

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 565 082**

51 Int. Cl.:

**C07D 311/60** (2006.01)

**A61K 31/353** (2006.01)

**A61P 37/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.06.2009 E 09772589 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.10.2015 EP 2308860**

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

30 Prioridad:

**30.06.2008 ES 200801964**

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

**31.03.2016**

73 Titular/es:

**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES  
CIENTÍFICAS (CSIC) (100.0%)  
C/ Serrano 117  
28006 Madrid, ES**

72 Inventor/es:

**ALARCÓN SÁNCHEZ, BALBINO;  
RAMÍREZ ORTIZ, ÁNGEL;  
BORROTO REVUELTA, ALDO y  
MORREALE DE LEÓN, ANTONIO**

74 Agente/Representante:

**PONS ARIÑO, Ángel**

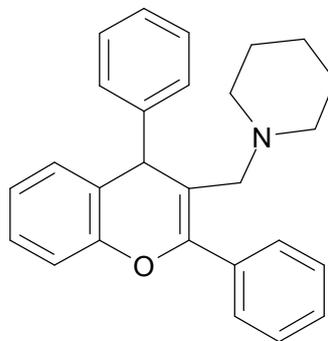
**ES 2 565 082 T3**

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**

Inmunosupresor basado en la interrupción de la interacción TCR-Nck

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



(I)

10 y sus derivados, para su uso como medicamentos. Son preferiblemente agentes inmunosupresores con mecanismo de acción basado en el bloqueo de la interrupción de la interacción TCR-Nck.

**Técnica anterior**

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

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

40 El documento WO 03/096982 desvela derivados de 4H-cromeno que pueden usarse para controlar el crecimiento de células alteradas y que puede aplicarse en enfermedades que implican un aumento de linfocitos T, tal como enfermedades inmunitarias.

45 El documento WO 03/062272 desvela una estrategia para modular la interacción entre Nck y CD3 $\epsilon$  bloqueando el dominio SH3.1 de Nck.

**Descripción de la invención**

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

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

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

5 El cambio conformacional en el TCR, que ocurre tras la unión de anticuerpos estimuladores y de MHC, se puso primeramente de manifiesto mediante un ensayo de "pull-down", donde el TCR se une de forma inducible a una matriz de la proteína de fusión GST-Nck. Este ensayo bioquímico no permite identificar de forma individual aquellas células cuyo TCR está sufriendo el cambio conformacional. Sin embargo, los autores de la presente invención demostraron que el anticuerpo APA1/1 también reconoce el cambio conformacional (Risueno, R.M., Gil, D., Fernandez, E., Sanchez-Madrid, F. and Alarcon, B. (2005) Blood, 106, 601-608). El anticuerpo puede usarse en preparaciones de linfocitos T en cultivo y también en cortes inmunohistoquímicos. Este reactivo permite demostrar por otro procedimiento distinto al "pull-down" la existencia del cambio conformacional, además de demostrar que el cambio conformacional ocurre *in vivo*. Es más, el anticuerpo reconoce las sinapsis inmunitarias formadas entre linfocitos T y células presentadoras de antígeno cargadas con un péptido agonista, pero no las sinapsis formadas por un agonista parcial/antagonista. Estos datos sugieren que el cambio conformacional en el TCR podría estar detrás de la distinción entre agonistas fuertes y débiles por parte de los linfocitos T y podría activar cascadas de activación específicas durante el reconocimiento de ligandos fuertes. Esta hipótesis parece corroborada por el hecho de que durante el desarrollo tímico el cambio conformacional (visualizado mediante tinción con APA1/1) ocurre durante el reconocimiento de ligandos que inducen selección negativa, pero no durante el reconocimiento de ligandos que inducen selección positiva (Risueno, R.M., van Santen, H.M. and Alarcon, B. (2006) Proc Natl Acad Sci U S A., 103, 9625-9630). La única consecuencia conocida del cambio conformacional en el TCR es la exposición de la PRS en CD3 $\epsilon$ , aunque no se descarta que el cambio conformacional se transmita también a las regiones citoplasmáticas de las otras subunidades CD3 e influya globalmente en todo el proceso de iniciación de la transmisión de señales por el TCR, incluyendo la fosforilación de las tirosinas de los ITAM (Minguet, S., Swamy, M., Alarcon, B., Luescher, I.F. and Schamel, W.W. (2007) Immunity., 26, 43-54). Sin embargo, el reclutamiento de Nck a la PRS de CD3 $\epsilon$  constituye un posible mecanismo de la transmisión del cambio conformacional a rutas de activación intracelulares (Gil, D., Schamel, W.W., Montoya, M., Sanchez-Madrid, F. and Alarcon, B. (2002) Cell, 109, 901-912).

