro-2H-isolindo1-2-ii)butanil]amino]-N-(tetrahidro-2-furanilmetil)-5,6-dihidro-4H-ciclopenta[b]tiophene-3-carboxamida	222	51	>10 µg/ml	—	30	—
 <p><chem>C25 H27 F N2 O6</chem></p>	6654239	5-(3,4-dimetoxifenil)-4-(4-fluorobenzoil)-3-hidroxi-1-(2-(4-morfolinil)etil)-1,5-dihidro-2H-pirrol-2-ona	343	50	>10 µg/ml	—	31	I
 <p><chem>C25 H29 N3 O6 S</chem></p>	6670570	4-((4-hidroxi-1-[2-(4-morfolinil)etil]-5-oxo-2-fenil-2,5-dihidro-1H-pirrol-3-il]carbonil)-N,N-dimetilbencenosulfonamida	926	50	>10 µg/ml	—	32	I

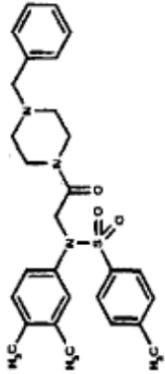
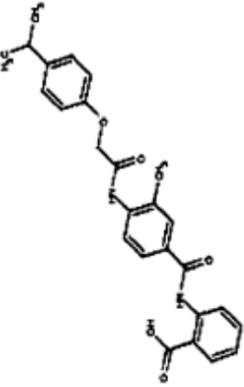
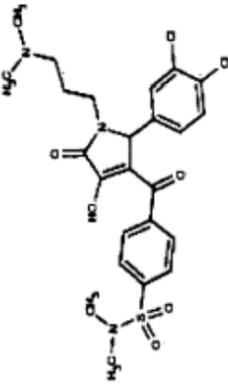
Estructura	CB ref.	Nombre	Orden	Inhib <i>in vitro</i>	Ci50 desgranulación	Kd	Nº	Gp
 <p><math>C_{25}H_{27}FN_2O_6</math></p>	6670673	5-(2,4-dimetoxifenil)-4-(4-fluorobenzoi)-3-hidroxi-1-[2-(4-morfolin)etil]-1,5-dihidro-2H-pirrol-2-ona	742	50	> 10 µg/ml	—	33	I
 <p><math>C_{25}H_{28}N_2O_5</math></p>	6670747	3-hidroxi-5-(4-metoxifenil)-4-(4-metilbenzoi)-1-[2-(4-morfolin)etil]-1,5-dihidro-2H-pirrol-2-ona	413	50	> 10 µg/ml	—	34	I
 <p><math>C_{23}H_{26}N_2O_7</math></p>	6671401	5-(3,4-dimetoxifenil)-4-(2-furoil)-3-hidroxi-1-[2-(4-morfolin)etil]-1,5-dihidro-2H-pirrol-2-ona	954	50	> 10 µg/ml	—	35	I

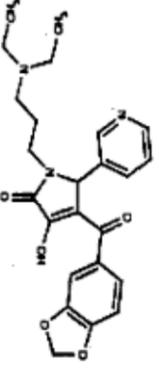
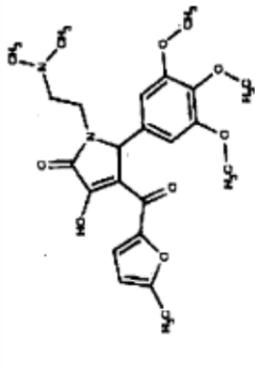
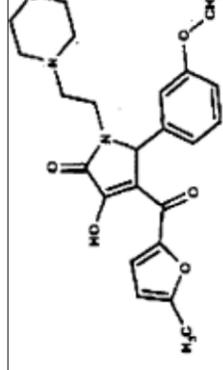
Estructura	CB ref.	Nombre	Orden	Inhib <i>in vitro</i>	CI50 desgranulación	Kd	Nº	Gp
 <p><chem>C25H27ClN2O6</chem></p>	6672500	4-(4-clorobenzoi)-5-(3,4-dimetoxifenil)-3-hidroxi-1-[2-(4-morfolinil)etil]-1,5-dihidro-2H-pirrol-2-ona	194	50	> 10 µg/ml	—	36	I
 <p><chem>C25H22N2O6S</chem></p>	6673225	2-[3-benzoi]-4-hidroxi-2-(4-metoxifenil)-5-oxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il]-4-metil-1,3-thiazole-5-carboxilato dimetililo	124	50	> 10 µg/ml	—	37	I
 <p><chem>C23H26N2O6S</chem></p>	6677533	5-(3,4-dimetoxifenil)-3-hidroxi-1-[2-(4-morfolinil)etil]-4-(2-itenilcarbonil)-1,5-dihidro-2H-pirrol-2-ona	409	50	> 10 µg/ml	—	38	I

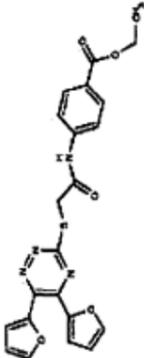
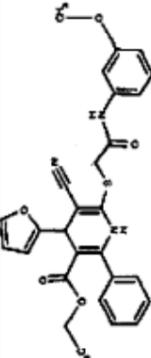
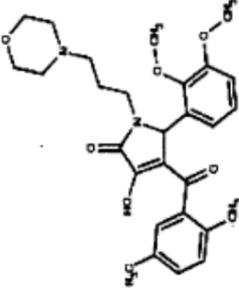
Estructura	CB ref.	Nombre	Orden	Inhib <i>in vitro</i>	Cl50 desgranulación	Kd	Nº	Gp
 <p><chem>C24H25ClN2O5</chem></p>	6683618	4-(4-clorobenzoil)-3-hidroxi-5-(4-metoxifenil)-1-[2-(4-morfolinil)etil]-1,5-dihidro-2H-pirrol-2-ona	808	50	>10 µg/ml	—	39	I
 <p><chem>C27H31N3O3S</chem></p>	6417902	N-[2-(4-bencil-1-piperazini)-2-oxoetil]-N-(3,5-dimetilfenil)benzenosulfonamida	897	49,5	>10 µg/ml	—	40	III
 <p><chem>C26H20ClNO5</chem></p>	6437157	carboxilato de 1-metil-2-(4-metilfenil)-2-oxoetil-2-(3-cloro-4-metilfenil)-1,3-dioxo-5-isindolina	871	49,5	>10 µg/ml	—	41	—

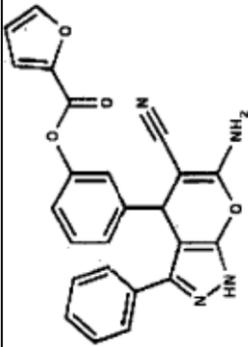
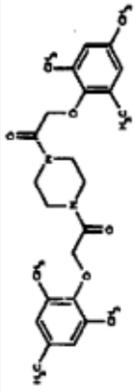
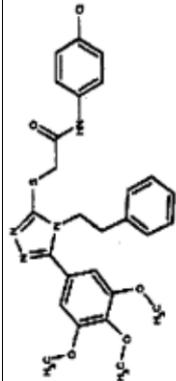
Estructura	CB ref.	Nombre	Orden	Inhib <i>in vitro</i>	Cl50 desgranulación	Kd	Nº	Gp
 <p><math>C_{25} H_{28} N_2 O_6 S</math></p>	6465972	N-2-~[(3,4-dimetoxifenil)]sulfonyl]-N-1-~-(2-metoxi-5-metilfenil)-N-2-~-(4-metilfenil)glicinamida	926	49	>10 µg/ml	—	42	III
 <p><math>C_{26} H_{29} F N_2 O_5</math></p>	7723671	5-(2,5-dimetoxifenil)-4-(4-fluorobenzoi)-3-hidroxi-1-[3-(4-morfolinil)propil]-1,5-dihidro-2H-pirrol-2-ona	34	48,5	>10 µg/ml	—	43	I
 <p><math>C_{24} H_{24} Cl F N_2 O_4</math></p>	6648368	4-(4-clorobenzoi)-5-(2-fluorofenil)-3-hidroxi-1-[3-(4-morfolinil)propil]-1,5-dihidro-2H-pirrol-2-ona	465	48,5	>10 µg/ml	—	44	I

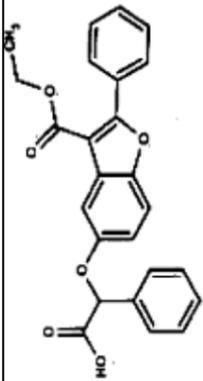
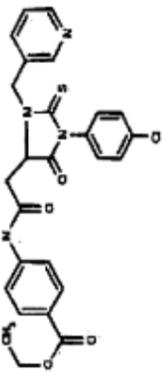
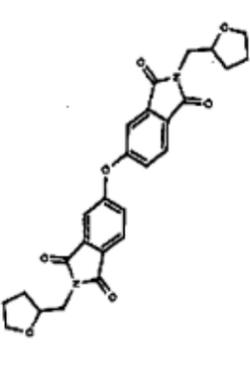
Estructura	CB ref.	Nombre	Orden	Inhib <i>in vitro</i>	CI50 desgranulación	Kd	Nº	Gp
 <p><chem>CC(C)C1=CC=C(C=C1)C2=C(C(=O)N2C(=O)C3=CC=C(C=C3)F)C(=O)C4=CC=C(C=C4)CCN5CCOCC5</chem></p> <p><b>C<sub>26</sub> H<sub>26</sub> F N<sub>2</sub> O<sub>4</sub></b></p>	6656195	4-(4-fluorobenzoyl)-3-hidroxi-5-(4-isopropilfenil)-1-[2-(4-morfolin)etil]-1,5-dihidro-2H-pirrol-2-ona	613	48,5	>10 µg/ml	—	45	I
 <p><chem>CC1=CC=C(C=C1)NC(=O)C2=CC=C(C=C2)S(=O)(=O)N3CCOCC3N4CCOCC4</chem></p> <p><b>C<sub>23</sub> H<sub>30</sub> N<sub>4</sub> O<sub>5</sub> S</b></p>	7778331	4-[[2-(4-morfolinil)etil]amino]-3-(4-morfolinilsulfonil)-N-fenilbenzamida	998	48	>10 µg/ml	<sup>3</sup> µM	46	—
 <p><chem>CC1=CC=C(C=C1)C2=NC(=O)N(C)C2=NC3=CC=C(C=C3)C(=O)N4CCOCC4Cl</chem></p> <p><b>C<sub>23</sub> H<sub>24</sub> Cl N<sub>5</sub> O<sub>3</sub> S</b></p>	6994060	2-cloro-N-[4-[4-metil-5-{{2-oxo-2-[(tetrahidro-2-furanilmetil)amino]etil}tio)-4H-1,2,4-triazol-3-il]fenil]benzamida	623	47,5	>10 µg/ml	—	47	II

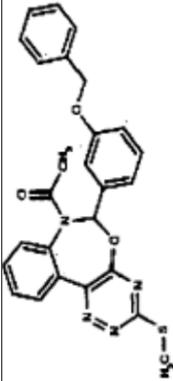
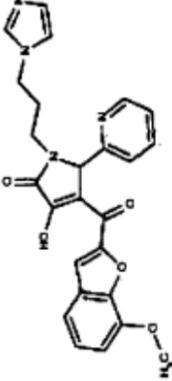
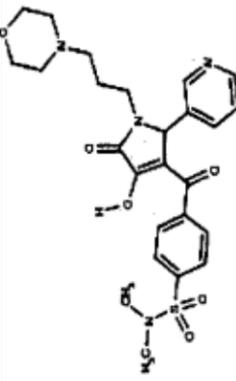
Estructura	CB ref.	Nombre	Orden	Inhib <i>in vitro</i>	CI50 desgranulación	Kd	Nº	Gp
 <p><math>C_{28} H_{33} N_3 O_3 S</math></p>	6458830	N-[2-(4-bencil-1-piperazini)-2-oxoetil]N-(3,4-dimetilfenil)-4-metilbencenosulfonamida	837	47	>10 µg/ml	—	48	III
 <p><math>C_{25} H_{26} N_2 O_5</math></p>	7524107	Ácido 2-[(4-[(4-isopropilfenoxi)acetil]amino)-3-metilbenzoi]amino]benzoico	789	46,5	~10 µg/ml	5,5 µM	49	—
 <p><math>C_{24} H_{27} Cl_2 N_3 O_5 S</math></p>	6661524	4-[(2-(3,4-diclorofenil)-1-[β-(dimetilamino)propil]-4-hidroxi-5-oxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-3-il]carbonil)-N,N-dimetilbencenosulfonamida	428	46,5	>10 µg/ml	—	50	I

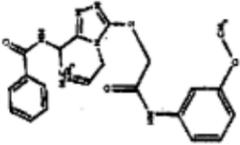
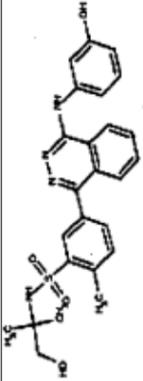
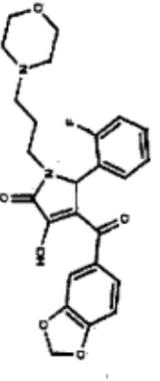
Estructura	OB ref.	Nombre	Orden	Inhib <i>in vitro</i>	Ci50 desgranulación	Kd	Nº	Gp
 <p><chem>C24 H27 N3 O5</chem></p>	7739436	4-(1,3-benzodioxol-5-ylcarbonyl)-1-[3-(diethylamino)propyl]-3-hidroxi-5-(3-piridinil)-1,5-dihidro-2H-pirrol-2-ona	976	46	>10 µg/ml	—	51	I
 <p><chem>C23 H28 N2 O7</chem></p>	6881804	1-[2-(dimetilamino)etil]-3-hidroxi-4-(5-metil-2-furoil)-5-(3,4,5-trimetoxifenil)-1,5-dihidro-2H-pirrol-2-ona	230	46	>10 µg/ml	—	52	I
 <p><chem>C23 H26 N2 O6</chem></p>	6907921	3-hidroxi-5-(3-metoxifenil)-4-(5-metil-2-furoil)-1-[2-(4-morfolinil)etil]-1,5-dihidro-2H-pirrol-2-ona	609	45,5	>10 µg/ml	—	53	I

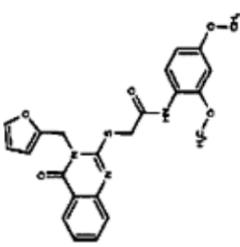
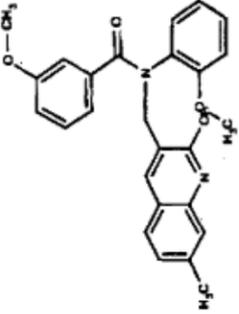
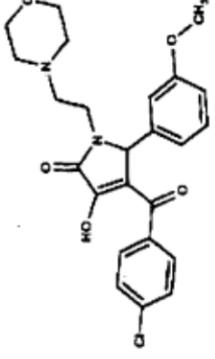
Estructura	CB ref.	Nombre	Orden	Inhib <i>in vitro</i>	CI50 desgranulación	Kd	Nº	Gp
 <p><chem>CCOC(=O)Nc1ccc(NC(=O)Sc2nc3c(ncn3c2)C4=CC=CC=C4)cc1</chem></p>	7495334	4-((5,6-di-2-furil-1,2,4-triazin-3-yl)thioacetil)amino)benzoato de etilo	380	43	~5 µg/ml	1,6 µM	54	—
 <p><chem>COC1=CC=C(C=C1)C(=O)N(C1=CC=CC=C1)S(=O)(=O)C2=CC=CC=C2C3=CC=CC=C3C4=CC=CC=C4C#N</chem></p>	7509862	carboxilatode5-ciano-4-(2-furil)-6-({2-[(3-metoxifenil)amino]-2-oxoetil}tio)-2-fenil-1,4-dihidro-3-piridina	170	42,5	~5 µg/ml	—	55	—
 <p><chem>COC1=CC=C(C=C1)C(=O)N(C1=CC=CC=C1)S(=O)(=O)C2=CC=CC=C2C3=CC=CC=C3C4=CC=CC=C4C#N</chem></p>	7325385	5-(2,3-dimetoxifenil)-4-(2,5-dimetilbenzoi)-3-hidroxi-1-[3-(4-morfolin)propil]-1,5-dihidro-2H-pirrol-2-ona	65	42	~10 µg/ml	—	56	I

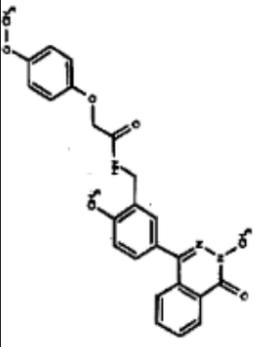
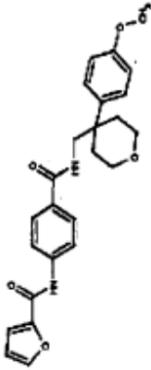
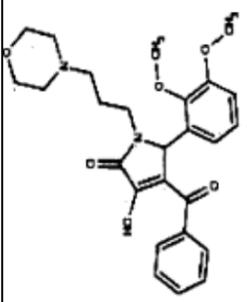
Estructura	CB ref.	Nombre	Orden	Inhib <i>in vitro</i>	CI50 desgranulación	Kd	Nº	Gp
 <p><chem>C24H16N4O4</chem></p>	6669449	2-furoate 3-(6-amino-5-cyano-3-fenil-1,4-dihidropirano[2,3-c]pirazol-4-il)fenilo	140	42	> 10 µg/ml	—	57	—
 <p><chem>C26H34N2O4</chem></p>	7348779	1,4-bis[(mesitilo)acetil]piperazina	209	40	~10 µg/ml	—	58	—
 <p><chem>C27H27ClN4O4S</chem></p>	7501888	N-(4-clorofenil)-2-[[4-(2-feniletil)-5-(3,4,5-trimetoxifenil)-4H-1,2,4-triazol-3-il]il]ioacetamida	544	40	~2 µg/ml	8,2 µM	59	—

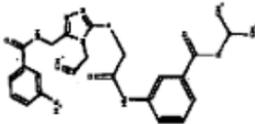
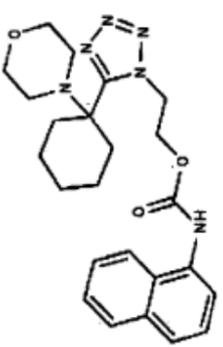
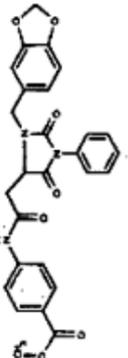
Estructura	CB ref.	Nombre	Orden	Inhib <i>in vitro</i>	CI50 desgranulación	Kd	Nº	Gp
 <p><chem>CC(=O)OC(c1ccc(OCC)cc1)c2ccc(Oc3ccccc3)cc2</chem></p>	6946138	Ácido {[3-(etoxicarbonil)-2-fenil-1-benzofuran-5-il]oxi}(fenil)acético	298	40	> 10 µg/ml	—	60	—
 <p><chem>CCOC(=O)c1ccc(NC(=O)C2C(=O)N(C2)C(=O)N3C=CC=CC3Cl)cc1</chem></p> <p><math>C_{25}H_{20}O_6</math></p>	7722851	4-((1-(4-clorofenil)-5-ozo-3-(3-piridinilmetil)-2-tioxo-4-imidazolidinil)acetil)amino)benzoato de etilo	638	39,5	~2 µg/ml	21,8 µM	61	IV
 <p><chem>C1CCOC1C2C(=O)N(C2)C(=O)N3C=CC=C3OC4C=CC=C4C5COC5</chem></p> <p><math>C_{26}H_{23}ClN_4O_4S</math></p>	7517583	5,5'-oxibis[2-(tetrahydro-2-furanilmetil)-1H-imidazo-1,3(2H)-diona]	912	38,5	> 10 µg/ml	—	62	—
 <p><math>C_{26}H_{24}N_2O_7</math></p>								

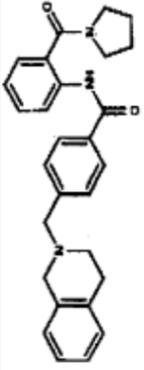
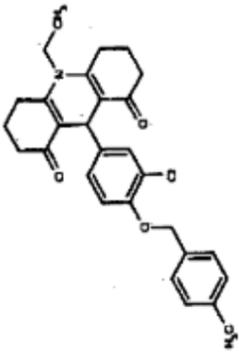
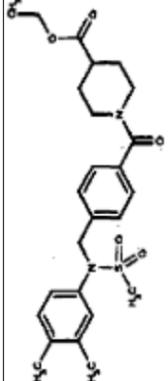
Estructura	CB ref.	Nombre	Orden	Inhib <i>in vitro</i>	Cl50 desgranulación	Kd	Nº	Gp
 <p><math>C_{26} H_{22} N_4 O_3 S</math></p>	6634701	7-acetil-6-[3-(benziloxy)fenil]-3-(metilitio)-6,7-dihidro[1,2,4]triazino[5,6-d][3,1]benzoxazepina	934	38,5	~5 µg/ml	—	63	—
 <p><math>C_{25} H_{22} N_4 O_5</math></p>	7726450	3-hidroxi-1-imidazol-1-[3-(1H-imidazol-1-il)propil]-4-[(7-metoxi-1-benzoturan-2-il)carbonil]-5-(2-piridinil)-1,5-dihidro-2H-pirrol-2-ona	472	37,5	> 10 µg/ml	—	64	I
 <p><math>C_{25} H_{30} N_4 O_6 S</math></p>	6662088	4-[[4-hidroxi-1-[3-(4-morfolinil)propil]-5-oxo-2-(3-piridinil)-2,5-dihidro-1H-pirrol-3-il]carbonil]-N,N-dimetilbenzenosulfonamida	158	37	> 10 µg/ml	—	65	I

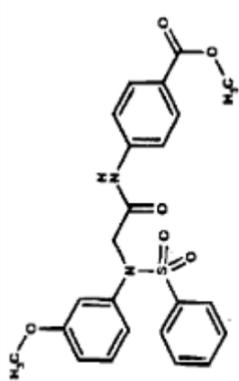
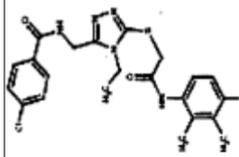
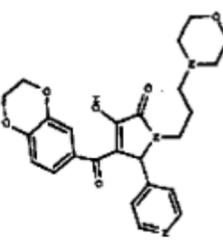
Estructura	CB ref.	Nombre	Orden	Inhib <i>in vitro</i>	Cl50 desgranulación	Kd	Nº	Gp
 <chem>C<sub>23</sub>H<sub>25</sub>N<sub>5</sub>O<sub>3</sub>S</chem>	7752193	N-(1-[4-allyl-5-((2-[(3-metoxifenil)amino]-2-oxoetil)tió)-4H-1,2,4-triazol-3-il]etil)benzamida	248	35	~5 µg/ml	8 µM	66	—
 <chem>C<sub>23</sub>H<sub>26</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub>S</chem>	7238569	N-(2-hidroxi-1,1-dimetil)etil)-5-{4-[(3-hidroxi)fenil]amino}-1-ftalazina}-2-metilbencenosulfonamida	749	32	> 10 µg/ml	—	67	—
 <chem>C<sub>25</sub>H<sub>25</sub>F N<sub>2</sub>O<sub>6</sub></chem>	7724000	4-(1,3-benzodioxol-5-ilcarbonil)-5-(2-fluorofenil)-3-hidroxi-1-[3-(4-morfolin)propil]-1,5-dihidro-2H-pirrol-2-ona	303	30	~10 µg/ml	—	68	I

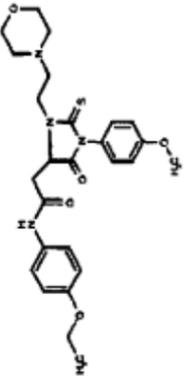
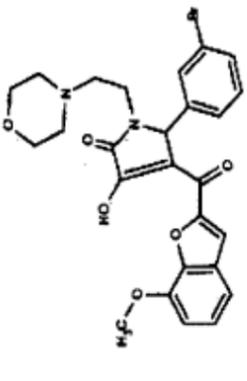
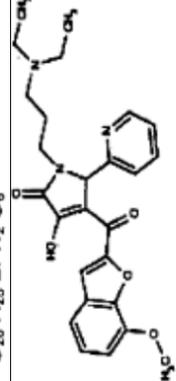
Estructura	CB ref.	Nombre	Orden	Inhib <i>in vitro</i>	Cl50 desgranulación	Kd	Nº	Gp
 <p><chem>Cc1ccc(OC)c(OC)c1NC(=O)Nc2nc3ccccc3c(=O)c2Cc4occc4</chem></p> <p><math>C_{23}H_{21}N_3O_5S</math></p>	7443270	N-(2,4-dimetoxi-fenil)-2-[(3-(2-furilmetil)-4-oxo-3,4-dihidro-2-quinazolinil]io)acetamida	895	30	~5 µg/ml	—	69	—
 <p><chem>Cc1ccc(OC)c(OC)c1NC(=O)Nc2nc3ccccc3c(=O)c2Cc4cnc5ccccc54O</chem></p> <p><math>C_{26}H_{24}N_2O_4</math></p>	7245019	N-[(2-hidroxi-7-metil-3-quinolinil)metil]-3-metoxi-N-(2-metoxifenil)benzamida	608	30	>10 µg/ml	—	70	—
 <p><chem>Cc1ccc(OC)c(OC)c1C(=O)N(O)C(=O)N(CC2CCNCC2)c3cc(Cl)ccc3</chem></p> <p><math>C_{24}H_{25}ClN_2O_5</math></p>	6909597	4-(4-clorobenzoi)-3-hidroxi-5-(3-metoxifenil)-1-[2-(4-morfolinil)etil]-1,5-dihidro-2H-pirrol-2-ona	790	29	>10 µg/ml	—	71	I

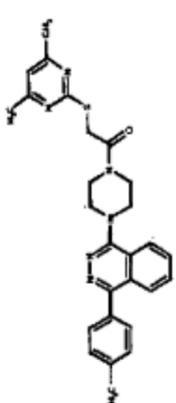
Estructura	CB ref.	Nombre	Orden	Inhib <i>in vitro</i>	Cl50 desgranulación	Kd	Nº	Gp
 <p><chem>CCOC1=CC=C(C=C1)OCC(=O)NCC2=CC=C(C=C2)C3=NC(=O)N(C)C4=CC=CC=C34</chem></p> <p><math>C_{26} H_{25} N_3 O_4</math></p>	7661882	2-(4-metoxifenoxi)-N-[2-metil-5-(3-metil-4-oxo-3,4-dihidro-1-ftalazinil)encil]acetamida	941	28	~10 µg/ml	—	72	—
 <p><chem>COc1ccc(cc1)NCC2=CC=CC=C2C(=O)NCC3=CC=CC=C3C4=CC=CC=C4</chem></p> <p><math>C_{25} H_{26} N_2 O_5</math></p>	7667791	N-(4-[(1-(4-metoxifenil)tetrahydro-2H-piran-4-il)metil]amino)carbonil]fenil]-2-furamida	797	28	>10 µg/ml	—	73	—
 <p><chem>COc1ccc(cc1)C(=O)N2C(=O)C(O)C(=O)N2CCC3=CC=CC=C3C4=CC=CC=C4</chem></p> <p><math>C_{26} H_{30} N_2 O_5</math></p>	6891745	4-benzoil-5-(2,3-dimetoxifenil)-3-hidroxi-1-(3-(4-morfolinil)propil)-1,5-dihidro-2H-pirrol-2-ona	115	27,5	>10 µg/ml	—	74	I

Estructura	CB ref.	Nombre	Orden	Inhib <i>in vitro</i>	Cl50 desgranulación	Kd	Nº	Gp
 <p><chem>C26 H29 N5 O4 S</chem></p>	7783660	3-((4-allyl-5-(((3-metilbenzoi)amino)metil)-4H-1,2,4-triazol-3-il)io)acetil)amino)benzoatodeisopropilo	266	27	~5 µg/ml	4,8 µM	75	II
 <p><chem>C24 H30 N6 O3</chem></p>	7653478	carbamatode2-{5-[1-(4-morfolini)ciclohexil]-1H-tetrazol-1-il}etil 1-naftilo	365	27	>10 µg/ml	—	76	—
 <p><chem>C27 H23 N3 O7</chem></p>	7723330	4-(((3-(1,3-benzodioxol-5-il)metil)-2,5-dioxo-1-fenil-4-imidazolil)io)acetil)amino)benzoatodemetilo	965	26	>10 µg/ml	—	77	IV

Estructura	CB ref.	Nombre	Orden	Inhib <i>in vitro</i>	CI50 desgranulación	Kd	Nº	Gp
 <p><chem>C28 H29 N3 O2</chem></p>	7199725	4-(3,4-dihidro-2-(1H)-isoquinolinil-metil)-N-[2-(1-pirrolidinilcarbonyl)fenil]benzamida	987	25	> 10 µg/ml	—	78	—
 <p><chem>C29 H30 Cl N O3</chem></p>	6987235	9-(3-cloro-4-[(4-metilbencil)oxil]fenil)-10-etil-3,4,6,7,9,10-hexahidro-1,8(2H,5H)-acridinadiana	680	25	> 10 µg/ml	—	79	—
 <p><chem>C25 H32 N2 O5 S</chem></p>	7140931	1-(4-[(3,4-dimetilfenil)(metil sulfonil)amino]metil)benzolil)-4-piperidincarboxilatodeetil	14	24,5	> 10 µg/ml	—	80	—

Estructura	CB ref.	Nombre	Orden	Inhib <i>in vitro</i>	CI50 desgranulación	Kd	Nº	Gp
 <p><chem>C23 H22 N2 O6 S</chem></p>	7787455	4-[[N-(3-metoxifenil)-N-(fenilsulfoni)glicil]amino]benzoato de metilo	407	20	>10 µg/ml	—	81	III
 <p><chem>C22 H23 Br Cl N6 O2 S</chem></p>	7660465	N-[[5-[[2-[(4-bromo-2,3-dimetilfenil)amino]-2-oxoetil]itio]-4-etil-4H-1,2,4-triazol-3-il]metil]-4-clorobenzamida	881	20	~7 µg/ml	3.2 µM	82	II
 <p><chem>C25 H27 N3 O6</chem></p>	7661751	4-(2,3-dihidro-1,4-benzodioxin-6-ilcarbonil)-3-hidroxi-1-[3-(4-morfolin)propil]-5-(4-piridil)-1,5-dihidro-2H-pirrol-2-ona	951	19	~10 µg/ml	—	83	I

Estructura	CB ref.	Nombre	Orden	Inhib <i>in vitro</i>	CI50 desgranulación	Kd	Nº	Gp
 <p><math>C_{26} H_{32} N_4 O_5 S</math></p>	7722914	N-(4-etocefenil)-2-[1-(4-metoxifenil)-3-[2-(4-morfolinil)etil]-5-oxo-2-tioxa-4-imidazolidinil]acetamida	806	19	~7 µg/ml	15,6 µM	84	IV
 <p><math>C_{26} H_{25} Br N_2 O_6</math></p>	7745040	5-(3-bromofenil)-3-hidroxi-4-[(7-metoxi-1-benzofuran-2-il)carbonil]-1-[2-(4-morfolinil)etil]-1,5-dihidro-2H-pirrol-2-ona	313	18	~10 µg/ml	—	85	I
 <p><math>C_{26} H_{29} N_5 O_5</math></p>	7735385	1-[3-(di(2-amino)propil)-3-hidroxi-4-[(7-metoxi-1-benzofuran-2-il)carbonil]-5-(2-piridinil)-1,5-dihidro-2H-pirrol-2-ona	21	17	~10 µg/ml	—	86	I

Estructura	CB ref.	Nombre	Orden	Inhib <i>in vitro</i>	CI50 desgranulación	Kd	Nº	Gp
 <p><b>C<sub>27</sub> H<sub>28</sub> N<sub>6</sub> O S</b></p>	7756003	1-(4-((4,6-dimetil-2-pirimidinil)tio)acetil)-1-piperazinil-4-(4-metilfenil)ftalazina	361	11	~5 µg/ml	—	87	—

- **ref CB:** referencia de ChemBridge;  
 - **Orden:** orden de cada molécula en la lista de las 1000 mejores moléculas tras el "anclaje in silico";  
 - **Inhib. in vitro:** % de inhibición promedio obtenido con cada molécula para el desplazamiento de la unión de scFv G4G11 a Syk in vitro usando el método ADA;  
 - **CI50 degran.**: concentración que inhibe la desgranulación de mastocitos en un 50%;  
 - **Kd:** constante de disociación con respecto a Syk medida in vitro mediante espectrofluorometría  
 - **Nº:** número asignado por los inventores;  
 - **Gp:** grupos a los que pertenecen las moléculas

Ejemplo 3 Materiales y métodos

1) Productos químicos y anticuerpos. Se compró una biblioteca de compuestos químicos de 3000 moléculas (un subconjunto variado) a ChemBridge, Inc. (San Diego, Calif.). Se prepararon disoluciones madre de las moléculas pequeñas a una concentración 10 mM en DMSO (dimetilsulfóxido), salvo para C-13 (2-{5-[(3-bencil-4-oxo-2-tioxo-1,3-tiazolidin-5-ilideno) metil]-2-furil}benzoato de metilo, ChemBridge N° ID 6197028) que se preparó en DMF (dimetilformamida). A no ser que se indique otra cosa, todos los reactivos fueron suministrados por Sigma. El hapteno dinitrofenilo (DNP) se adquirió de Calbiochem. Sepharose GammaBind G y el resto de anticuerpos secundarios fueron suministrados por GE Health Amersham Biosciences. Los anticuerpos anti-Syk, anti-Lyn, anti-Btk, anti-PLC- $\gamma$ 1, anti-PLC- $\gamma$ 2, anti-LAT, anti-SLP-76, anti-p38, anti-JNK, anti-Vav, anti-Akt1 y 9E10 conjugados con HRP se adquirieron de Santa Cruz Biotechnology. Los anticuerpos anti-fosfo-p44/42 quinasa MAP, anti-p44/42 quinasa MAP, anti-fosfo-p38, anti-fosfo-JNK, anti-fosfo-Akt1 se adquirieron de Cell Signaling. Los anticuerpos anti-fosfo-LAT y anti-fosfo-PLC- $\gamma$ 1 fueron suministrados por Biosource y los anticuerpos anti-fosfo-SLP-76 por BD Pharmingen. El anticuerpo monoclonal 4G10 anti-fosforrosina se adquirió de Upstate Biotechnology.

2) Método ADA: Ensayo de cribado molecular de alta velocidad de tipo ELISA basado en el desplazamiento de anticuerpo (documento WO 2005106481). La proteína de fusión recombinante GST:Syk 6-2428 que comprende los restos 6 a 242 de la proteína tirosina quinasa Syk de murino ilustrada en la Figura 8B (SED ID N° 4) se inmovilizó en una placa ELISA a una concentración final de 10  $\mu\text{g ml}^{-1}$ . Para el cribado de la biblioteca de moléculas químicas, las moléculas pequeñas, diluidas en PBS a una concentración final de 10  $\mu\text{M}$ , se añadieron a los pocillos durante una hora a temperatura ambiente, antes de añadir el fragmento scFv G4G11 a una concentración final de 100 nM durante otra hora más. La unión de G4G11 a Syk se evaluó por adición del anticuerpo monoclonal 9E10 conjugado con HRP que detecta la secuencia de aminoácidos EQKLISEEDLN de la proteína c-myc humana situada en el extremo C del fragmento scFv. Para generar mutantes de Syk, se utilizó mutagénesis dirigida sobre la proteína GST:Syk 6-242 y se evaluó la unión de G4G11 a los mutantes en presencia de 5  $\mu\text{M}$  de C-13.

3) Células, condiciones de cultivo y ensayos funcionales. Se utilizó el anticuerpo monoclonal IgE de ratón dirigido contra DNP 2682-I como sobrenadante del cultivo de hibridomas que contenían 1  $\mu\text{g/ml}$  de IgE. Se obtuvieron muestras de células de la médula ósea del hueso femoral, y se cultivaron en medio Opti-MEM (Gibco) suplementado con suero de feto de ternera al 10 % y sobrenadante de transfectantes X63 que secreta IL-3 de murino al 4 %. Se mantuvieron células basófilas RBL-2H3 (ATCC) de rata leucémica en un cultivo monocapa en medio RPMI 1640 suplementado con suero de feto de ternera al 10 % (Gibco). Se realizaron mediciones de la  $\beta$ -hexosaminidasa liberada por las células RBL-2H3 tal como se ha descrito anteriormente<sup>7</sup>, excepto en que, tras 12-16 horas de incubación con anti-DNP IgE (0,5  $\mu\text{g/ml}$ ), las células se incubaron durante 90 min a 37 °C en medio RPMI suplementado con las concentraciones especificadas de C-13 o DMF (0,25 %). Las células se estimularon durante 45 con DNP-BSA (50  $\text{ng ml}^{-1}$ ) o ionomicina (1,5  $\mu\text{M}$ ). Las células BMMC se incubaron durante una hora a 37 °C con anti-DNP IgE (100  $\text{ng/ml}$ ). Se incubaron a continuación con C-13 (3  $\mu\text{M}$ ) o DMF (0,3 %) durante 3 horas a 37 °C, y se estimularon con concentraciones variables de DNP-BSA. Se midió el nivel de  $\beta$ -hexosaminidasa 10 min después, y se realizó la titulación del TNF- $\alpha$  mediante un ensayo de citotoxicidad con células L929 tal como se ha descrito anteriormente<sup>10</sup>, 3 horas después de la estimulación. Los resultados ilustrados en la Figura 3 son representativos de tres experimentos independientes.