Con el fin de demostrar la importancia de la interacción Nck-CD3 $\epsilon$  en la activación de linfocitos T y validar esta interacción como diana de agentes inmunomoduladores, se diseñaron péptidos sintéticos que mimetizaran la secuencia del PRS y que podrían bloquear el sitio de unión en Nck a CD3 $\epsilon$ . Se obtuvo un péptido, denominado 11R085, que es 300 veces más potente que el péptido con la secuencia silvestre en la inhibición de la interacción de CD3 $\epsilon$  con el dominio SH3.1 de Nck. Usando este péptido, se consigue inhibir de forma específica la proliferación de linfocitos T humanos tanto CD4 $^{+}$  como CD8 $^{+}$  en respuesta a la estimulación con anticuerpos anti-CD3, con una CI50 de aproximadamente 20  $\mu$ M, mientras que la proliferación de linfocitos T humanos dependiente de un receptor diferente, el IL2R, no es prácticamente afectada por este péptido, incluso a concentraciones 3 veces superiores.

Por tanto, el péptido 11R085 inhibe la activación iniciada por el TCR, pero no la activación mediada por otro receptor, y por ello, es específico de la diana molecular para el que se diseñó.

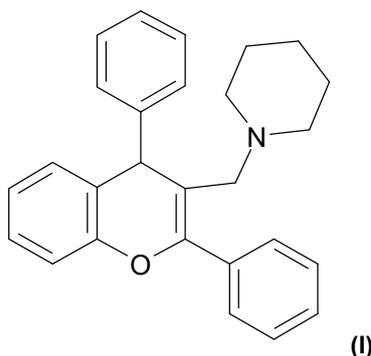
El péptido 11R085 también inhibe la producción de IL2 y la proliferación inducida por antígeno en linfocitos primarios de ratones transgénicos OT-I con una CI50 de aproximadamente 5  $\mu$ M. Queda así validada la interacción Nck-CD3 $\epsilon$  como diana molecular para el desarrollo de inmunosupresores.

Usando esta información y estrategias bioinformáticas de selección se realizó un cribado virtual de compuestos que se unen al dominio SH3.1, tal y como se describe en los ejemplos de la invención. Tras este cribado, se seleccionaron los 10 candidatos que encajaron mejor en el bolsillo hidrófobo del SH3.1 y podría reconocer la secuencia PRS de CD3 $\epsilon$  (ver FIG. 1). Todos estos compuestos, estructuralmente muy diferentes tuvieron un cierto grado de actividad, pero el que muestra un mayor grado de actividad y menos toxicidad, incluso a dosis altas, (FIG.7), es el compuesto denominado CBM-1, el compuesto con la fórmula estructural (I).

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

Por tanto, CBM-1 es activo como agente inmunosupresor.

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



o cualquiera de sus derivados, en el que se seleccionan derivados de sus sales, isómeros o mezclas de isómeros, formas cristalinas, etc., para su uso como medicamento, preferiblemente como agentes inmunosupresores.

5 Entendiéndose por isómeros o mezclas de isómeros en la presente invención isómeros ópticos o enantiómeros, originados por la presencia de centros quirales (átomos unidos a cuatro sustituyentes diferentes) que provocan la diferenciación entre enantiómeros respecto a su actividad óptica (rotación de la luz polarizada al pasar a través de una solución del enantiómero).

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

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

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

25 El compuesto de fórmula (I) es capaz de unirse al dominio SH3.1 de Nck, bloqueando la interacción TCR-Nck y, por tanto, es un agente inmunosupresor específico de linfocitos T, que presenta ventajas claras frente a otros agentes inmunosupresores, una de las cuales es que origina menos efectos secundarios.

30 Por todo ello, un aspecto de la invención es el compuesto de fórmula estructural (I) o cualquiera de sus derivados para uso en el tratamiento y/o prevención de enfermedades que están asociadas a la hiperproliferación de linfocitos T.

35 Preferiblemente estas enfermedades son enfermedades autoinmunitarias, enfermedades asociadas a rechazo de alotrasplantes o xenotrasplantes de órganos o tejidos, o linfomas y/o leucemias T.

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

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

50 En cada caso la composición se adaptará al tipo de administración usada. Por ello, la composición anterior puede presentarse en una forma farmacéutica para administración por vía oral, bien como un sólido (por ejemplo, comprimidos, grageas, cápsulas, etc.) o bien como un líquido (por ejemplo, disoluciones, suspensiones, emulsiones, etc.), para administración parenteral ((por ejemplo, intramuscular, subcutánea, intravenosa, etc.), administración rectal, etc., o cualquier otra forma de administración clínicamente permisible y en una cantidad terapéuticamente eficaz.

Los adyuvantes y vehículos farmacéuticamente aceptables que pueden usarse en estas composiciones son los vehículos habitualmente utilizados en el estado de la técnica. La composición farmacéutica proporcionada por esta

invención puede administrarse por cualquier vía de administración, para lo cual esta composición se formulará en una forma farmacéutica adecuada para la vía de administración seleccionada.