4) Inmunoprecipitaciones, ensayos *in vitro* de quinasa e inmunodetección. Todos los experimentos se realizaron tal como se ha descrito anteriormente<sup>7</sup>, excepto en que, antes de la estimulación con DNP-BSA (50  $\text{ng ml}^{-1}$ , 3 min), as células RBL-2H3 se incubaron durante 90 min a 37 °C en medio RPMI suplementado con las concentraciones especificadas de C-13 o DMF. Las células se solubilizaron en DOC tampón de lisis modificado (NP-40 al 1 %, desoxicolato de sodio al 0,25 %, SDS al 0,1 % en tampón PBS suplementado con inhibidores de la proteasa y de la fosfatasa) y se determinó la concentración de proteínas (BCA Protein Assay, PIERCE). Para las inmunoprecipitaciones, los lisados de células estimuladas y no estimuladas con IgE/DNP se incubaron con complejos previamente formados de anticuerpos y Sepharose GammaBind G, y se examinó la actividad quinasa *in vitro* de los inmunoprecipitados de Syk, Btk y Lyn. Antes de realizar la separación mediante gel SDS-PAGE, los lisados o los inmunoprecipitados se prepararon por adición de tampón de muestra SDS (Tris 60 mM, pH 8,8, SOS al 2,3 %, glicerol al 10 %, 0,01 % de azul de bromofenol). Las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Schleicher & Schuell), y se detectaron usando anticuerpos adecuados, y el sistema de quimioluminiscencia mejorado (ExactaCruz, Santa Cruz Biotechnology).

5) Análisis mediante citometría de flujo del nivel y la movilización del calcio y la expresión de Fc $\epsilon$ RI en la membrana. La concentración de calcio intracelular libre se determinó mezclando previamente  $1 \times 10^5$  células con 5 mM de Fluo-3 AM (Molecular Probes, Invitrogen) en presencia de Pluronic F-127 al 0,2 % durante 30 min a temperatura ambiente. Antes de la estimulación con DNP-BSA o ionomicina, las células se trataron durante 90 min a 37 °C en medio RPMI suplementado con C-13 o DMF (0,25 %), y se midió la concentración de calcio intracelular libre mediante un citómetro de flujo (Beckton Dickinson). Para evaluar la expresión superficial de Fc $\epsilon$ RI, las células se incubaron durante 2 h a 37 °C con anti-DNP IgE. La IgE unida a la membrana se detectó con una Ig dirigida contra ratón, y estreptavidina conjugada con Fitc.

6) Inducción de anafilaxia. Ratonas hembra BALB/c (con 6-8 semanas de edad) se adquirieron de Charles River y se mantuvieron en el animalario del IRCM en condiciones exentas de patógenos. Los protocolos de anafilaxia sistémica pasiva (PSA) dependiente de Ig y la anafilaxia pasiva cutánea (PCA) se realizaron como se ha descrito anteriormente<sup>11</sup>. En resumen, los ratones recibieron mediante inyección intravenosa 100 µg de IgE (SPE-7, Sigma) en 200 µl de PBS para PSA, o, mediante inyección intradérmica, 25 ng de IgE en 10 µl de PBS para PCA, y se estimularon 24 horas después mediante una inyección intravenosa de 1 mg de DNP-KLH en azul de Evans al 2 %. C-13, una molécula química irrelevante o el vehículo se administraron 1 hora antes de la estimulación, tanto por vía oral (PSA) en 200 µl de carboximetilcelulosa al 1 %, o localmente en la oreja mediante una inyección intradérmica (PCA) en una mezcla de acetona/aceite de oliva (4:1). Los animales se sacrificaron 20 min después de la estimulación. Se extirparon las orejas, se pesaron, y se extrajo el azul de Evans tras una incubación durante la noche en formamida a 80 °C. Para las mediciones de temperatura en PSA, C-13 (100 mg/kg) o el vehículo se administraron por vía oral, 3 horas antes de la estimulación realizada en ausencia de azul de Evans. La temperatura se midió usando un termómetro electrónico con una sonda rectal (YSI, Yellow Springs, Ohio) antes de la estimulación y a los 60 minutos después, antes del sacrificio. Se midió la absorbancia a 610 nm. Los experimentos se realizaron en 4-5 ratones por condición experimental. Los datos ilustrados en la Figura 4 son representativos de tres experimentos diferentes.

7) Estudios estructurales. Las cavidades tridimensionales con posibilidades de ser dianas farmacéuticas se predijeron usando Q-SiteFinder<sup>12</sup> y ICM13. La molécula C-13 se ancló usando LigandFit<sup>14</sup> y Surfex<sup>15</sup>. Se analizaron las primeras 20 posiciones, y una posición de consenso se proporciona en la Figura 1A. Las imágenes se generaron mediante PyMol.

8) Peritonitis (Figura 5). Se indujo el alistamiento de neutrófilos peritoneales dependiente de Syk en ratonas hembra BALB/c de 8 semanas de edad tal como se describe en 36 mediante la inyección intravenosa de 4 µg de toxina de *Bordetella pertussis* (donada por el Dr. D. Raze, Inserm, Lille, Francia) y 2 horas después mediante inyección intraperitoneal de tioglicolato al 4 % en agua estéril. Se realizó un lavado peritoneal con 5 ml de PBS 4 horas después, y el número total de neutrófilos se determinó tras marcado con un anticuerpo dirigido contra Gr1 conjugado con APC (Becton-Dickinson) y análisis mediante citometría de flujo. C-13 (100 mg/kg) en CMC o el vehículo solo se administraron por vía oral una hora antes de inyectar la toxina de *Bordetella pertussis*.

9) Purificación y proliferación *in vitro* de linfocitos B. Se purificaron linfocitos B de bazo procedentes de ratonas hembra BALB/c de 8 semanas de edad sobre perlas magnéticas mediante selección negativa usando microperlas revestidas con CD43 y usando columnas LS (Miltenyi Biotec) tal como se ha descrito anteriormente<sup>37</sup>. Después de dos horas de incubación con concentraciones variables de C-13 o vehículo, se cultivaron 50.000 células durante 48 horas en placas de 96 pocillos en presencia o ausencia de 10 µg/ml de IgG de mono dirigida contra el fragmento F(ab')<sub>2</sub> de IgM de ratón (Jackson ImmunoResearch). Se añadió azul alamar (Serotec) a los cultivos 24 horas antes de medir las formas reducidas, en comparación con las oxidadas, del reactivo a 570 y 620 nm, de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

10) Producción de anticuerpo (Figura 5C). Este experimento se realizó como se ha descrito en 38. Ratonas hembra BALB/c de 8 semanas de edad que recibieron una dosis oral de C-13 (150 mg/kg) en CMC al 1 % o el vehículo solo se inmunizaron 3 horas después mediante una inyección intraperitoneal de 10 µg de hemocianina de lapa californiana-hemocianina (TNP-KLH) en alúmina rehidratada (Reheiss). Se recogió suero antes de la inmunización y en el día 12. Se midieron los niveles de inmunoglobulina específica del antígeno mediante ELISA con 10 µg/ml de TNP-OVA (Biosearch technologies) unido a la placa como agente de captura. Los niveles de IgM, IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3 e IgA se midieron usando muestras diluidas a 1:5000 usando anticuerpos de cabra conjugados con peroxidasa y específicos de isotipo (Southern Biotechnology), mientras que los niveles de IgE se midieron usando muestras diluidas a 1:50 usando anticuerpos biotinilados de rata dirigidos contra IgE de ratón (Becton Dickinson) y estreptavidina conjugada con peroxidasa (R&D Systems). Tras la incubación con sustrato TMB, se midió la densidad óptica (OD) a 450 nm.

11) Análisis estadísticos. Los datos numéricos promedio se expresan como promedio ± desviaciones estándar (SD). Se usó la prueba de la t de Student para determinar la significancia estadística de las diferencias entre grupos.

12) Ensayo de toxicidad de C-13 sobre células BMMC. Para evaluar el posible efecto tóxico de C-13 sobre los mastocitos, se incubaron células BMMC durante 5 días a 37 °C en presencia de 2,5 µM o 5 µM de C-13, o DMF al 0,25 % (que corresponde a la concentración de DMF utilizada con 5 µM de C-13) en las mismas condiciones que los ensayos funcionales. El doble marcado con Anexina V y yoduro de propidio demostró el nivel de viabilidad de las células después de 3 horas y después de 5 días. Se midió en las mismas condiciones la viabilidad de las células BMMC tratadas en las mismas condiciones con estaurosporina.

## Referencias

1. Kambayashi T, Koretzky G A. Proximal signaling events in Fc epsilon RI-mediated mast cell activation. *J Allergy Clin Immunol* 2007; 119:544-52; quiz 53-4.

2. Rivera J, Gilfillan A M. Molecular regulation of mast cell activation. *J Allergy Clin Immunol* 2008; 117:1214-25; quiz 26.
- 5 3. Costello P S, Turner M, Walters A E, Cunningham C N, Bauer P H, Downward J, et al. Critical role for the tyrosine kinase Syk in signaling through the high affinity IgE receptor of mast cells. *Oncogene* 1996; 13:2595-605.
4. Wong W S, Leong K P. Tyrosine kinase inhibitors: a new approach for asthma. *Biochim Biophys Acta* 2004; 1897:53-69.
- 10 5. Turner M, Schweighoffer E, Colucci F, Di Santo J P, Tybulewicz V L. Tyrosine kinase Syk: essential functions for immunoreceptor signaling. *Immunol Today* 2000; 21:148-54.
8. Coopman P J, Mueller S C. The Syk tyrosine kinase: a new negative regulator in tumor growth and progression. *Cancer Lett* 2006; 241:159-73.
- 15 7. Dauvillier S, Merida P, Visintin M, Cattaneo A, Bonnerot C, Dariavach P. Intracellular single-chain variable fragments directed to the Src homology 2 domains of Syk partially inhibit Fc epsilon RI signaling in the RBL-2H3 cell line. *J Immunol* 2002; 169:2274-83.
- 20 8. Peneff C, Lefranc M P, Dariavach P. Characterisation and specificity of two single-chain Fv antibodies directed to the protein tyrosine kinase Syk. *J Immunol Methods* 2000; 236:105-15.
9. Lobato M N, Rabbitts T H. Intracellular antibodies and challenges facing their use as therapeutic agents. *Trends Mol Med* 2003; 9:390-8.
- 25 10. Latour S, Bonnerot C, Fridman W H, Daeron M. Induction of tumor necrosis factor-alpha production by mast cells via Fc gamma R. Role of the Fc gamma RIII gamma subunit. *J Immunol* 1992; 149:2155-62.
- 30 11. Dombrowicz D, Flamand V, Miyajima I, Ravetch J V, Galli S J, Kinet J P. Absence of Fc epsilon RI alpha chain results in upregulation of Fc gammaRIII-dependent mast cell degranulation and anaphylaxis. Evidence of competition between Fc epsilon RI and Fc gammaRIII for limiting amounts of FcR beta and gamma chains. *J Clin Invest* 1997; 99:915-25.
- 35 12. Laurie A T, Jackson R M. Q-SiteFinder: an energy-based method for the prediction of protein-ligand binding sites. *Bioinformatics* 2005; 21:1908-16.
13. An J, Totrov M, Abagyan R. Comprehensive identification of "druggable" protein ligand binding sites. *Genome Inform* 2004; 15:31-41.
- 40 14. Venkatachalam C M, Jiang X, Oldfield T, Waldman M. LigandFit: a novel method for the shape-directed rapid docking of ligands to protein active sites. *J Mol Graph Model* 2003; 21:289-307.
15. Jain A N. Surflex: fully automatic flexible molecular docking using a molecular similarity-based search engine. *J Med Chem* 2003; 46:499-511.
- 45 16. Frank R, Overwin H. SPOT synthesis. Epitope analysis with arrays of synthetic peptides prepared on cellulose membranes. *Methods Mol Biol* 1996; 66:149-69.
- 50 17. Futterer K, Wong J, Grucza R A, Chan A C, Waksman G. Structural basis for Syk tyrosine kinase ubiquity in signal transduction pathways revealed by the crystal structure of its regulatory SH2 domains bound to a dually phosphorylated ITAM peptide. *J Mol Biol* 1998; 281:523-37.
18. Nadler M J, Matthews S A, Turner H, Kinet J P. Signal transduction by the high-affinity immunoglobulin E receptor Fc epsilon R1: coupling form to function. *Adv Immunol* 2000; 76:325-55.
- 55 19. Parravicini V, Gadina M, Kovarova M, Odom S, Gonzalez-Espinosa C, Furumoto Y, et al. Fyn kinase initiates complementary signals required for IgE-dependent mast cell degranulation. *Nat Immunol* 2002; 3:741-8.
20. Rameh L E, Rhee S G, Spokes K, Kazlauskas A, Cantley L C, Cantley L G. Phosphoinositide 3-kinase regulates phospholipase Cgamma-mediated calcium signaling. *J Biol Chem* 1998; 273:23750-7.
- 60 21. Saitoh S, Odom S, Gomez G, Sommers C L, Young H A, Rivera J, et al. The four distal tyrosines are required for LAT-dependent signaling in Fc epsilon RI-mediated mast cell activation. *J Exp Med* 2003; 190:831-43.
- 65 22. Silverman M A, Shoag J, Wu J, Koretzky G A. Disruption of SLP-76 interaction with Gads inhibits dynamic clustering of SLP-76 and Fc epsilon RI signaling in mast cells. *Mol Cell Biol* 2006; 26:1826-38.

23. Hendricks-Taylor L R, Motto D G, Zhang J, Siraganian R P, Koretzky G A. SLP-76 is a substrate of the high affinity IgE receptor-stimulated protein tyrosine kinases in rat basophilic leukemia cells. *J Biol Chem* 1997; 272:1363-7.
- 5 24. Takata M, Kurosaki T. A role for Bruton's tyrosine kinase in B cell antigen receptor-mediated activation of phospholipase C-gamma 2, *J Exp Med* 1996; 184:31-40.
25. Law C L, Chandran K A, Sidorenko S P, Clark E A. Phospholipase C-gamma1 interacts with conserved phosphotyrosyl residues in the linker region of Syk and is a substrate for Syk. *Mol Cell Biol* 1996; 16:1305-15,
- 10 26. Pivniouk V I, Martin T R, Lu-Kuo J M, Katz H R, Oettgen H C, Geha R S. SLP-76 deficiency impairs signaling via the high-affinity IgE receptor in mast cells. *J Clin Invest* 1999; 103:1737-43.
27. Kettner A, Pivniouk V, Kumar L, Falet H, Lee J S, Mulligan R, et al. Structural requirements of SLP-78 in signaling via the high-affinity immunoglobulin E receptor (Fc epsilon RI) in mast cells. *Mol Cell Biol* 2003; 23:2395-406.
- 15 28. Manetz T S, Gonzalez-Espinosa C, Arudchandran R, Xirasagar S, Tybulewicz V, Rivera J. Vav1 regulates phospholipase cgamma activation and calcium responses in mast cells. *Mol Cell Biol* 2001; 21:3763-74.
- 20 29. Wilson B S, Pfeiffer J R, Oliver J M. FcepsilonRI signaling observed from the inside of the mast cell membrane. *Mol Immunol* 2002; 38:1259-68.
- 30 30. Wu J N, Jordan M S, Silverman M A, Peterson E J, Koretzky G A. Differential requirement for adapter proteins Src homology 2 domain-containing leukocyte phosphoprotein of 76 kDa and adhesion- and degranulation-promoting adapter protein in FcepsilonRI signaling and mast cell function. *J Immunol* 2004; 172:6768-74.
- 25 31. Barker S A, Caldwell K K, Pfeiffer J R, Wilson B S. Wortmannin-sensitive phosphorylation, translocation, and activation of PLCgamma1, but not PLCgamma2, in antigen-stimulated RBL-2H3 mast cells. *Mol Biol Cell* 1998; 9:483-96.
- 30 32. Fluckiger A C, Li Z, Kato R M, Wahl M I, Ochs H D, Longnecker R, et al. Btk/Tec kinases regulate sustained increases in intracellular Ca<sup>2+</sup> following B-cell receptor activation. *Embo J* 1998; 17:1973-85.
- 35 33. Scharenberg A M, El-Hillal O, Fruman D A, Beitz L O, Li Z, Lin S, et al. Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate (PtdIns-3,4,5-P3)/Tec kinase-dependent calcium signaling pathway: a target for SHIP-mediated inhibitory signals. *Embo J* 1998; 17:1961-72.
- 40 34. Wen R, Jou S T, Chen Y, Hoffmeyer A, Wang D. Phospholipase C gamma 2 is essential for specific functions of Fc epsilon R and Fc gamma R. *J Immunol* 2002; 169:6743-52.
- 35 35. Qi Q, August A. Keeping the (Kinase) Party Going: SLP-78 and ITK Dance to the Beat. *Sci STKE* 2007; 2007:pe39.
- 45 36. Mocsai A, Thou M, Meng F, Tybulewicz V L, Lowell C A, Syk is required for integrin signaling in neutrophils. *Immunity* 2002; 16: 547-558.
- 50 37. Matsumoto T, Guo Y J, Ikejima T, Yamada H. Induction of cell cycle regulatory proteins by murine B cell proliferating pectic polysaccharide from the roots of *Bupleurum falcatum* L. *Immunology letters* 2003; 89: 111-118.
38. Okkenhaug K, Bilancio A, Farjot G, Priddle H, Sancho S, Peskett E, et al. Impaired B and T cell antigen receptor signaling in p110delta PI 3-kinase mutant mice. *Science* 2002; 297: 1031-1034.
- 55 39. Gell P G H, Coombs R R A, eds. *Clinical Aspects of Immunology*. 1<sup>st</sup> ed. Oxford, Inglaterra: Blackwell; 1963
40. S. M. Berge et al. *Pharmaceutical Salts*, *J. Pharm. Sci*, 1977, 66:p. 1-19

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
- 5 <120> Moléculas que inhiben una ruta metabólica que implica la proteína tirosina quinasa Syk y procedimiento de identificación de dichas moléculas
- <130> B07504A
- 10 <140> AÚN DESCONOCIDO  
<141> AÚN DESCONOCIDA
- <150>FR 08/01959  
<151> 09-04-2008
- 15 <160>4
- <170> PatentIn versión 3.1
- 20 <210> 1  
<211> 635  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*
- 25 <400> 1

```

Met Ala Ser Ser Gly Met Ala Asp Ser Ala Asn His Leu Pro Phe Phe
 1           5           10           15

Phe Gly Asn Ile Thr Arg Glu Glu Ala Glu Asp Tyr Leu Val Gln Gly
      20           25           30

Gly Met Ser Asp Gly Leu Tyr Leu Leu Arg Gln Ser Arg Asn Tyr Leu
      35           40           45

Gly Gly Phe Ala Leu Ser Val Ala His Gly Arg Lys Ala His His Tyr
 50           55           60

Thr Ile Glu Arg Glu Leu Asn Gly Thr Tyr Ala Ile Ala Gly Gly Arg
65           70           75           80

Thr His Ala Ser Pro Ala Asp Leu Cys His Tyr His Ser Gln Glu Ser
      85           90           95

Asp Gly Leu Val Cys Leu Leu Lys Lys Pro Phe Asn Arg Pro Gln Gly
      100          105          110

Val Gln Pro Lys Thr Gly Pro Phe Glu Asp Leu Lys Glu Asn Leu Ile
 115          120          125
    
```

ES 2 537 518 T3

Arg Glu Tyr Val Lys Gln Thr Trp Asn Leu Gln Gly Gln Ala Leu Glu  
 130 135 140

Gln Ala Ile Ile Ser Gln Lys Pro Gln Leu Glu Lys Leu Ile Ala Thr  
 145 150 155 160