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

## 10 Descripción de las figuras

### FIG 1. Modelo del dominio SH3.1 y cribado virtual de compuestos con potencial de unión.

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

### FIG 2. Efecto selectivo de los compuestos resultantes del cribado virtual en la proliferación inducida por anti-CD3.

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

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

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

### FIG 4. Inhibición de la liberación de citoquinas por CBM-1.

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

### FIG 5. Inhibición de la producción intracelular de IFN $\gamma$

Expresión intracelular de IFN $\gamma$  en respuesta a la estimulación con una mezcla de anti-CD3 y anti-CD28. La figura muestra la expresión de IFN $\gamma$  intracelular (como el producto del porcentaje de células positivas y de la fluorescencia promedio) en función de la concentración de CBM-1.

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

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

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

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

### FIG 8. Toxicidad de CBM-1.

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

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

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

## Ejemplos

A continuación se ilustrará la invención mediante algunas pruebas realizadas por los inventores, que ilustran el trabajo llevado a cabo para identificar el compuesto de la invención y comprobar su eficacia.

### Ejemplo 1

#### Efecto de péptidos que inhiben la interacción Nck-CD3 $\epsilon$ en la activación de linfocitos T.

Con el fin de demostrar la importancia de la interacción Nck-CD3 $\epsilon$  en la activación de linfocitos T y validar esta

interacción como diana de agentes inmunomoduladores, se diseñaron péptidos sintéticos que mimetizaran la secuencia del PRS y que podrían bloquear el sitio de unión en Nck a CD3 $\epsilon$ . Se obtuvo un péptido, denominado 11R085, que es 300 veces más potente que el péptido con la secuencia silvestre en la inhibición de la interacción de CD3 $\epsilon$  con el dominio SH3.1 de Nck. Usando este péptido, se inhibió específicamente la proliferación de linfocitos T humanos, tanto CD4+ como CD8+, en respuesta a la estimulación con anticuerpos anti-CD3 con una CI50 de 20  $\mu$ M, mientras que la proliferación de linfocitos T humanos dependiente de un receptor diferente, el IL2R, no fue prácticamente afectada por este péptido, incluso a concentraciones 3 veces superiores. Esto sugería que el péptido 11R085 inhibe la activación iniciada por el TCR, pero no la activación mediada por otro receptor, y que por lo tanto era específico de la diana molecular para el que está diseñado. El péptido 11R085 también inhibió la producción de IL2 y la proliferación inducida por antígeno de linfocitos primarios de ratones transgénicos OT-I con una CI50 de 5  $\mu$ M. Quedaba así validada la interacción Nck-CD3 $\epsilon$  como diana molecular para el desarrollo de inmunosupresores.

### Ejemplo 2

#### 15 Selección por cribado virtual de compuestos con potencial de bloqueo de la interacción Nck-CD3 $\epsilon$ y evaluación de su capacidad inmunosupresora.

Se usaron técnicas de modelado molecular (Fiser, A., Feig, M., Brooks, C.L., 3rd and Sali, A. (2002) Acc Chem Res., 35, 413-421) para obtener por homología la estructura del dominio SH3.1 de Nck $\alpha$  basándose en su secuencia y en la estructura de unos 50 dominios SH3 conocidos de otras proteínas. De esta forma se obtuvo un modelo teórico de estructura que puede considerarse que es muy similar a la estructura real del dominio. Partiendo de esta estructura se hizo un cribado virtual con software propio de una colección de más de 300.000 compuestos puestos a disposición por la empresa norteamericana Chembridge y se seleccionaron los diez compuestos que teóricamente encajaban mejor en un bolsillo hidrófobo del SH3.1, que se cree que es el responsable del reconocimiento de la secuencia PRS de CD3 $\epsilon$  (ver FIG. 1). Estos compuestos se usaron posteriormente para realizar los ensayos de inhibición de la proliferación de linfocitos T humanos estimulados con anticuerpos anti-CD3.

### Ejemplo 3

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

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

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

### Ejemplo 4

#### 45 Efecto selectivo de CBM-1 en la proliferación inducida por anti-CD3.

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

El compuesto CBM-1 inhibió la proliferación inducida por anti-CD3 de linfocitos CD4+ con una CI50 de 2  $\mu$ M y la de linfocitos CD8+ con una CI50 de 3  $\mu$ M (FIG. 3). El efecto inhibitorio de los otros compuestos fue ligeramente inferior. Sin embargo, CBM-1 no inhibió significativamente la proliferación de linfoblastos humanos dependientes de IL2 a concentraciones de 20  $\mu$ M, indicando su especificidad por la proliferación dependiente de la activación de TCR, pero no la dependiente de IL2R. Este dato apoya un mecanismo de acción selectivo sobre el TCR.