Thr Ala His Glu Lys Met Pro Trp Phe His Gly Lys Ile Ser Arg Glu  
 165 170 175

Glu Ser Glu Gln Ile Val Leu Ile Gly Ser Lys Thr Asn Gly Lys Phe  
 180 185 190

Leu Ile Arg Ala Arg Asp Asn Asn Gly Ser Tyr Ala Leu Cys Leu Leu  
 195 200 205

His Glu Gly Lys Val Leu His Tyr Arg Ile Asp Lys Asp Lys Thr Gly  
 210 215 220

Lys Leu Ser Ile Pro Glu Gly Lys Lys Phe Asp Thr Leu Trp Gln Leu  
 225 230 235 240

Val Glu His Tyr Ser Tyr Lys Ala Asp Gly Leu Leu Arg Val Leu Thr  
 245 250 255

Val Pro Cys Gln Lys Ile Gly Thr Gln Gly Asn Val Asn Phe Gly Gly  
 260 265 270

Arg Pro Gln Leu Pro Gly Ser His Pro Ala Thr Trp Ser Ala Gly Gly  
 275 280 285

Ile Ile Ser Arg Ile Lys Ser Tyr Ser Phe Pro Lys Pro Gly His Arg  
 290 295 300

Lys Ser Ser Pro Ala Gln Gly Asn Arg Gln Glu Ser Thr Val Ser Phe  
 305 310 315 320

Asn Pro Tyr Glu Pro Glu Leu Ala Pro Trp Ala Ala Asp Lys Gly Pro  
 325 330 335

Gln Arg Glu Ala Leu Pro Met Asp Thr Glu Val Tyr Glu Ser Pro Tyr  
 340 345 350

Ala Asp Pro Glu Glu Ile Arg Pro Lys Glu Val Tyr Leu Asp Arg Lys  
 355 360 365

Leu Leu Thr Leu Glu Asp Lys Glu Leu Gly Ser Gly Asn Phe Gly Thr



ES 2 537 518 T3

Arg Leu Arg Asn Tyr Tyr Tyr Asp Val Val Asn  
625 630 635

5 <210>2  
<211>269  
<212> PRT  
<213> Artificial

10 <220>  
<223> fragment de anticuerpo G4G11

<400> 2

Met Ala Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro  
1 5 10 15

Ser Asp Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Ser Gly Tyr Ser Ile Ser  
20 25 30

Ser Ser Asn Trp Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu  
35 40 45

Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr His Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro  
50 55 60

Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Lys Ser Lys Asn Gln  
65 70 75 80

Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr  
85 90 95

Tyr Cys Ala Arg Asn Val Gly Phe His Asp Trp Gly Gln Gly Thr Leu  
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly  
115 120 125

Gly Ser Ala Leu Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly  
130 135 140

Thr Pro Gly Gln Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn  
145 150 155 160

Ile Gly Ser Asn Tyr Val Tyr Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala  
165 170 175

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Asn Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro

ES 2 537 518 T3

	180		185		190														
Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Lys	Ser	Gly	Thr	Ser	Ala	Ser	Leu	Ala	Ile				
	195						200					205							
Ser	Gly	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Glu	Ala	Asp	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Ala	Trp				
	210					215					220								
Asp	Asp	Ser	Leu	Ala	Ser	Pro	Val	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Thr				
225					230					235					240				
Val	Leu	Gly	Ala	Ala	Ala	His	His	His	His	His	His	Gly	Ala	Ala	Glu				
				245					250					255					
Gln	Lys	Leu	Ile	Ser	Glu	Glu	Asp	Leu	Asn	Gly	Ala	Ala							
			260					265											

<210>3  
 <211> 269  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

5

<220>  
 <223> fragmento de anticuerpo G4E4

10

<400> 3

Met	Ala	Gln	Val	Gln	Leu	Gln	Glu	Ser	Gly	Pro	Gly	Leu	Val	Lys	Pro				
1				5					10					15					
Ser	Asp	Thr	Leu	Ser	Leu	Thr	Cys	Ala	Val	Ser	Gly	Tyr	Ser	Ile	Ser				
			20					25					30						
Ser	Ser	Asn	Trp	Trp	Gly	Trp	Ile	Arg	Gln	Pro	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu				
		35					40					45							
Glu	Trp	Ile	Gly	Tyr	Ile	Tyr	His	Ser	Gly	Ser	Thr	Tyr	Tyr	Asn	Pro				
	50					55					60								
Ser	Leu	Lys	Ser	Arg	Val	Thr	Ile	Ser	Val	Asp	Lys	Ser	Lys	Asn	Gln				
65					70					75					80				
Phe	Ser	Leu	Lys	Leu	Ser	Ser	Val	Thr	Ala	Ala	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr				
				85					90					95					
Tyr	Cys	Ala	Arg	Asn	Val	Gly	Phe	His	Asp	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu				
			100					105					110						

ES 2 537 518 T3

Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly  
 115 120 125

Gly Ser Ala Leu Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly  
 130 135 140

Thr Pro Gly Gln Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn  
 145 150 155 160

Ile Gly Ser Asn Thr Val Asn Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala  
 165 170 175

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Asn Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro  
 180 185 190

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile  
 195 200 205

Ser Gly Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp  
 210 215 220

Asp Asp Ser Leu Phe Gly Ala Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr  
 225 230 235 240

Val Leu Gly Ala Ala Ala His His His His His His Gly Ala Ala Glu  
 245 250 255

Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Gly Ala Ala  
 260 265

<210>4  
 <211> 629  
 <212> PRT  
 <213> *Mus musculus*

5

<400> 4

Met Ala Gly Ser Ala Val Asp Ser Ala Asn His Leu Thr Tyr Phe Phe  
 1 5 10 15

Gly Asn Ile Thr Arg Glu Glu Ala Glu Asp Tyr Leu Val Gln Gly Gly  
 20 25 30

Met Thr Asp Gly Leu Tyr Leu Leu Arg Gln Ser Arg Asn Tyr Leu Gly  
 35 40 45

Gly Phe Ala Leu Ser Val Ala His Asn Arg Lys Ala His His Tyr Thr  
 50 55 60

10

ES 2 537 518 T3

Ile Glu Arg Glu Leu Asn Gly Thr Tyr Ala Ile Ser Gly Gly Arg Ala  
65 70 75 80

His Ala Ser Pro Ala Asp Leu Cys His Tyr His Ser Gln Glu Pro Asp  
85 90 95

Gly Leu Ile Cys Leu Leu Lys Lys Pro Phe Asn Arg Pro Pro Gly Val  
100 105 110

Gln Pro Lys Thr Gly Pro Phe Glu Asp Leu Lys Glu Asn Leu Ile Arg  
115 120 125

Glu Tyr Val Lys Gln Thr Trp Asn Leu Gln Gly Gln Ala Leu Glu Gln  
130 135 140

Ala Ile Ile Ser Gln Lys Pro Gln Leu Glu Lys Leu Ile Ala Thr Thr  
145 150 155 160

Ala His Glu Lys Met Pro Trp Phe His Gly Asn Ile Ser Arg Asp Glu  
165 170 175

Ser Glu Gln Thr Val Leu Ile Gly Ser Lys Thr Asn Gly Lys Phe Leu  
180 185 190

Ile Arg Ala Arg Asp Asn Ser Gly Ser Tyr Ala Leu Cys Leu Leu His  
195 200 205

Glu Gly Lys Val Leu His Tyr Arg Ile Asp Arg Asp Lys Thr Gly Lys  
210 215 220

Leu Ser Ile Pro Glu Gly Lys Lys Phe Asp Thr Leu Trp Gln Leu Val  
225 230 235 240

Glu His Tyr Ser Tyr Lys Pro Asp Gly Leu Leu Arg Val Leu Thr Val  
245 250 255

Pro Cys Gln Lys Ile Gly Ala Gln Met Gly His Pro Gly Ser Pro Asn  
260 265 270

Ala His Pro Val Thr Trp Ser Pro Gly Gly Ile Ile Ser Arg Ile Lys  
275 280 285

Ser Tyr Ser Phe Pro Lys Pro Gly His Lys Lys Pro Ala Pro Pro Gln  
290 295 300

ES 2 537 518 T3

Gly Ser Arg Pro Glu Ser Thr Val Ser Phe Asn Pro Tyr Glu Pro Thr  
 305 310 315 320

Gly Gly Pro Trp Gly Pro Asp Arg Gly Leu Gln Arg Glu Ala Leu Pro  
 325 330 335

Met Asp Thr Glu Val Tyr Glu Ser Pro Tyr Ala Asp Pro Glu Glu Ile  
 340 345 350

Arg Pro Lys Glu Val Tyr Leu Asp Arg Ser Leu Leu Thr Leu Glu Asp  
 355 360 365

Asn Glu Leu Gly Ser Gly Asn Phe Gly Thr Val Lys Lys Gly Tyr Tyr  
 370 375 380

Gln Met Lys Lys Val Val Lys Thr Val Ala Val Lys Ile Leu Lys Asn  
 385 390 395 400

Glu Ala Asn Asp Pro Ala Leu Lys Asp Glu Leu Leu Ala Glu Ala Asn  
 405 410 415

Val Met Gln Gln Leu Asp Asn Pro Tyr Ile Val Arg Met Ile Gly Ile  
 420 425 430

Cys Glu Ala Glu Ser Trp Met Leu Val Met Glu Met Ala Glu Leu Gly  
 435 440 445

Pro Leu Asn Lys Tyr Leu Gln Gln Asn Arg His Ile Lys Asp Lys Asn  
 450 455 460

Ile Ile Glu Leu Val His Gln Val Ser Met Gly Met Lys Tyr Leu Glu  
 465 470 475 480

Glu Ser Asn Phe Val His Arg Asp Leu Ala Ala Arg Asn Val Leu Leu  
 485 490 495

Val Thr Gln His Tyr Ala Lys Ile Ser Asp Phe Gly Leu Ser Lys Ala  
 500 505 510

Leu Arg Ala Asp Glu Asn Tyr Tyr Lys Ala Gln Thr His Gly Lys Trp  
 515 520 525

Pro Val Lys Trp Tyr Ala Pro Glu Cys Ile Asn Tyr Tyr Lys Phe Ser  
 530 535 540

ES 2 537 518 T3

Ser Lys Ser Asp Val Trp Ser Phe Gly Val Leu Met Trp Glu Ala Phe  
545 550 555 560

Ser Tyr Gly Gln Lys Pro Tyr Arg Gly Met Lys Gly Ser Glu Val Thr  
565 570 575

Ala Met Leu Glu Lys Gly Glu Arg Met Gly Cys Pro Ala Gly Cys Pro  
580 585 590

Arg Glu Met Tyr Asp Leu Met Asn Leu Cys Trp Thr Tyr Asp Val Glu  
595 600 605

Asn Arg Pro Gly Phe Thr Ala Val Glu Leu Arg Leu Arg Asn Tyr Tyr  
610 615 620

Tyr Asp Val Val Asn  
625

## REIVINDICACIONES

1. Molécula que se une a la proteína tirosina quinasa Syk en una cavidad tridimensional que comprende el resto arginina situado en la posición 68 y los dos restos ácido glutámico situados en las posiciones 121 y 155 de la proteína tirosina quinasa Syk humana, cuya secuencia se define en la SED ID N° 1, y (b) que puede inhibir al menos en un 10 % *in vitro* la unión de

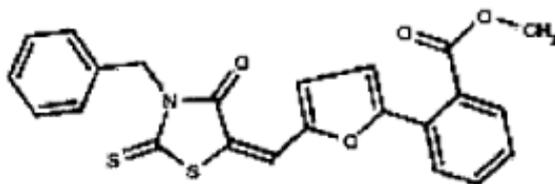
(i) el fragmento de anticuerpo G4G11 (SEC ID N° 2), o bien,

(ii) un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se une a la tirosina quinasa Syk humana en un epítipo que comprende al menos uno de los restos 65 a 74 de la secuencia de aminoácidos de la proteína tirosina quinasa Syk humana (SEC ID N° 1), o bien,

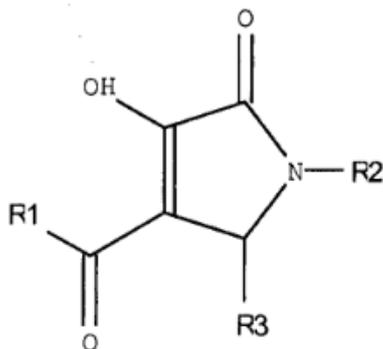
(iii) un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se une con la proteína tirosina quinasa Syk humana e inhibe en al menos un 10 % la unión del fragmento de anticuerpo G4G11 con la proteína tirosina quinasa Syk humana (SEC ID N° 1), con la proteína tirosina quinasa Syk humana o con una de sus variantes en animales, para su uso en la prevención o el tratamiento de una patología dependiente de una ruta metabólica que implica a Syk en el ser humano o el animal,

en la que dicha patología está causada por una hipersensibilidad de tipo I, o es la poliartritis reumatoide, una enfermedad autoinmune, una inflamación o un cáncer,

en la que dicha molécula es la molécula C-13 que tiene la fórmula



o es una molécula orgánica que tiene un peso molecular comprendido entre 50 y 2500 Da, equivalente desde el punto de vista funcional a la molécula C-13, seleccionada entre las moléculas que tienen una de las siguientes fórmulas:

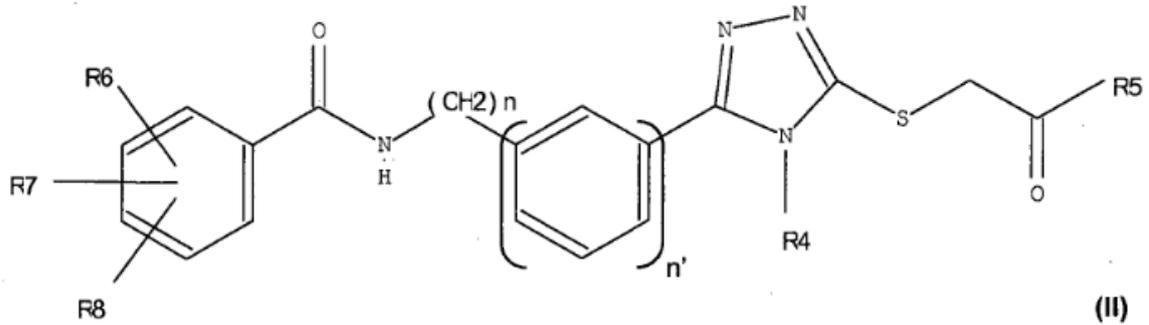


(I)

en las que

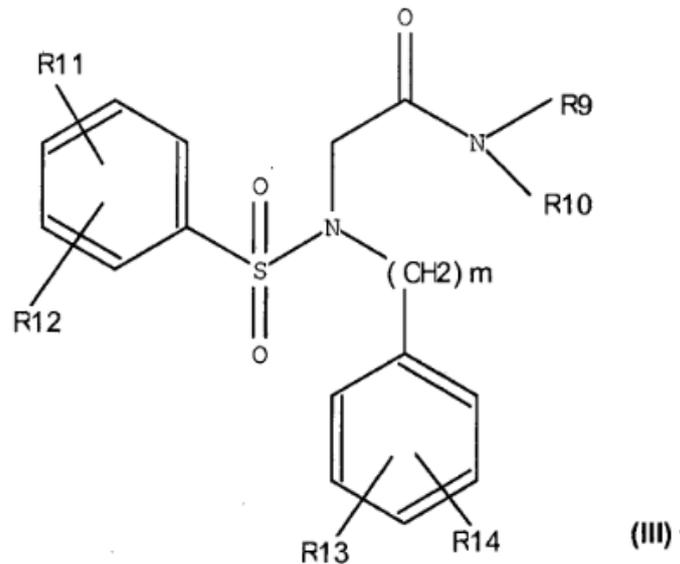
- R1 es un grupo aromático sustituido o no sustituido, o un heterociclo sustituido o no sustituido que comprende al menos un átomo de S, O o N;
- R2 es un grupo aromático sustituido o no sustituido, un heterociclo no sustituido o sustituido, una cadena de carbono saturada o insaturada que comprende un grupo amino, una cadena de carbono saturada o insaturada que comprende un grupo aromático sustituido o no sustituido o una cadena de carbono insaturada o saturada que comprende un heterociclo sustituido o no sustituido que comprende al menos un átomo de S, O o N;
- R3 es un grupo fenilo, 2-piridinilo, 3-piridinilo o 4-piridinilo sustituido o no sustituido,

o bien,



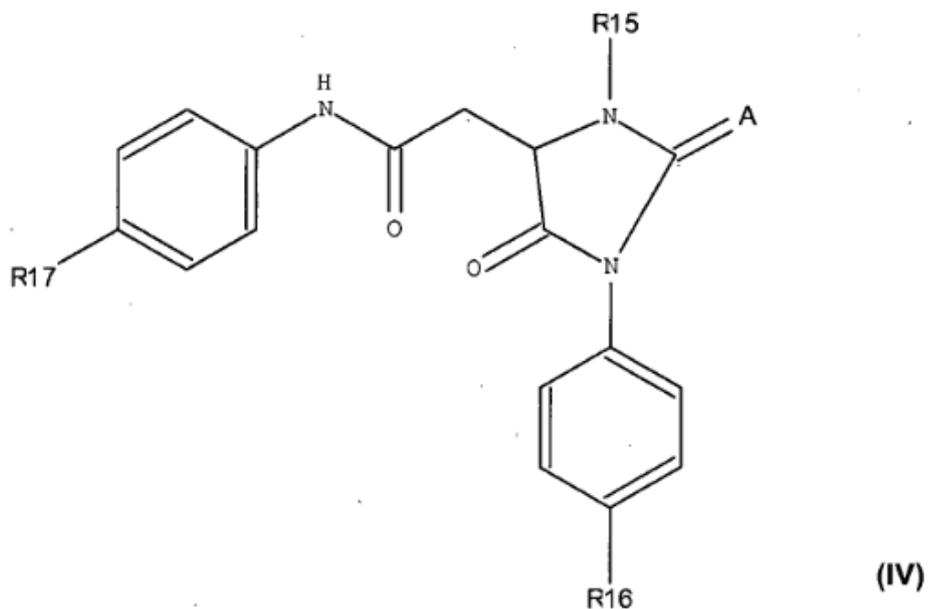
en las que

- 5
- $n=0$  o  $1$ ;  $n'=0$  o  $1$ ;
  - R4 es una cadena de carbono saturada o insaturada que comprende de 1 a 5 átomos de carbono, sustituida o no sustituida con un grupo aromático;
  - R5 es un grupo aromático sustituido o no sustituido o un grupo amino sustituido o no sustituido;
- 10
- R6 es un átomo de hidrógeno, un grupo alcoxi, un grupo alquilo o halógeno;
  - R7 es un átomo de hidrógeno, un grupo alcoxi, un grupo alquilo o halógeno;
  - R8 es un átomo de hidrógeno, un grupo alcoxi, un grupo alquilo o halógeno;
- o bien,



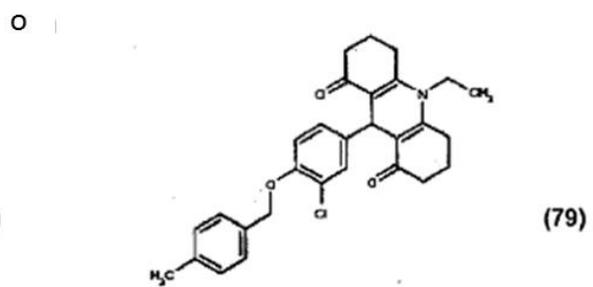
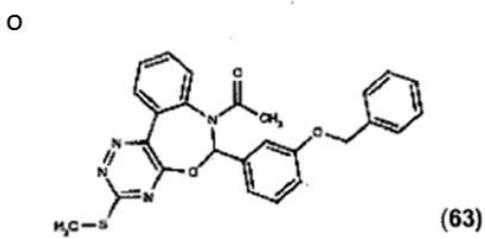
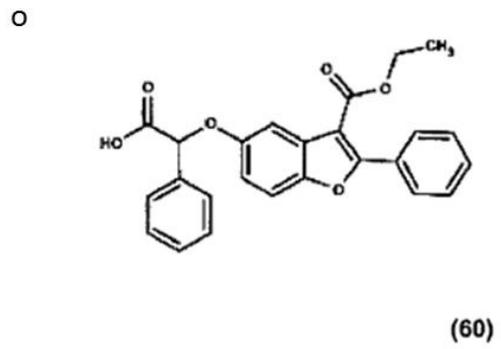
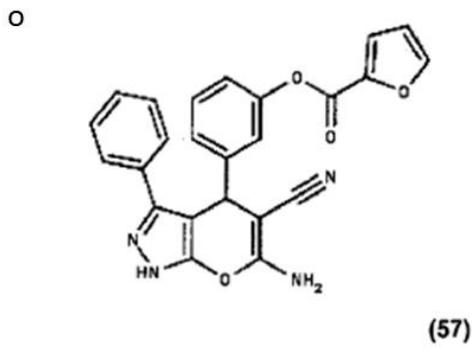
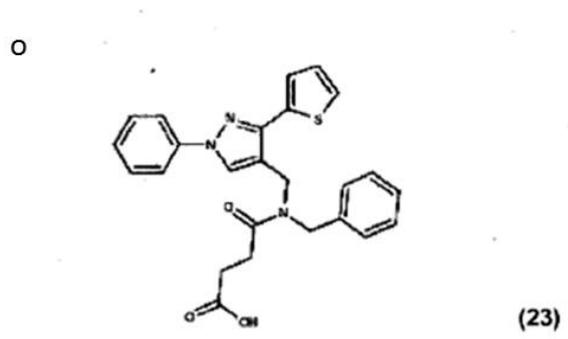
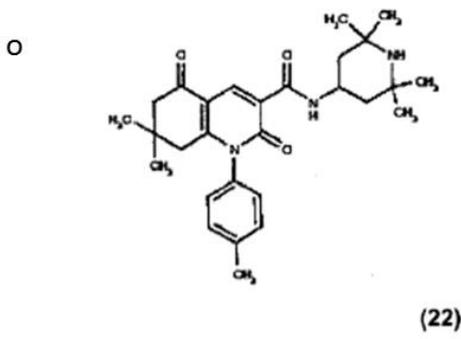
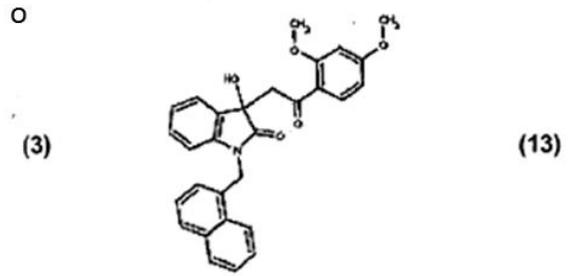
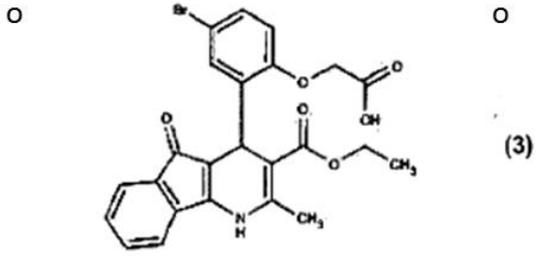
15 en las que

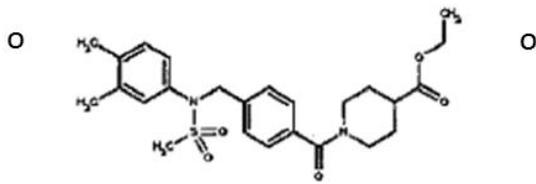
- $m = 0, 1$  o  $2$ ;
  - R9 es un átomo de hidrógeno y R10 es un grupo fenilo sustituido o no sustituido, o R9 y R10 forman parte del mismo heterociclo sustituido o no sustituido, o R9 y R10 forman parte del mismo grupo aromático sustituido o no sustituido;
  - R11 es un átomo de hidrógeno, un grupo alcoxi o grupo alquilo;
  - R12 es un átomo de hidrógeno, un grupo alcoxi o grupo alquilo;
  - R13 es un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo o alcoxi;
  - R14 es un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo o alcoxi;
- 20
- 25 o bien,



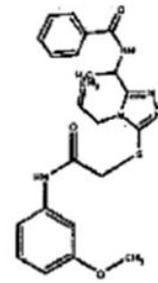
en las que

- 5
- A es un átomo de oxígeno o de azufre;
  - R15 es una cadena de carbono saturada o insaturada que comprende de 1, 2 o 3 átomos de carbono, sustituida o no sustituida por un grupo aromático sustituido o no sustituido, un heterociclo sustituido o no sustituido o un grupo amino que pertenece a un heterociclo sustituido o no sustituido;
- 10
- R16 es un átomo de hidrógeno, un halógeno o un grupo alcoxi;
  - R17 es un átomo de hidrógeno, un grupo alcoxi o grupo acetoxi;

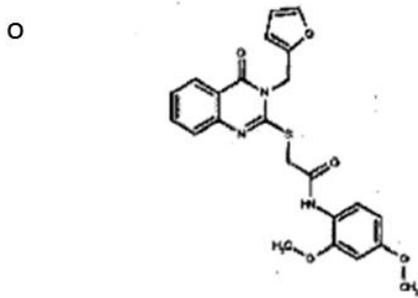




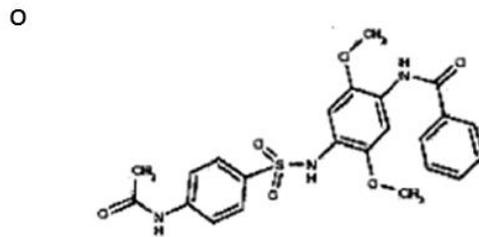
(80)



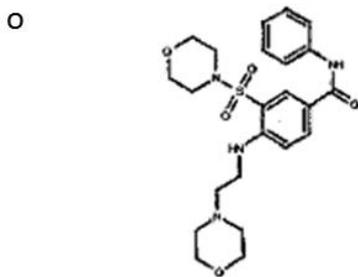
(66)



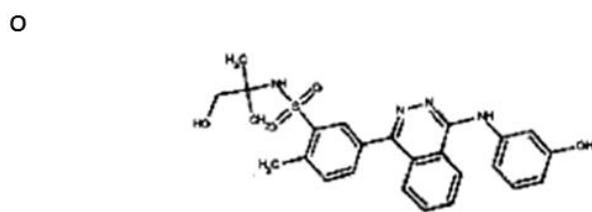
(69)



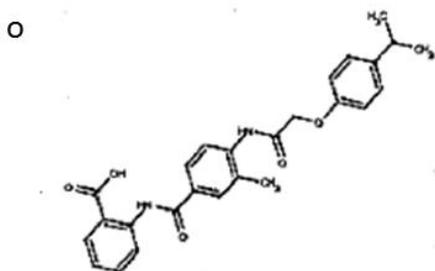
(21)



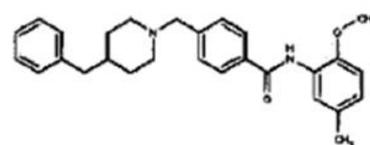
(46)



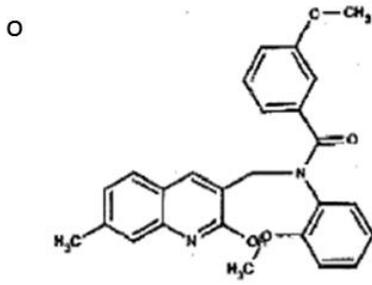
(67)



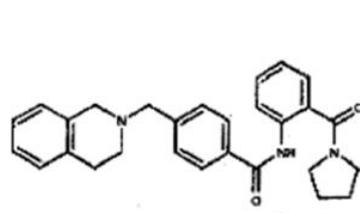
(49)



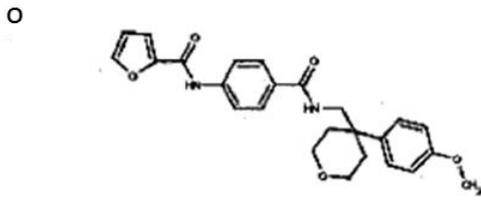
(17)



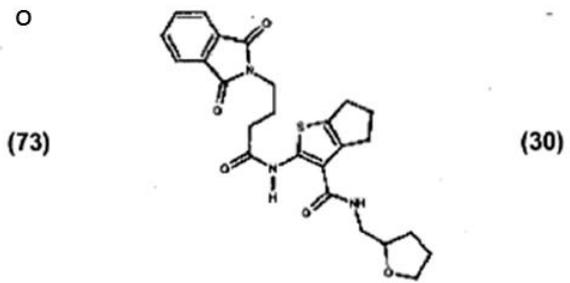
(70)



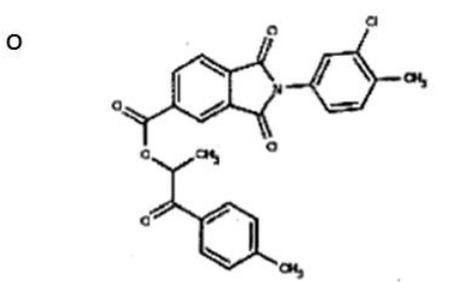
(78)



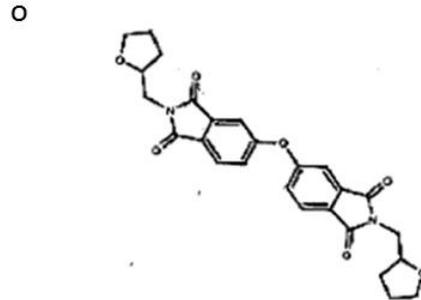
(73)



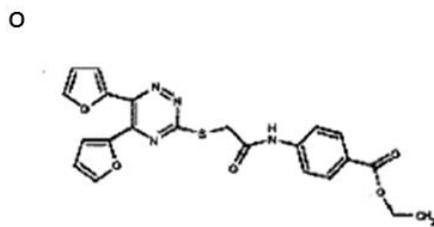
(30)



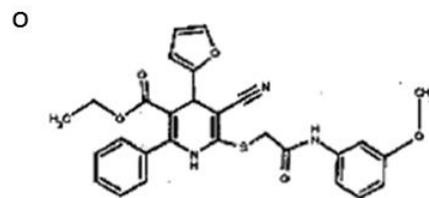
(41)



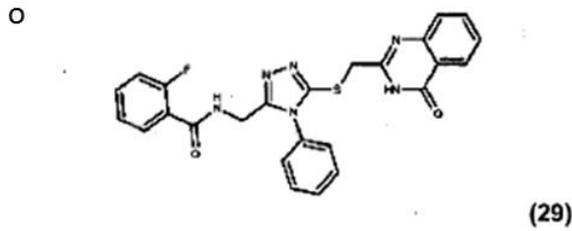
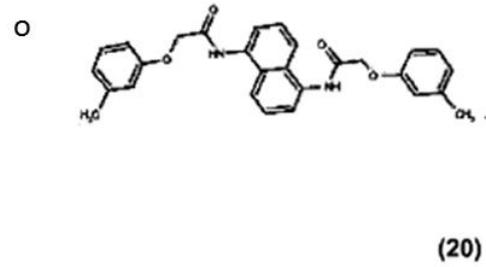
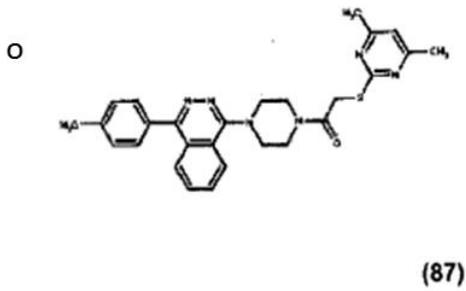
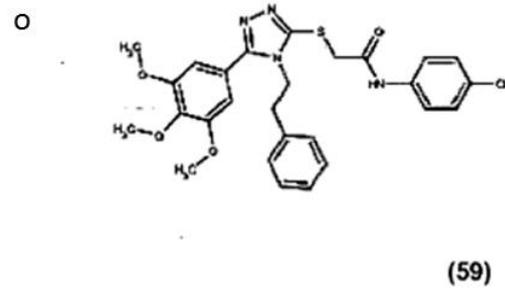
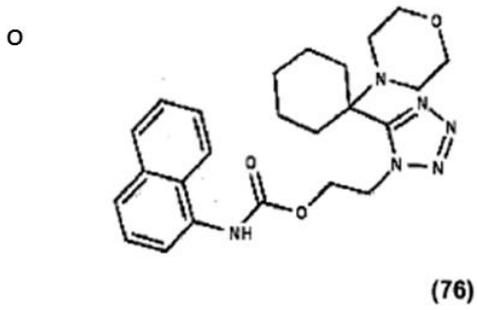
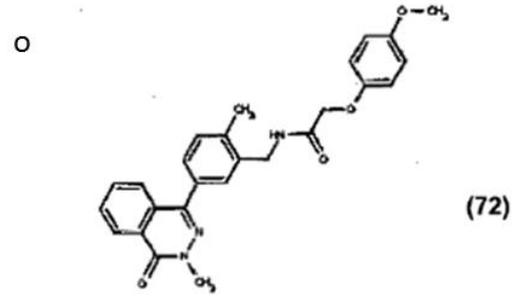
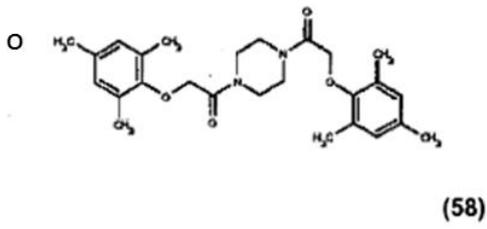
(62)



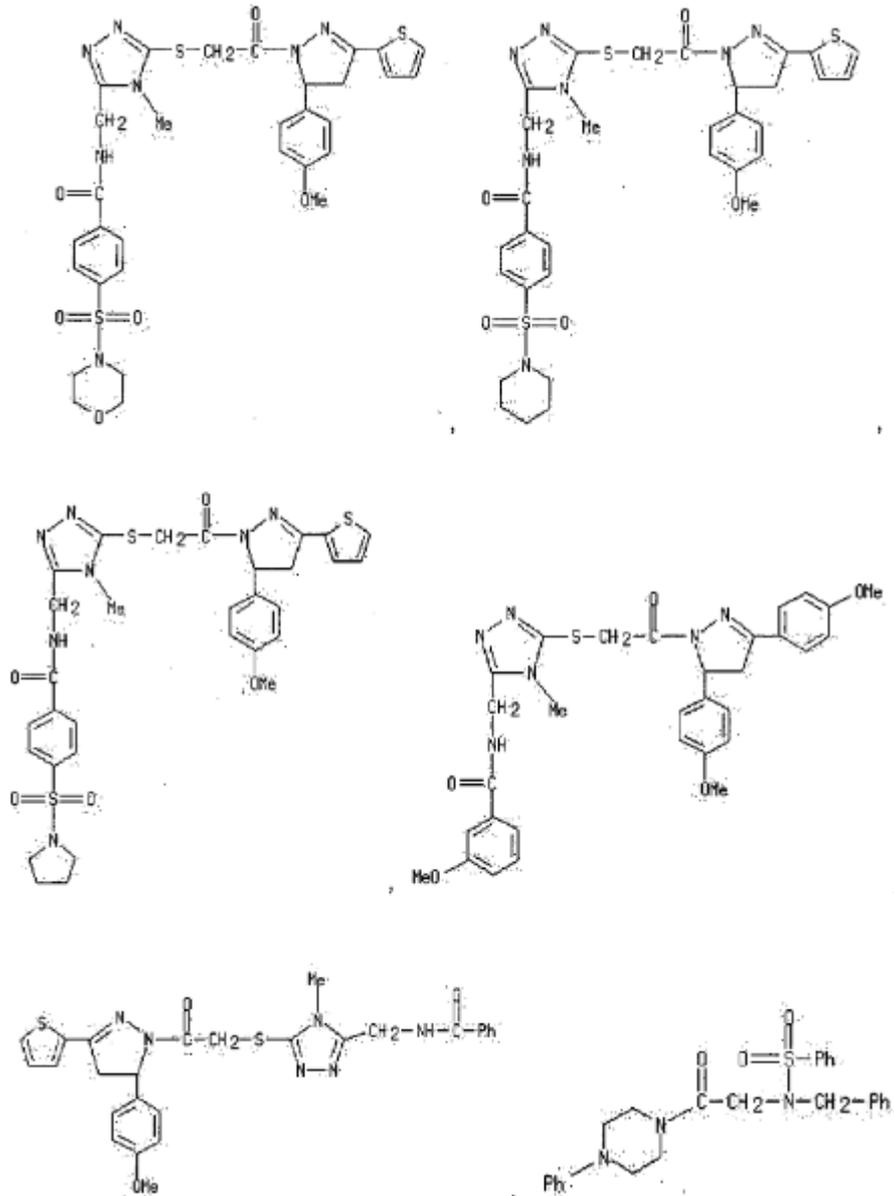
(54)



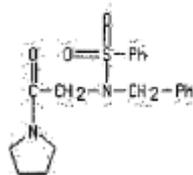
(55)



5 o un estereoisómero, racemato o sal farmacológicamente aceptable de C-13 o de dicha molécula equivalente;  
o bien si dicha molécula se selecciona entre las siguientes fórmulas



y



5

no se utiliza junto con un agonista de un receptor de glucocorticoides.

2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho anticuerpo o fragmento de anticuerpo se une a la tirosina quinasa Syk humana en un epítipo que comprende al menos 5 de los restos 65 a 74 de la secuencia de aminoácidos de la proteína tirosina quinasa Syk humana (SEC ID N° 1).

3. Molécula para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en la que la cavidad tridimensional comprende además el resto serina situado en la posición 9, el resto glutamina situado en la posición 43, el resto fenilalanina situado en la posición 51, el resto isoleucina situado en la posición 66, los restos glutamato situados en las

15

posiciones 67 y 69, el resto leucina situado en la posición 70, el resto asparagina situado en la posición 71, el resto glicina situado en la posición 72, el resto treonina situado en la posición 73, el resto tirosina situado en la posición 74 y el resto alanina situado en la posición 75 de la proteína Syk humana que tiene la secuencia mostrada en la SEC ID nº 1.

5 4. Molécula para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 en la que dicha molécula se utiliza en la prevención o el tratamiento de reacciones de hipersensibilidad de tipo I, y en la que dicha molécula inhibe en un 50% *in vitro* la desgranulación de mastocitos dependiente de IgE a una concentración (CI50) comprendida entre 1 ng/l y 1 mg/l.