### 60 Ejemplo 5

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

65 Se midió el efecto de CBM-1 sobre la producción de citoquinas en un ensayo en el que CMSP humanas se

estimularon con anticuerpos anti-CD3. El sobrenadante de estas células se recogió a las 72 h y se midieron simultáneamente varias citoquinas por un ensayo de citometría de flujo. Estos experimentos demostraron que el compuesto tuvo un potente efecto inhibitor sobre citoquinas Th1 y IFN $\gamma$  (CI50 de 0,3  $\mu$ M), TNF $\beta$  (CI50 de 0,2  $\mu$ M) e IL10 (CI50 de 0,2  $\mu$ M) y no tuvo efecto sobre la producción de IL5 e IL6 hasta concentraciones de 30  $\mu$ M (FIG 4). Los datos indican por lo tanto que CBM-1 inhibe selectivamente la producción de algunas citoquinas por linfocitos T, pero no de otras. Es decir, CBM-1 muestra un grado de selectividad en la inhibición de rutas intracelulares de transmisión de señales.

#### Ejemplo 6

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

Para demostrar si los inhibidores pueden prevenir la diferenciación de linfocitos Th0 a Th1, se realizaron ensayos de diferenciación *in vitro*. Se estimularon células de bazo de ratones C57BL/6 con anticuerpos anti-CD3 + anti-CD28 durante 48 h en presencia de las concentraciones de CBM-1 indicadas y se incubaron 6 horas más con brefeldina A. Se encontró que CBM-1 inhibió la generación de linfocitos Th1 secretores de IFN $\gamma$  con una CI50 de 0,8  $\mu$ M. Las células se tiñeron primero con CD4-PE y después de fijarlas y aclararlas se tiñeron con anticuerpo anti-IFN $\gamma$ . La figura (FIG. 5) se muestra la expresión de IFN $\gamma$  intracelular (como el producto del porcentaje de células positivas y de la fluorescencia promedio) en función de la concentración de CBM-1.

#### Ejemplo 7

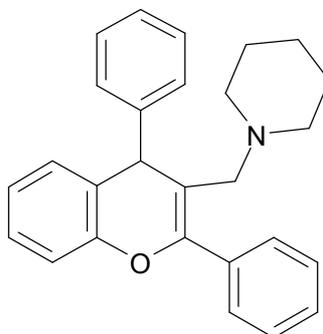
##### **Determinación por RMN de la estructura tridimensional del dominio SH3.1 de Nck $\alpha$ .**

Se determinó en paralelo la estructura tridimensional del dominio SH3.1 de Nck $\alpha$ , en presencia y en ausencia del péptido 11R085 (en colaboración con el laboratorio de los Prof. María Ángeles Jiménez y Manuel Rico, del Instituto de Química-Física Rocasolano, CSIC, Madrid) (FIG. 6). Esto permitió validar la predicción del modelo por ordenador estructural usado para el cribado virtual. Además, permitió medir los desplazamientos químicos ocasionados en la estructura por el compuesto CBM-1 (FIG. 7).

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

**REIVINDICACIONES**

1. Compuesto de fórmula (I):



5

y cualquiera de sus derivados para su uso como medicamentos, en el que se seleccionan derivados de sus sales; mezcla de enantiómeros; formas cristalinas y cualquier compuesto anteriormente mencionado que contenga uno o más átomos isotópicamente enriquecidos.

10

2. Compuesto de fórmula (I) según la reivindicación 1 para su uso en el tratamiento y/o prevención de enfermedades que están asociadas con la activación de linfocitos T o con su hiperproliferación o proliferación anormal.

15

3. Compuesto para uso según la reivindicación 2, en el que las enfermedades que están asociadas con la activación de linfocitos T son enfermedades autoinmunitarias.

20

4. Compuesto para uso según la reivindicación 3, en el que las enfermedades autoinmunitarias se seleccionan de la lista que comprende: esclerosis múltiple y sus variedades, lupus eritematoso sistémico, psoriasis, vitíligo, artritis reumatoide, asma, hepatitis autoinmunitaria, diabetes de tipo I, miastenia grave, espondilitis anquilosante y enfermedad de Crohn.