10 5. Molécula para su uso de acuerdo con la reivindicación 4 en la que dicha ruta metabólica que implica Syk es una ruta de activación de mastocitos o de basófilos.

15 6. Molécula para su uso de acuerdo con la reivindicación 4 o 5 en la que dicha dolencia es asma alérgica, conjuntivitis alérgica, rinitis alérgica, anafilaxia, angioedema, urticaria, eosinofilia o una alergia a un antibiótico.

20 7. Molécula para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 6 en la que dicha molécula no tiene efecto sobre las rutas metabólicas que implican la proteína Syk humana (SEC ID Nº 1) salvo las que ocasionan la desgranulación de los mastocitos y/o las reacciones de hipersensibilidad de tipo I, especialmente sobre la respuesta de anticuerpos después de una inmunización mediante un antígeno dependiente del timo o sobre el alistamiento de neutrófilos dependiente de Syk.

25 8. Molécula para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 en la que dicha ruta metabólica que implica Syk es una ruta de activación de linfocitos B, linfocitos T, neutrófilos, eosinófilos, células NK, plaquetas, eritrocitos, osteoclastos, células epiteliales o células cancerosas.

9. Molécula para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 en la que dicha molécula se usa junto con otra molécula terapéutica, y en la que dicha otra molécula terapéutica

- 30
- es también una molécula utilizada en la prevención o el tratamiento de una dolencia dependiente de una ruta metabólica que implica Syk, o
  - se trata de una molécula utilizada en la prevención o el tratamiento de una dolencia no dependiente de una ruta metabólica que implica Syk.

35 10. Molécula para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 en la que dicha molécula está destinada a administrarse por vía oral, sublingual, nasa, ocular, local, intravenosa, intraperitoneal, subcutánea, por aerosol o por inhalación, a pacientes humanos adultos, niños o recién nacidos, y con dosis comprendidas entre 0,01 mg/kg y 200 mg/kg.

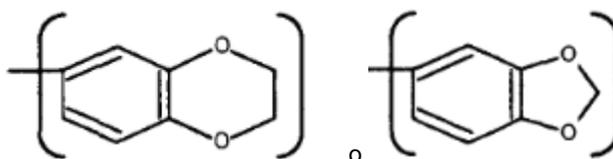
40 11. Molécula para su uso de acuerdo con la reivindicación 10 en la que dicha molécula equivalente se selecciona entre las moléculas que tienen cualquiera de las siguientes fórmulas:

- la fórmula (I) en la que

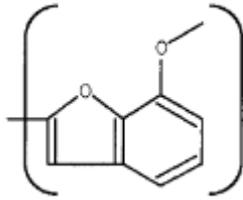
45 - R1 es

- un grupo fenilo, sustituido o no sustituido con un átomo F o Cl, un grupo metilo o etilo, una N,N-dimetilsulfonamida o dos grupos seleccionados entre grupos metilo, etilo, hidroxilo, metoxi o etoxi;
- o un grupo

50



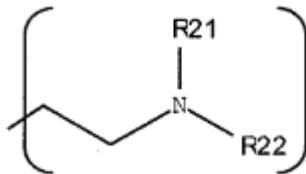
o



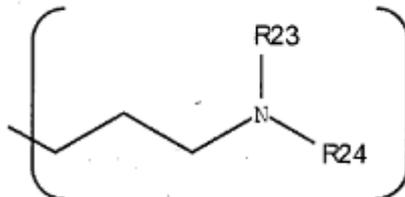
- 5
- o un grupo furano sustituido o no sustituido por un grupo metilo, etilo, hidroxilo, metoxi o etoxi; o bien,
  - o un grupo tiofeno sustituido o no sustituido por un grupo metilo, etilo, hidroxilo, metoxi o etoxi;

- R2 es

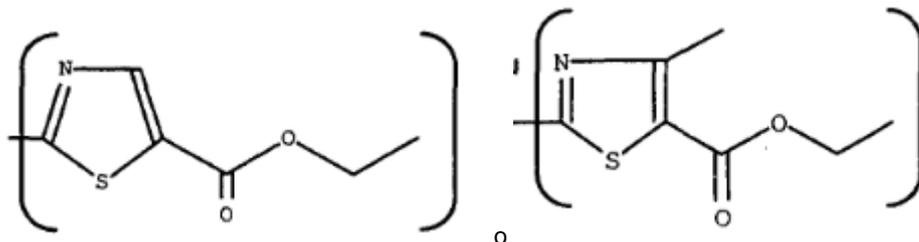
- un grupo

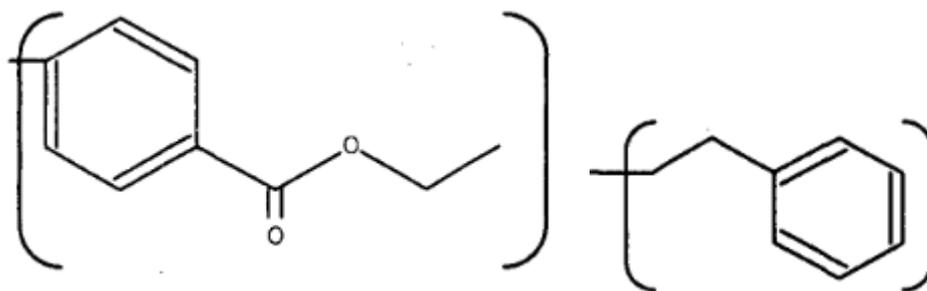


- 10
- en la que R21 y R22 son átomos de carbono, perteneciendo cada uno de ellos a una cadena de alquilo que comprende 1, 2 o 3 átomos de carbono, o perteneciendo ambos, junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos, al mismo heterociclo saturado o insaturado que comprende también un átomo de oxígeno o un segundo átomo de nitrógeno;
- 15
- o un grupo



- 20
- en la que R23 y R24 son átomos de carbono, perteneciendo cada uno de ellos a una cadena de alquilo que comprende 1, 2 o 3 átomos de carbono, o perteneciendo ambos, junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos, al mismo heterociclo saturado o insaturado que comprende también un átomo de oxígeno o un segundo átomo de nitrógeno; o bien,
- 25
- o bien un grupo

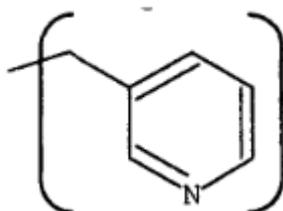




o

o

o



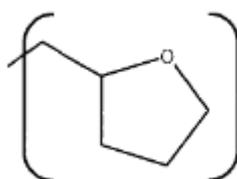
5

- y R3 es

- 10
- o un grupo 2-piridinilo, 3-piridinilo o 4-piridinilo no sustituido,
  - o un grupo fenilo sustituido o no sustituido con un grupo benzoxi, y/o mediante un grupo hidroxilo, y/o mediante un grupo metilo, y/o mediante un grupo etilo, y/o mediante un grupo propilo, y/o mediante uno o dos átomos de Br, F o Cl, y/o de uno a tres grupos hidroxilo, metoxi o etoxi. metoxi o etoxi;

o bien,

- 15
- la fórmula (II) en la que
    - R4 es una cadena de carbono saturada o insaturada que comprende de 1, 2 o 3 átomos de carbono;
    - grupo R5 es un grupo fenilo o un grupo amino secundario sustituido o no sustituido por un grupo fenilo sustituido o no sustituido, o mediante un grupo
- 20



- 25
- R6 es un átomo de hidrógeno o cloro, o un grupo metilo, etilo, hidroxilo, metoxi o etoxi;
  - R7 es un átomo de hidrógeno o cloro, o un grupo metilo, etilo, hidroxilo, metoxi o etoxi;
  - R8 es un átomo de hidrógeno o cloro, o un grupo metilo, etilo, hidroxilo, metoxi o etoxi.

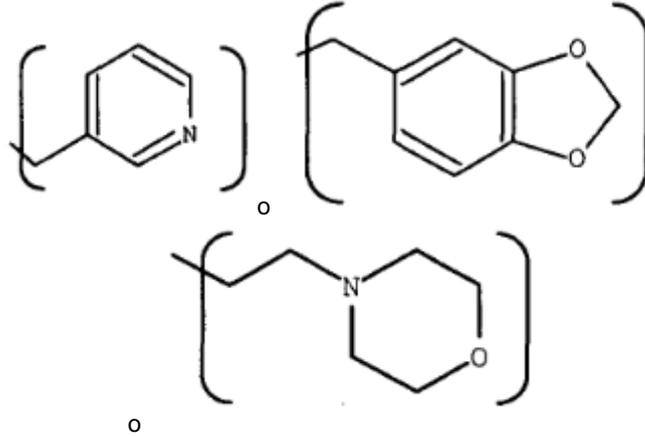
o bien,

- 30
- la fórmula (III) en la que
    - R9 es un átomo de hidrógeno y el grupo R10 es un grupo fenilo sustituido o no sustituido, o los grupos R9 y R10 pertenecen al mismo heterociclo sustituido o no sustituido que comprende dos átomos de nitrógeno y 4 átomos de carbono;
    - R11 es un átomo de hidrógeno o un grupo metilo, etilo, hidroxilo, metoxi o etoxi;
    - R12 es un átomo de hidrógeno o un grupo metilo, etilo, hidroxilo, metoxi o etoxi;
    - R13 es un átomo de hidrógeno o un grupo metilo, etilo, hidroxilo, metoxi o etoxi;
    - R14 es un átomo de hidrógeno o un grupo metilo, etilo, hidroxilo, metoxi o etoxi;
- 35

40 o bien,

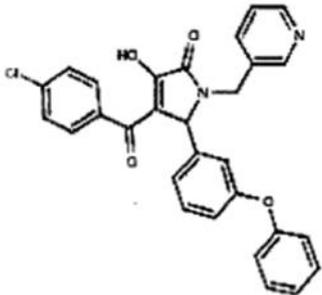
- la fórmula (IV) en la que
  - A es un átomo de oxígeno o de azufre;
  - R15 es un grupo

5



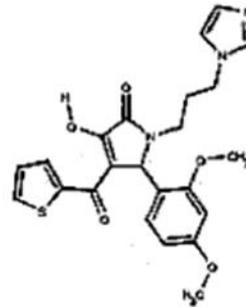
- 10
- R16 es un átomo de hidrógeno o cloro, o un grupo metilo, etilo, hidroxilo, metoxi o etoxi;
  - R17 es un grupo metilo, etilo, hidroxilo, metoxi, etoxi, acetoxi, metoxicarbonilo o etoxicarbonilo.

12. Molécula para su uso de acuerdo con la reivindicación 10 en la que dicha molécula equivalente se selecciona entre las moléculas siguientes:



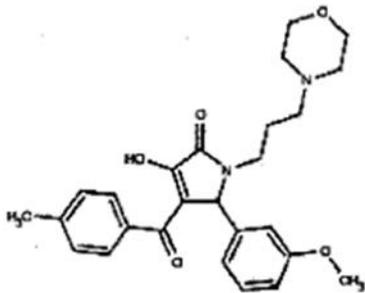
(1)

o



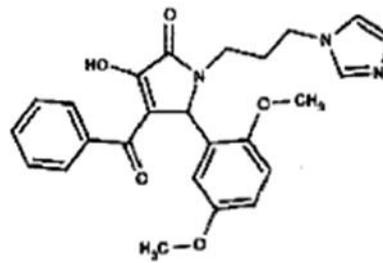
(2)

o



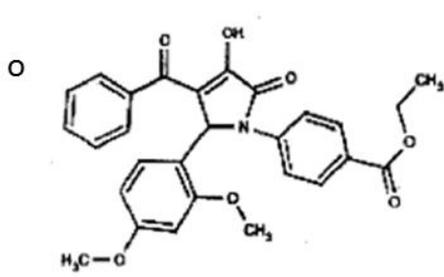
(4)

o

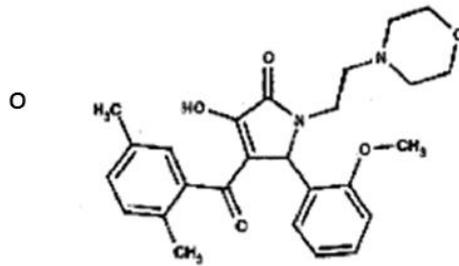


(5)

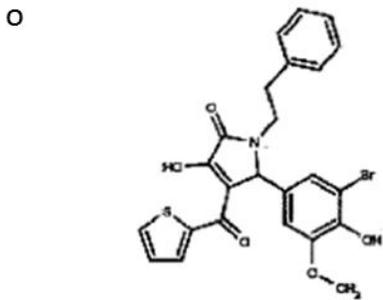
15



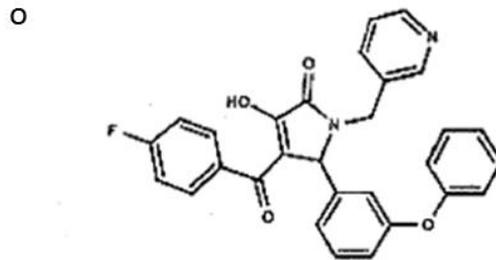
(6)



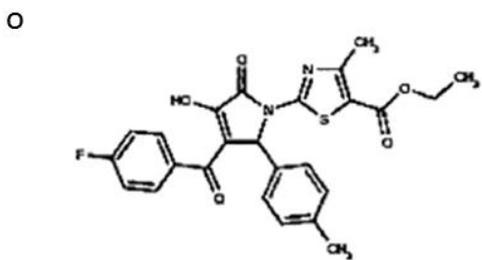
(7)



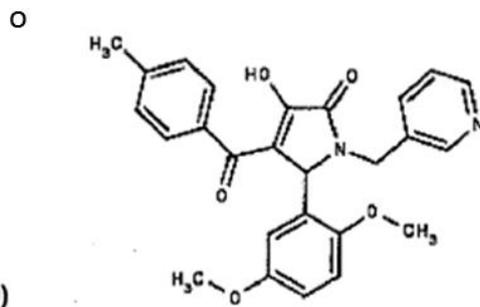
(8)



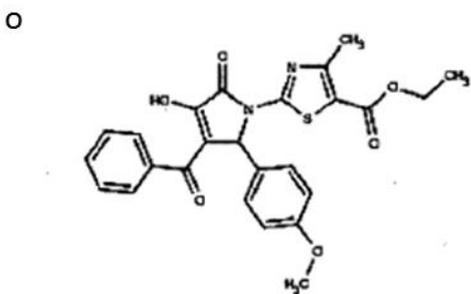
(9)



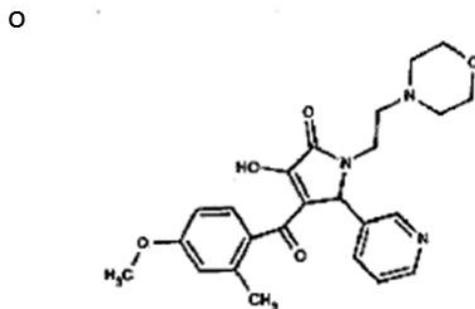
(10)



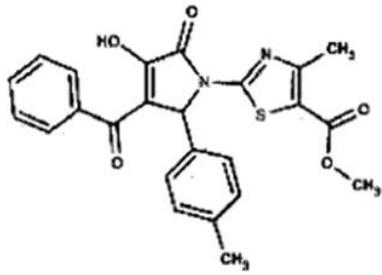
(11)



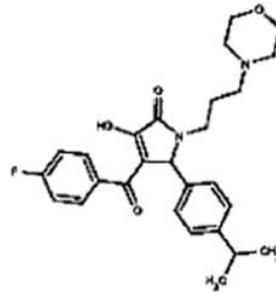
(12)



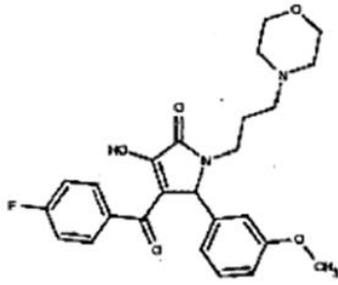
(14)



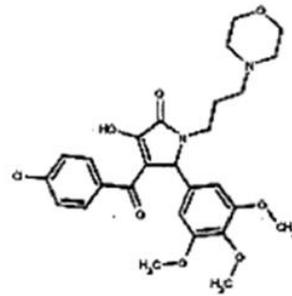
(16)



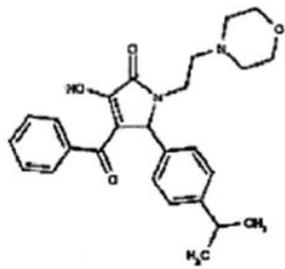
(19)



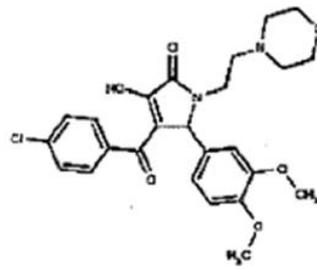
(24)



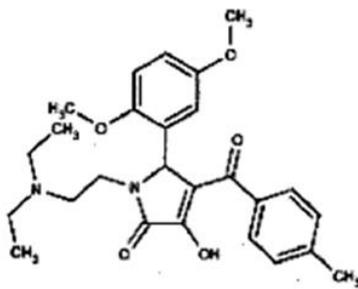
(25)



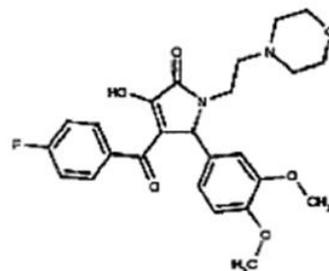
(26)



(27)

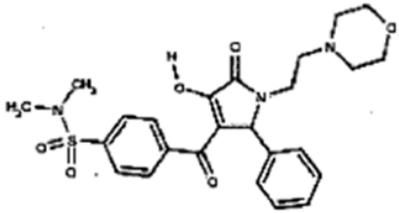


(28)



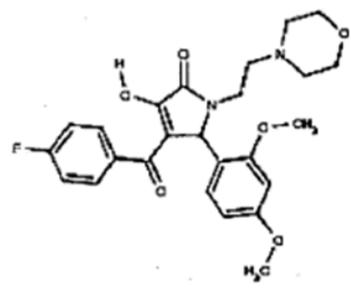
(31)

O



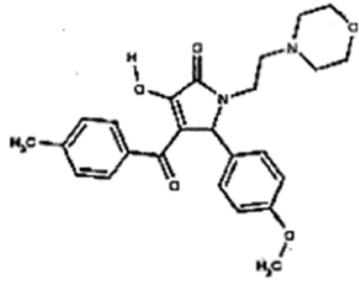
(32)

O



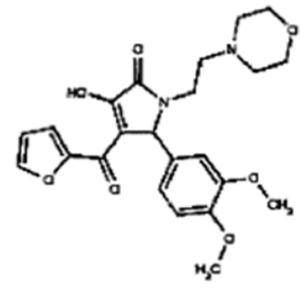
(33)

O



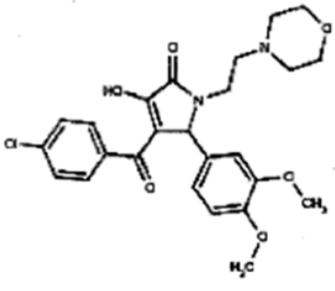
(34)

O



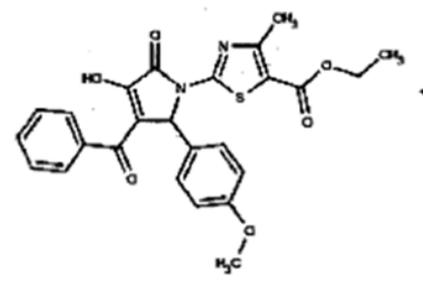
(35)

O



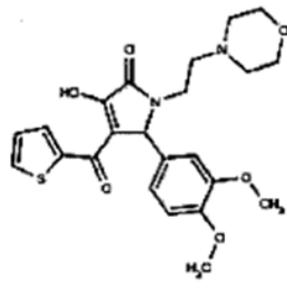
(36)

O



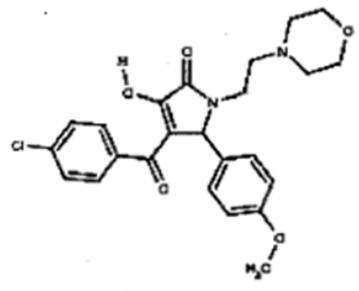
(37)

O

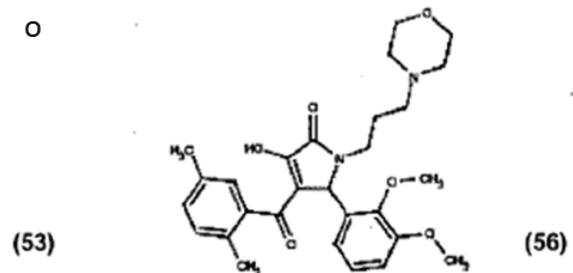
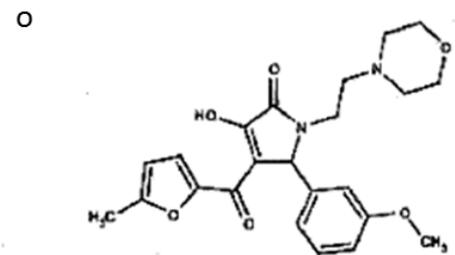
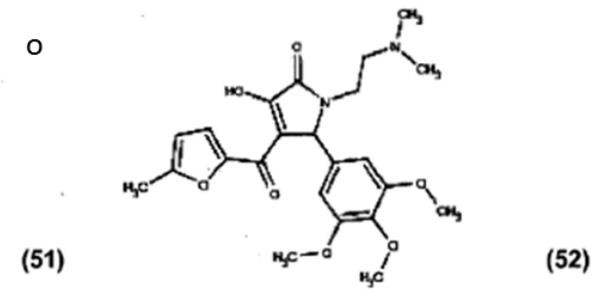
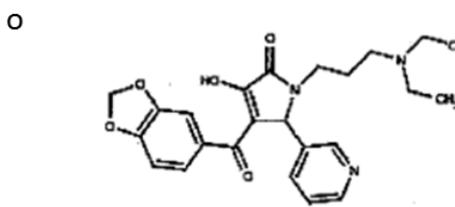
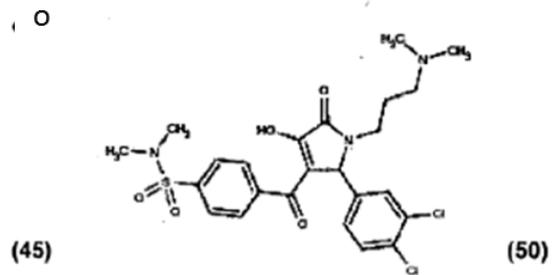
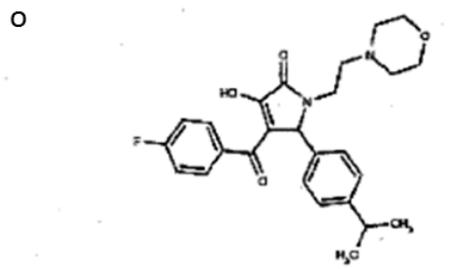
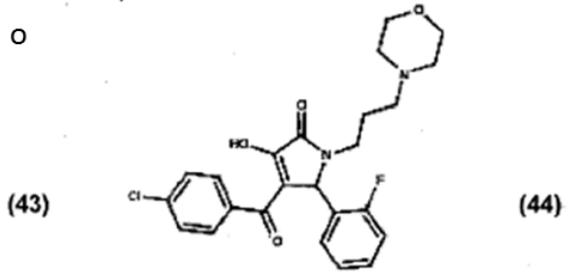
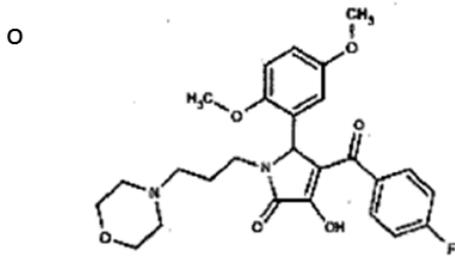


(38)

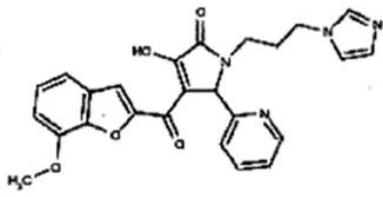
O



(39)

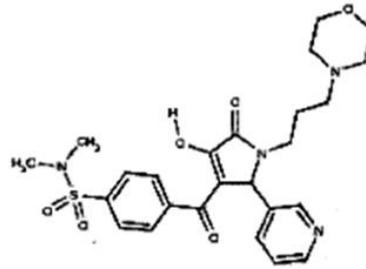


OU



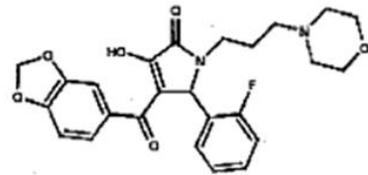
(64)

OU



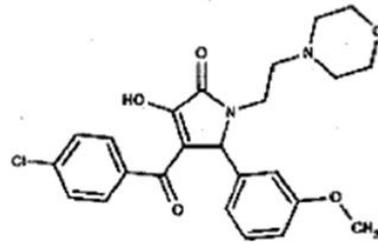
(65)

OU



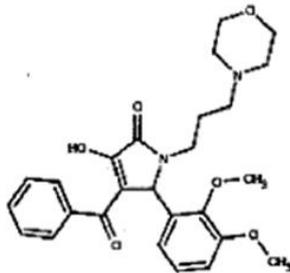
(68)

OU



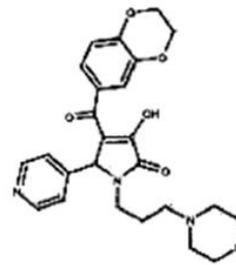
(71)

OU



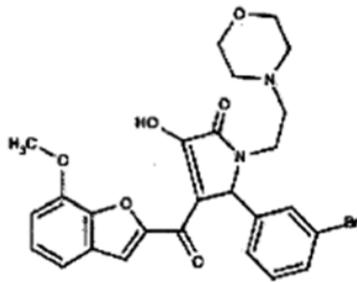
(74)

OU



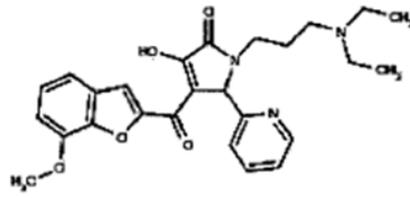
(83)

O



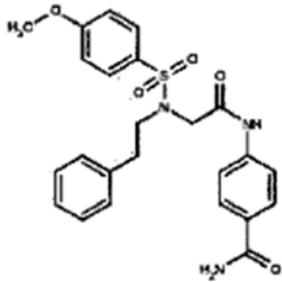
(85)

O



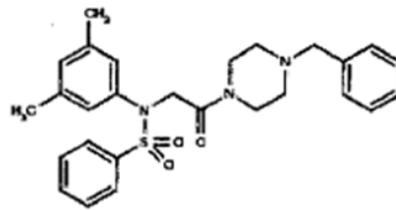
(86)

O



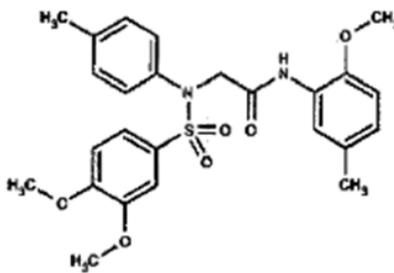
(18)

O



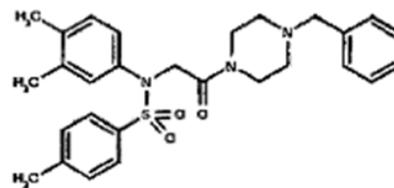
(40)

O



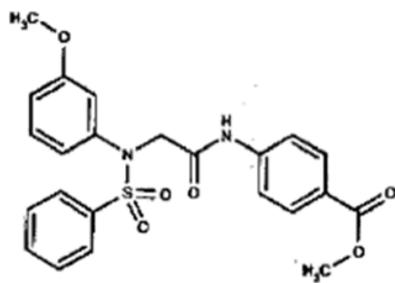
(42)

O



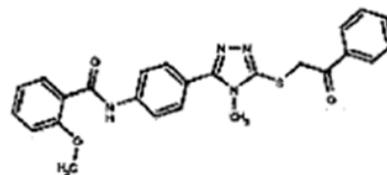
(48)

O



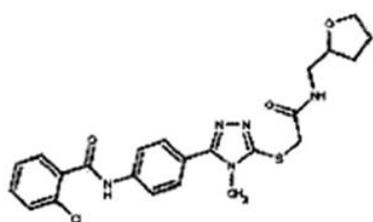
(81)

O



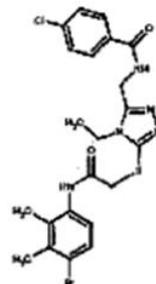
(15)

O



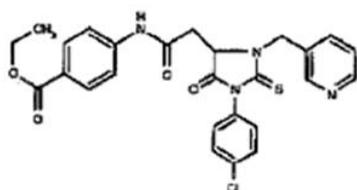
(47)

O



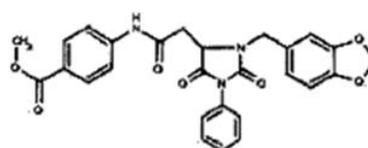
(82)

O



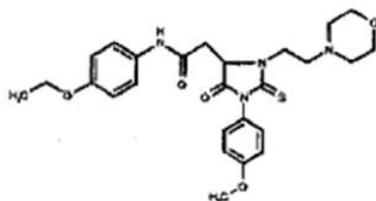
(61)

O



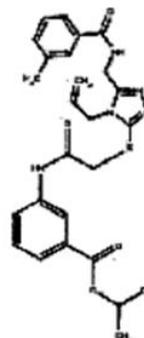
(77)

O



(84)

O



(75)

- 5 13. Composición que comprende una molécula de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 y un excipiente farmacológicamente aceptable para su uso en la prevención o el tratamiento de una patología dependiente de una ruta metabólica que implica Syk en el ser humano o el animal, en la que dicha patología está causada por una hipersensibilidad de tipo I, o es la poliartritis reumatoide, una enfermedad autoinmune, una inflamación o un cáncer.
- 10 14. Composición para su uso según la reivindicación 13 donde dicha composición también comprende otra molécula terapéutica.
- 15 15. Procedimiento para la identificación de una molécula orgánica de peso molecular comprendido entre 50 y 2500 Dalton que se une a la proteína tirosina quinasa Syk y que puede inhibir en al menos un 10 % *in vitro* la unión
- 20 (i) del fragmento de anticuerpo G4G11 (SEC ID N° 2), o bien,  
(ii) de un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se une a la tirosina quinasa Syk humana en un epítipo que comprende al menos uno de los restos 65 a 74 de la secuencia de aminoácidos de la proteína tirosina quinasa Syk humana (SEC ID N° 1), o bien,  
25 (iii) un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se une con la proteína tirosina quinasa Syk humana e inhibe en al menos un 10 % la unión del fragmento de anticuerpo G4G11 con la proteína tirosina quinasa Syk humana (SEC ID N° 1), con la proteína tirosina quinasa Syk humana o con una de sus variantes en animales, que comprende al menos las etapas siguientes:
- 25 a) cribado, a partir de un biblioteca de moléculas orgánicas candidatas que tienen un peso molecular comprendido entre 50 y 2500 Da, de las que tengan posibilidades de unirse a la proteína Syk en la cavidad de unión tridimensional de la proteína Syk seleccionada entre las moléculas que tienen la fórmula C-13, I, II, III, IV o

1 a 87 tal como se ha indicado anteriormente;

b) seleccionándose entre las moléculas identificadas en a) las que pueden inhibir al menos un 5 %, preferentemente al menos un 10 %, por ejemplo al menos un 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80 u 85 % *in vitro* la unión del anticuerpo o fragmento de anticuerpo (i), (ii) o (iii) con la proteína Syk.

5 16. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 15 en el que la molécula de la etapa a) es la molécula C-13, la molécula (59) o la molécula (61).

10 17. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 15 o la reivindicación 16 que comprende una etapa suplementaria anterior a la etapa a) de identificación de la cavidad tridimensional de enlace en la proteína Syk de las moléculas seleccionadas entre las moléculas de fórmula C-13, I, II, III, IV o 1 a 87, en la que dicha etapa anterior se realiza mediante aplicación de un *docking* (anclaje) *in silico*, y una etapa suplementaria c) de selección entre las moléculas identificadas en b) de las que pueden inhibir en un 50 % *in vitro* la desgranulación de los mastocitos a una concentración (CI50) comprendida entre 1 ng/ml y 1 mg/ml.