25

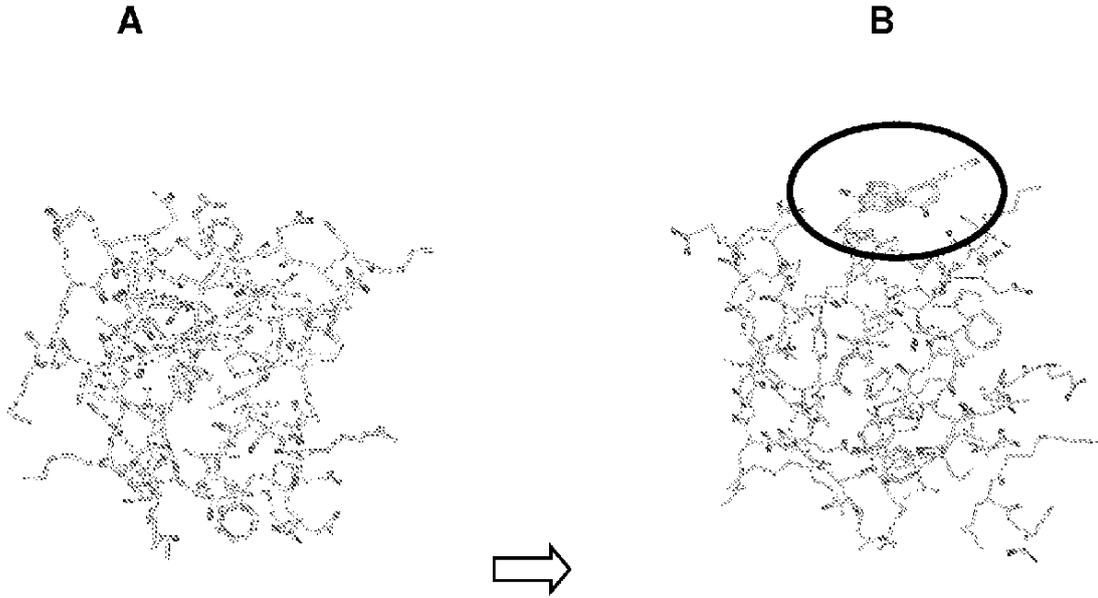
5. Compuesto para uso según la reivindicación 2, en el que las enfermedades que están asociadas con la activación de linfocitos T son enfermedades asociadas con rechazo de alotrasplantes o xenotrasplantes de órganos o tejidos.

30

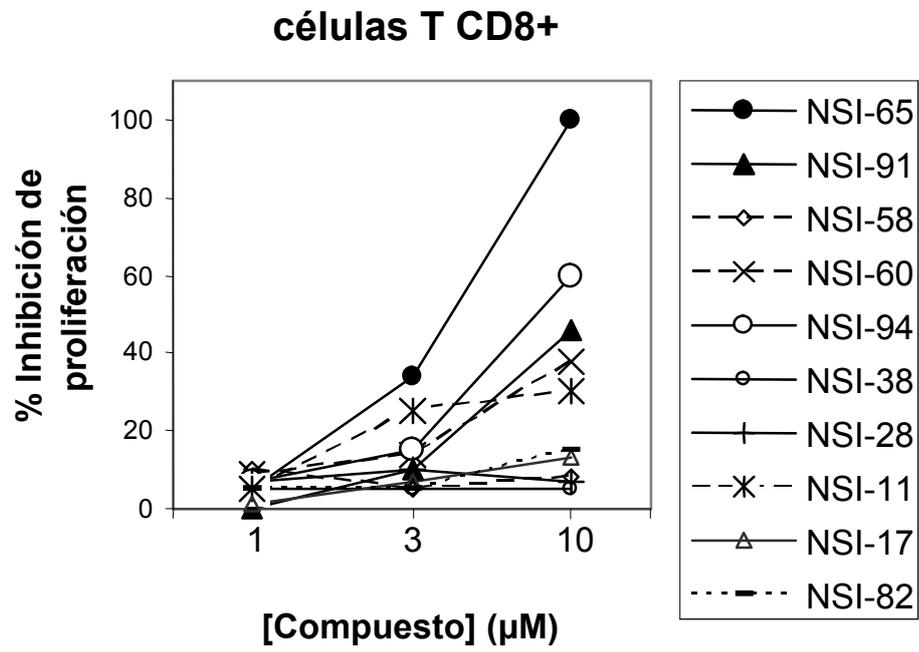
6. Compuesto para uso según la reivindicación 2, en el que las enfermedades que están asociadas con la activación de linfocitos T son linfomas o leucemias de linfocitos T.

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

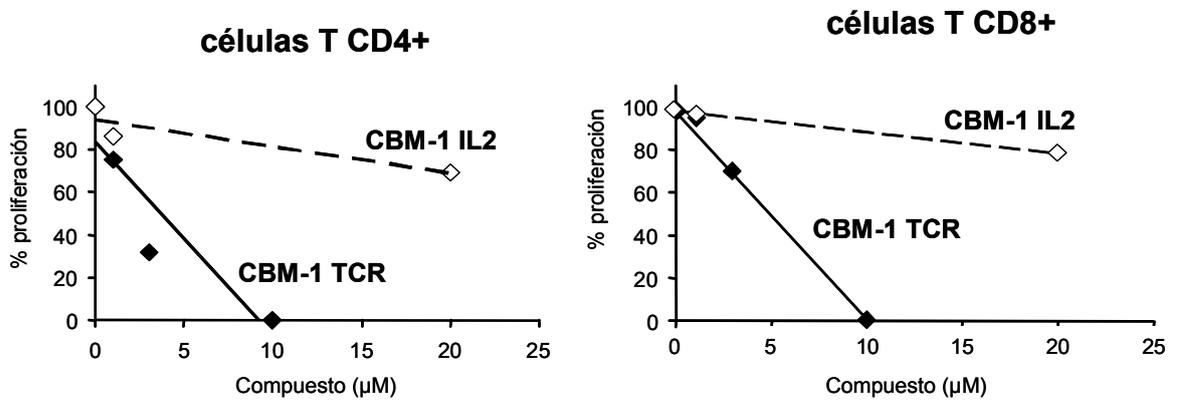
8. Uso de la composición farmacéutica según la reivindicación 7 para su uso como un agente inmunosupresor.



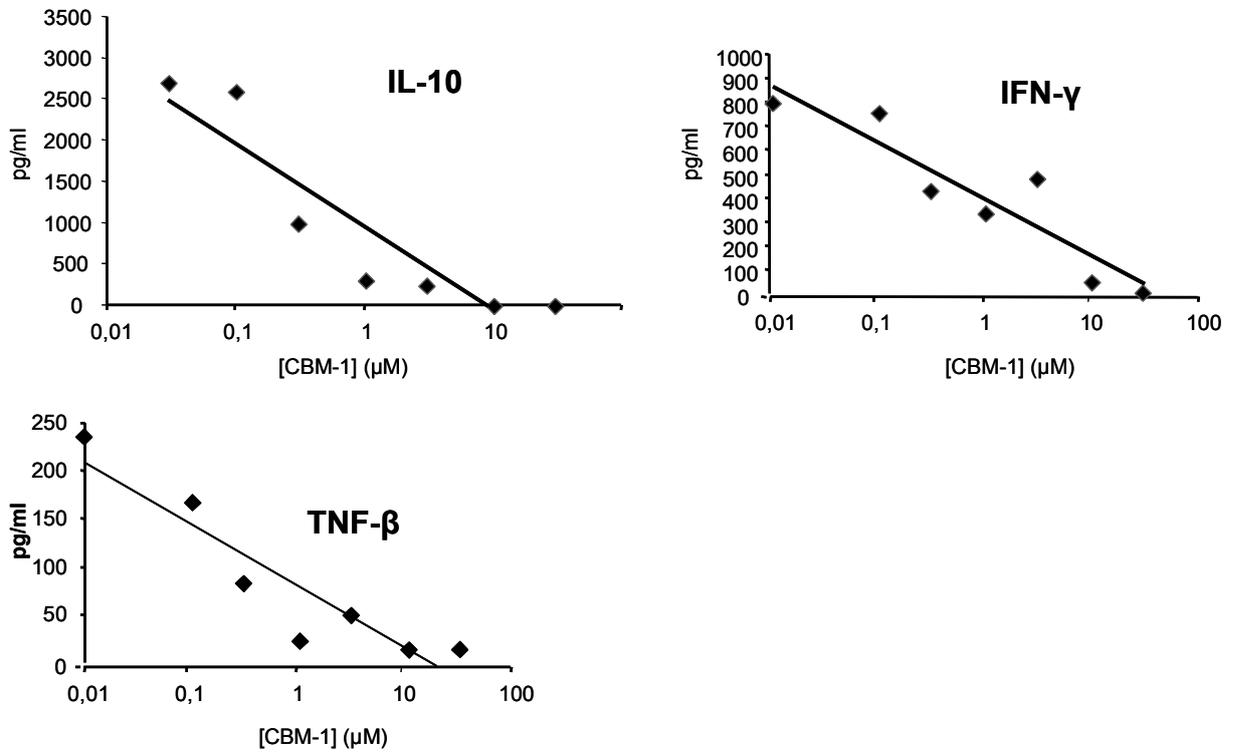
**FIG. 1**



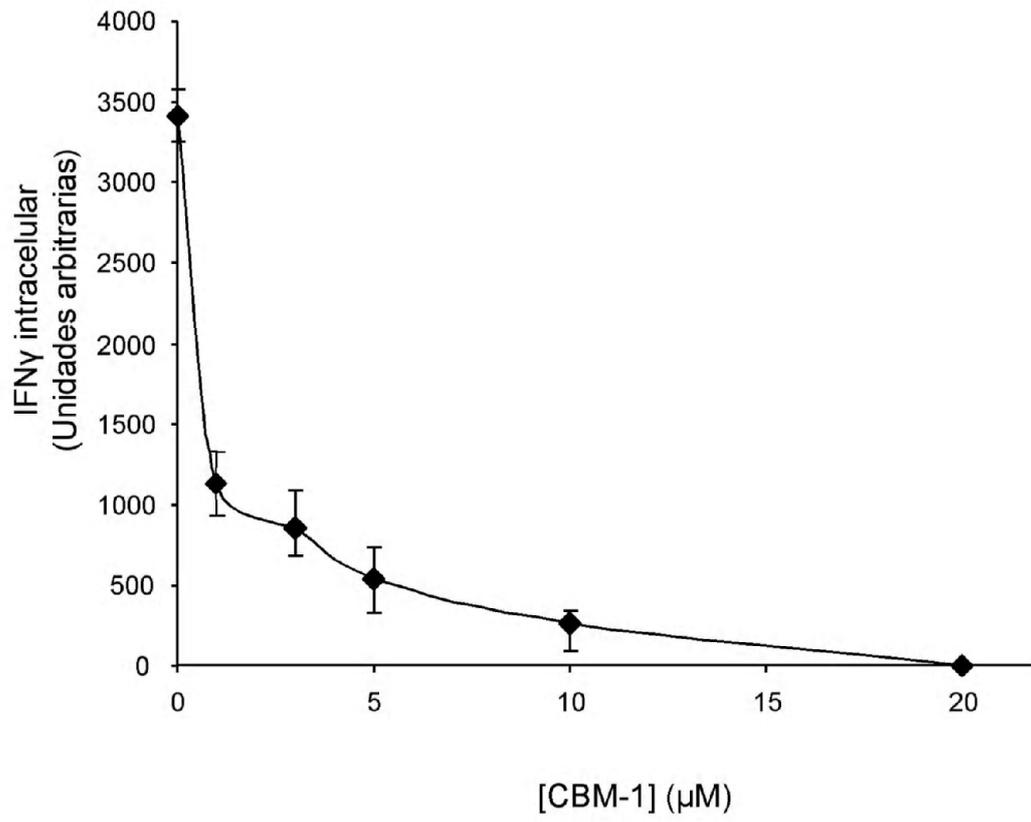