15

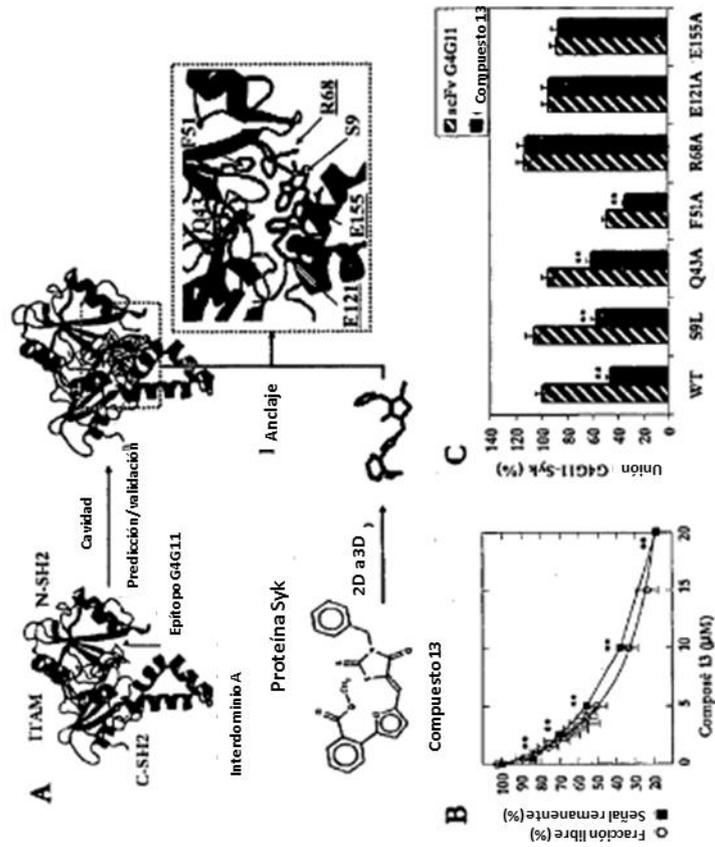


Figura 1

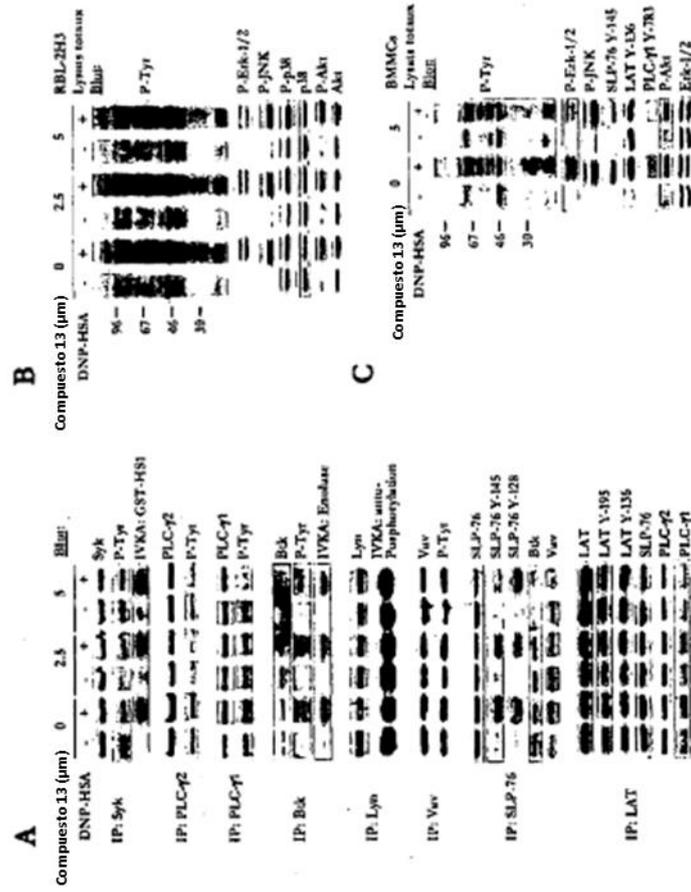


Figura 2

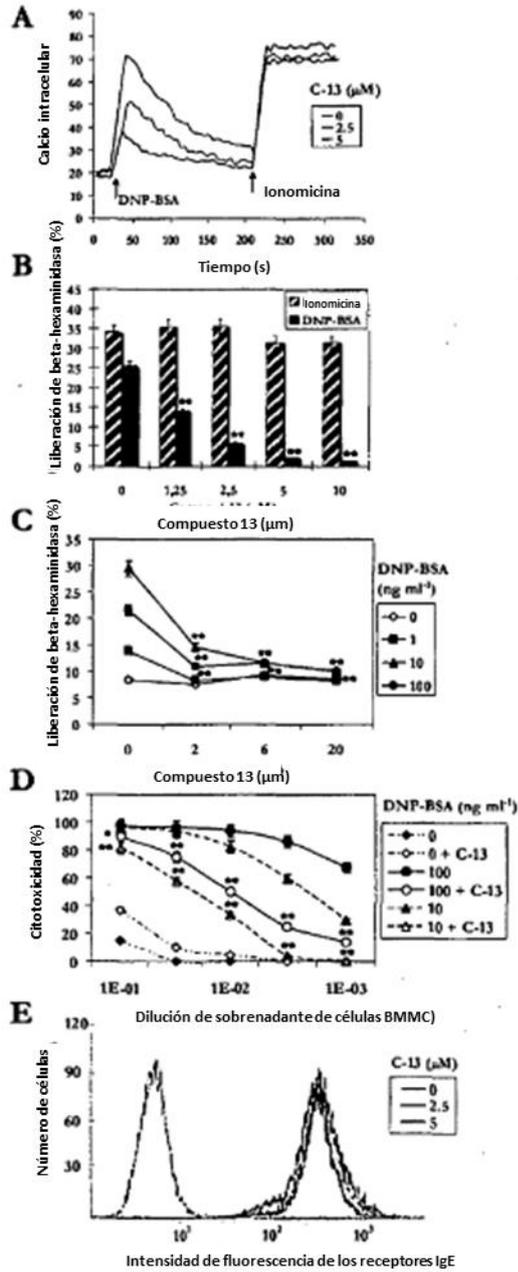


Figura 3

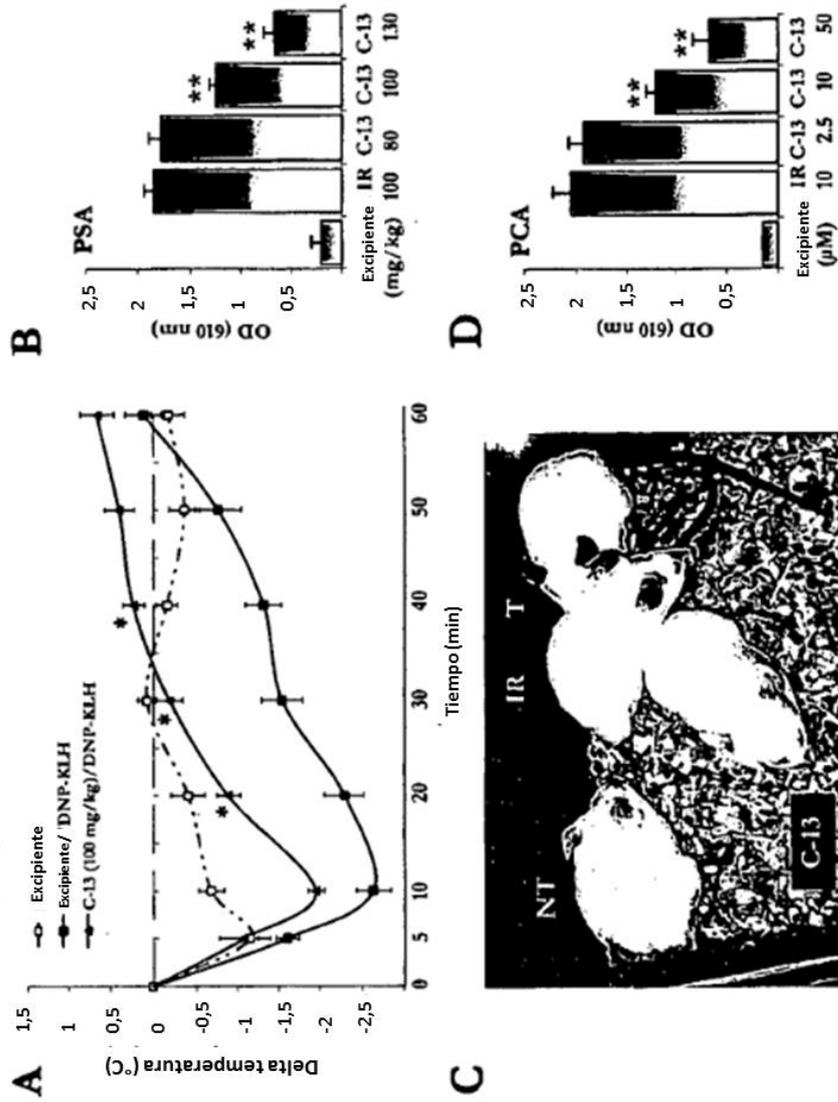


Figura 4

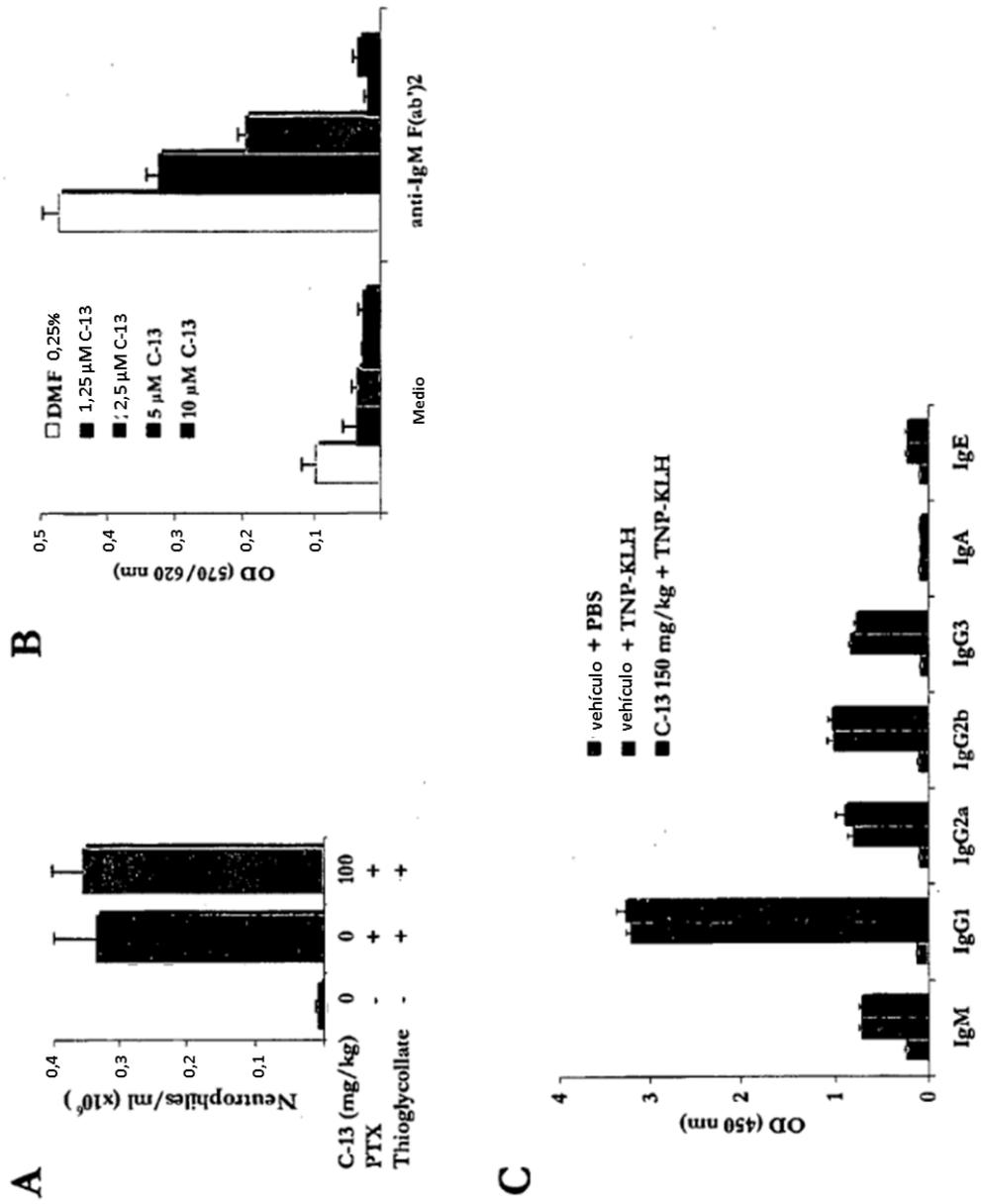


Figura 5

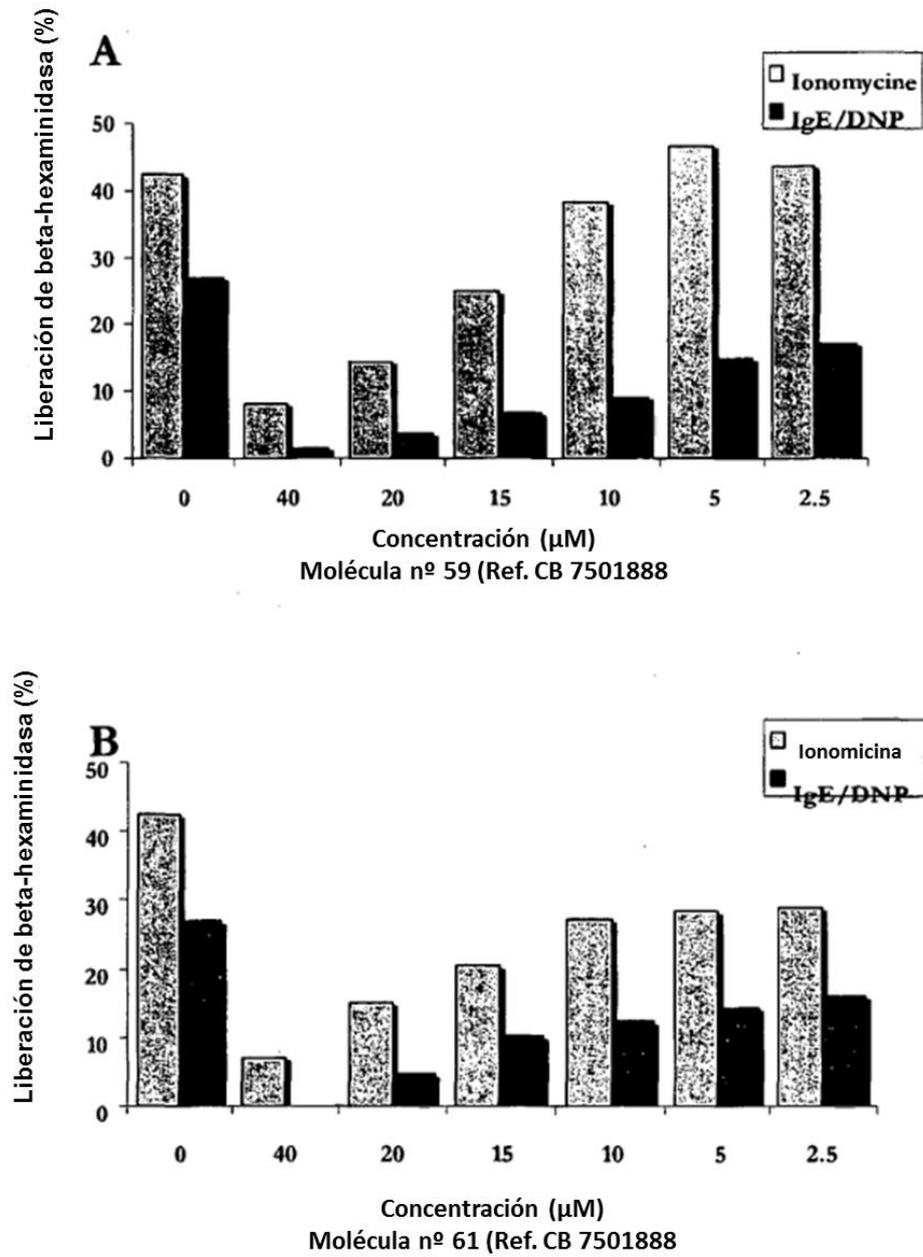


Figura 6

**A**

maqvlqesg pglvkpsdtl sltcavsgys isssnwwgi rppgkglew igyiyhsqt	60
yynpslksrv tisvdksknq fsklkssvta adtavyyicar nvgfhdwggg tlvtvssggg	120
gsgggsggs alqsvltqpp sasgtpgqrv tiscsgssn igsnyvywyq qlpgtapkll	180
iyrnnqrpsg vpdrfsgsks gtsaslaig lrsedeaddy caawddslas pvfgggtklt	240
vlgaaahhhh hgaaeqkli seedlmgaa	269

**B**

maqvlqesg pglvkpsdtl sltcavsgys isssnwwgi rppgkglew igyiyhsqt	60
yynpslksrv tisvdksknq fsklkssvta adtavyyicar nvgfhdwggg tlvtvssggg	120
gsgggsggs alqsvltqpp sasgtpgqrv tiscsgssn igsntvnwyq qlpgtapkll	180
iysnnqrpsg vpdrfsgsks gtsaslaig lqsedeaddy caawddslfg avfgggtklt	240
vlgaaahhhh hgaaeqkli seedlmgaa	269

**Figura 7**

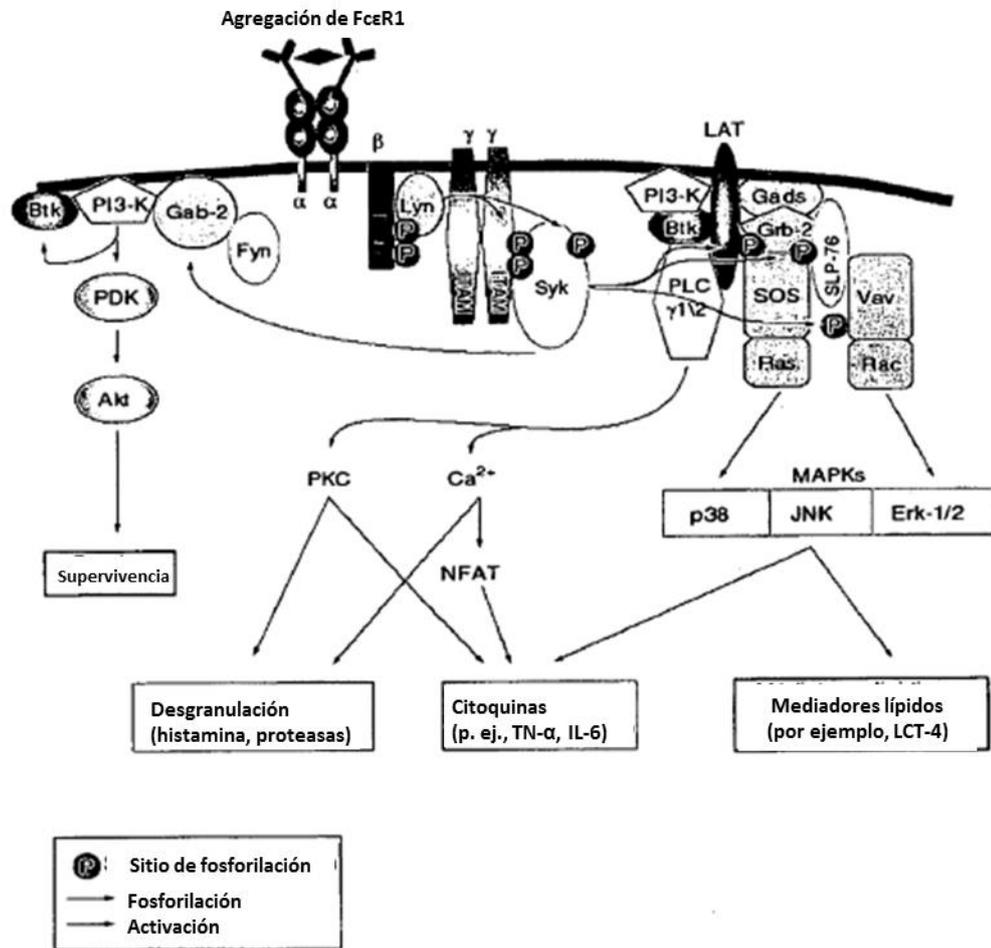
**A**

1 massqmadsa nhlpfffgni treeaedylv qggmsdglyl lrgsrnylqg falsvahgrk  
 61 ahhytierel ngtyaiaggr thaspadlch yhsqesdglv clkkpfnrp qgvqpktgpf  
 121 edkenlire yvkqtnlqg qaleqaiisq kpqlekliat tahekmpwfh gkisreeseq  
 181 ivligsktng kflirardnn gsyalccllhe gkvlhyridk dktgklsipe gkkfdtlwql  
 241 vehysykadg llrvltvpcq kigtqgnvnf ggrpqlpgsh patwsaggii sriksysfpk  
 301 pghrksspaq gnrqestvsf npyepelapw aadkqpqrea lpmdeveyes pyadpeeirp  
 361 keyldrkl1 tledkelqsg nfgtvkkgyy qmkkvvtva vkilkneand palkdellae  
 421 anvnmqldnp yivrmigice aeswmlvmem aelgplnkyl qqnrhvkdkn iielvhqvs  
 481 gmkylesnf vhrdlaarnv llvtqhyaki sdfglskalr adenykaqt hgkwvpkwya  
 541 pecinyykfs sksdvwsfgv lmweafsygq kpyrgmkgse vtamlekger mgcpagcpre  
 601 mydlmnlcwt ydvenrpgfa avelrlrnyy ydvvn

**B**

1 magsavdsan hltyffgnit reeaedylvq ggmdglyll rgsrnylqgf alsvahnrka  
 61 hhytiereln qtyaisggra haspadlchy hsqepdglc llkkpfnrpp gvqpktgpfe  
 121 dlkenlirey vkqtnlqgg aleqaiisqk plekliatt ahekmpwfhg nisrdeseqt  
 181 vligsktngk flirardnsg syalccllheg kvlhyridrd ktgklsipeg kkkfdtlwqlv  
 241 ehysykpdl lrvltvpcqk igaqmgpgs pnahpvtwsp ggiisriksy sfpkpgkpkp  
 301 appqgsrpes tvsfnpyept ggpwgpdrql qrealpmdte vyespyadpe eirpkeyvld  
 361 rslitledne lsgsnfgtvk kgyyqmkkvv ktvavkilkn eandpalkde llaeanvmqg  
 421 ldnpyvirmi giceaeswml vmemaelgpl nkylqqnrhi kdknielvh qvsmgmkye  
 481 esnfvhrdla arnvlvtqh yakisdfgls kalradeny kaqthgkwpv kwyapeciny  
 541 ykfssksdvw sfgvlmweaf sygqkpyrgm kgsevtamle kgermgcpag cpremydlm  
 601 lcwtydvenr pgftavelrl rnyyydvvn

**Figura 8**



**Figura 9**

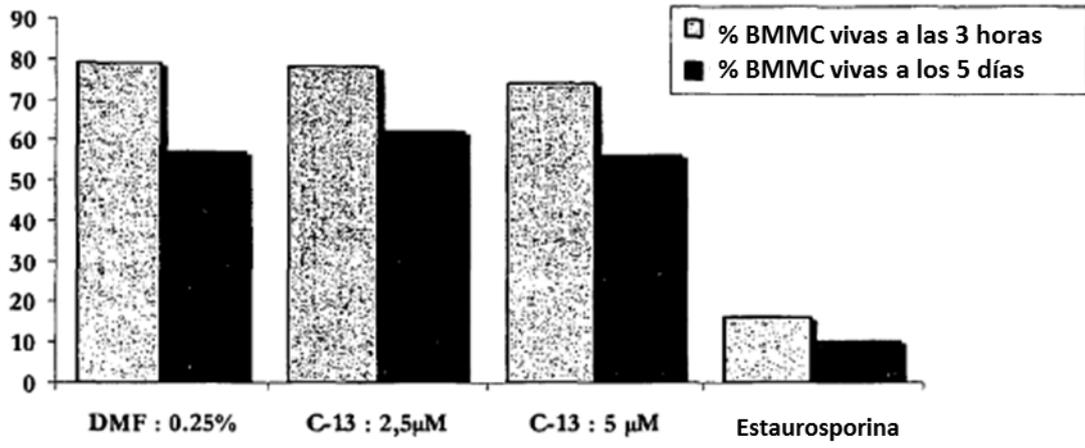


Figura 10