**FIG. 2**



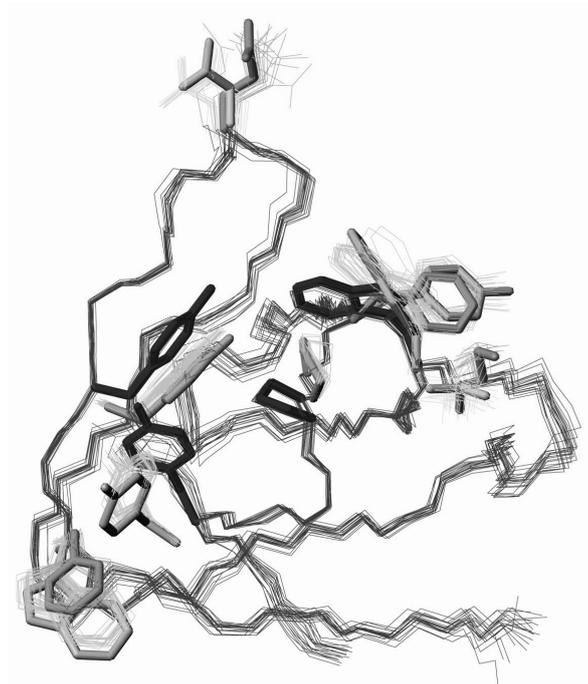
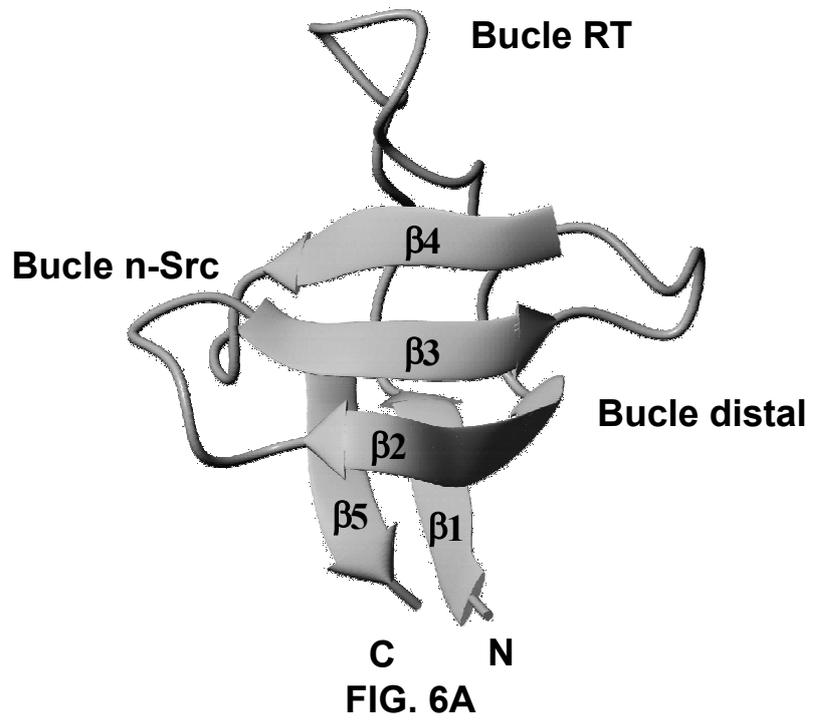
**FIG. 3**



**FIG. 4**



**FIG. 5**



**FIG. 6B**

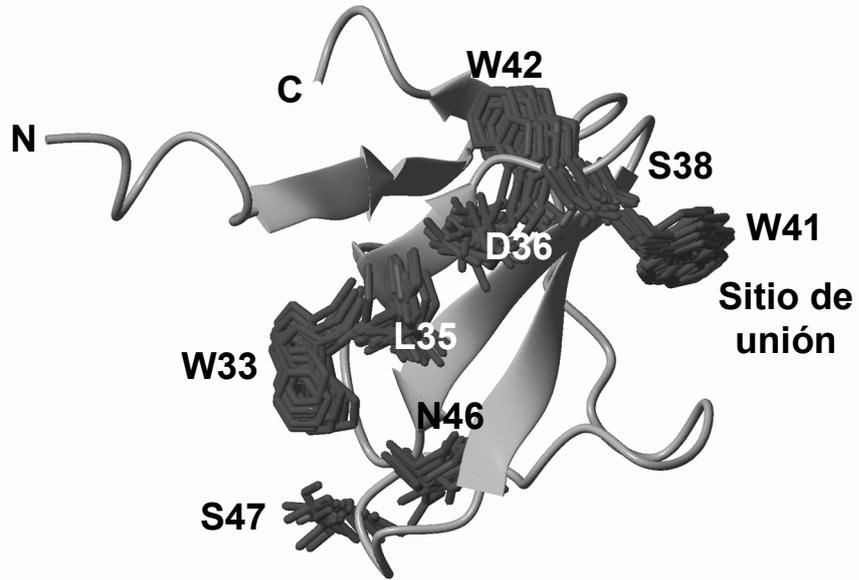


FIG. 7

### Toxicidad 48 h

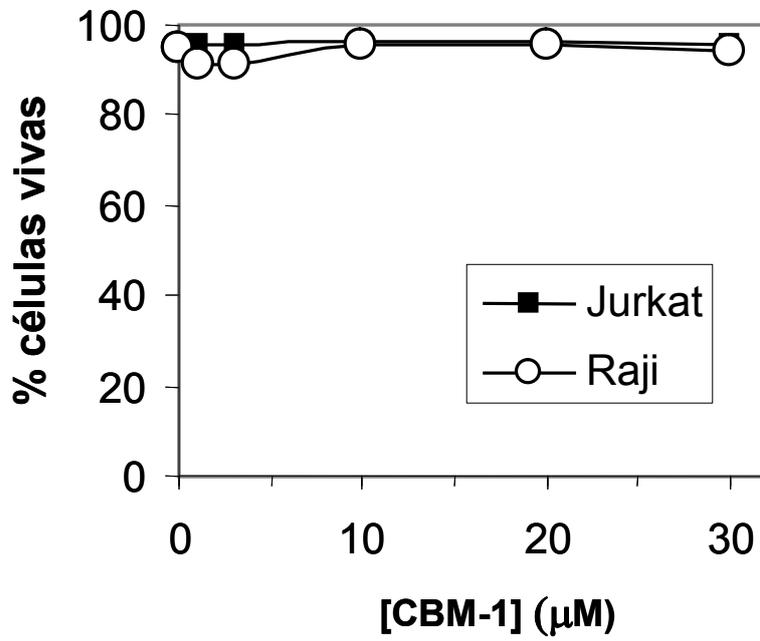


FIG. 8

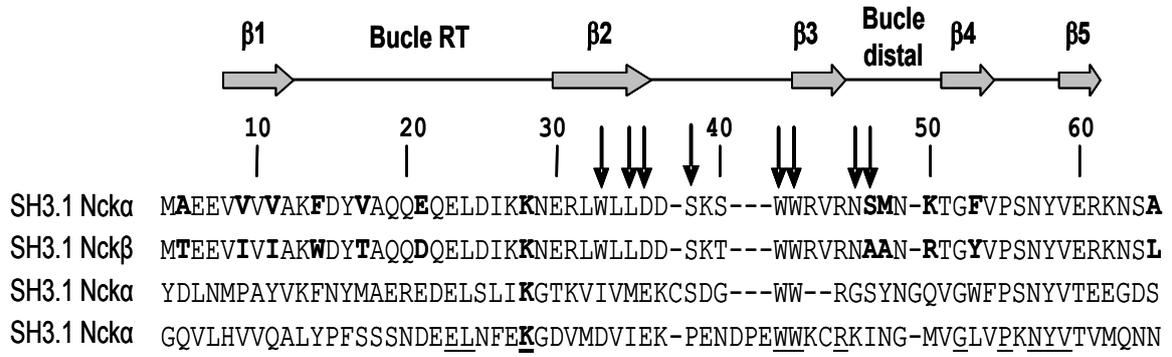


FIG. 9