(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 657 289**

(51) Int. CI.:

C07D 207/06	(2006.01)	***A61K 31/40***	(2006.01)
C07D 207/08	(2006.01)	***A61K 31/403***	(2006.01)
C07D 209/86	(2006.01)	***A61K 31/435***	(2006.01)
C07D 209/88	(2006.01)		
C07D 307/91	(2006.01)		
C07D 401/04	(2006.01)		
C07D 409/12	(2006.01)		
C07C 251/88	(2006.01)		
A61K 31/175	(2006.01)		
A61K 31/343	(2006.01)		

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.04.2013 PCT/IB2013/052623**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **03.10.2013 WO13144931**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.04.2013 E 13724389 (5)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.10.2017 EP 2831041**

(54) Título: **Inhibidores de la interacción de TCR/MHCII-colágeno útiles para el tratamiento de la artritis reumatoide**

(30) Prioridad:

30.03.2012 IT RM20120131

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
02.03.2018

(73) Titular/es:

CONSIGLIO NAZIONALE DELLE RICERCHE (50.0%)
P. le Aldo Moro, 7
00185 Roma, IT y
UNIVERSITA' CATTOLICA DEL SACRO CUORE (50.0%)

(72) Inventor/es:

DE ROSA, MARIA CRISTINA;
RIA, FRANCESCO;
GIARDINA, BRUNO;
FERRACCIOLI, GIANFRANCO;
PIROLLI, DAVIDE y
NICOLO', CHIARA

(74) Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

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

Inhibidores de la interacción de TCR/MHCII-colágeno útiles para el tratamiento de la artritis reumatoide

Estado de la técnica anterior

La artritis reumatoide (AR) es una enfermedad inflamatoria crónica que afecta al 0,5-1 % de la población. Es una enfermedad progresiva que conduce a la impotencia funcional de muchas articulaciones. La etiología de la enfermedad se desconoce, pero la autoinmunidad desempeña una función dominante en su patogénesis. De hecho, los linfocitos T y los auto-anticuerpos están presentes en la sangre de pacientes con AR. Muchos de los linfocitos T autorreactivos son específicos del colágeno humano y se pueden encontrar en articulaciones inflamadas donde promueven la respuesta inflamatoria que por último conduce a la destrucción del cartílago. Como confirmación de la función de los linfocitos T, se ha demostrado que la AR está asociada a los alelos de HLA-DR 1 y 4. Los presentes inventores han expuesto en la bibliografía que es posible encontrar linfocitos T que son específicos del colágeno humano de tipo II en el contexto de HLA-DR4 en la sangre y el líquido sinovial de los pacientes, y el nivel de células en la sangre varía en paralelo a la actividad de la enfermedad (Ria y col., Arth Res Ther 2008, 10: R135).De hecho, hemos expuesto que los linfocitos T específicos del péptido 261-273 del colágeno de tipo II (huCollp261) están presentes en grandes cantidades en la sangre al inicio de la enfermedad, disminuyendo durante las fases de remisión clínica y aumentando de nuevo en el momento de las recaídas. Una parte de estas células está enriquecida espontáneamente en el líquido sinovial durante la sinovitis. Desde un punto de vista metodológico, el método utilizado permite identificar linfocitos T individuales específicos a través de la identificación de la secuencia de la mayor parte de la región variable del receptor de linfocitos T (TCR por sus siglas en inglés, *T cell receptor*), la región CDR3 de la cadena beta de TCR, por PCR (por sus siglas en inglés *Polymerase Chain Reaction*). El TCR reconoce el antígeno para el que es específico como un complejo de un péptido (que en general comprende una longitud de entre 8 y 15 aminoácidos) con una molécula denominada HLA ("la molécula de HLA presenta el péptido al TCR").

Cada individuo tiene entre 12 y 20 de estas moléculas, teniendo cada una de ellas sus propias características químicas y siendo cada una de ellas capaz de unir un grupo de péptidos que comparten la presencia, en posiciones determinadas, de algunos aminoácidos. Cada una de las moléculas de HLA (que están codificadas en 6 locus de genes diferentes y contiguos en el cromosoma 6) tiene una variabilidad genética muy amplia, con cientos de alelos.

El conjunto de moléculas de HLA de un individuo se denomina haplotipo. Tal como se ha mencionado anteriormente, en la AR, el 50 % de los pacientes tienen HLA-DR4 o DR1 en su haplotipo. Ambas de estas moléculas de HLA presentan de manera eficaz el péptido huCollp261. Cabe añadir que el alelo HLA-DR7 también presenta el mismo tipo de péptidos presentados por HLA-DR4 y DR1. Estimamos que aproximadamente el 70 % de los linfocitos T identificados por la técnica de inmunoscopio en cada paciente son efectivamente específicos del complejo DR4/huCollp261, basándose en el hecho de que esta es la fracción de células que realmente comparte el uso de TCR comunes, este es el porcentaje de células que proliferan solo en respuesta a este péptido y no en respuesta a otros péptidos de control (Ria y col. Arth Res Ther 2008) y también basándose en la observación de que este es el porcentaje de células capaces de reconocer a este péptido en el contexto de otra proteína de reacción cruzada (observaciones no publicadas). Cabe destacar, por otro lado, que también los pacientes que no son positivos para HLA-DR4, 1 o 7, pueden esporádicamente tener la presencia de células que proliferan en respuesta del péptido huCollp261, pero en este caso, esta respuesta no está relacionada con el estado de la enfermedad. El uso de las secuencias del TCR en el diagnóstico y tratamiento de la AR en estos sujetos también fue el objeto de una patente anterior de F. Ria y G.F. Ferraccioli (documento RM2007A000429 y documento de PCT internacional: PCT/IB2008/053152). Los presentes inventores han descrito en consecuencia la interacción tridimensional entre la cadena beta del TCR y el complejo formado por el péptido del colágeno humano 261-273 (huCollp261) con HLA-DR4 (De Rosa y col., PloSOne 2010, 5:e11550), y este trabajo constituye la base del objeto de la presente solicitud de patente. Puesto que la etiología de la AR es desconocida, la terapia se ha centrado en el mecanismo patógeno común, es decir, la inflamación. Los actuales protocolos de la terapia incluyen diferentes tipos de medicaciones: AINE (fármacos antiinflamatorios no esteroideos), esteroides y los denominados FARME (fármacos antirreumáticos modificadores de la enfermedad) que también incluyen modificadores de la respuesta biológica, anticuerpos monoclonales capaces de bloquear al TNF-α a la IL-1, las citocinas principales implicadas en la respuesta inflamatoria. El tratamiento en muchos casos incluye el uso de más de uno de estos fármacos. Aunque la terapia es eficaz disminuyendo la gravedad de la enfermedad, en la mayoría de los casos la progresión continúa. En este sentido, véanse las directrices de la Sociedad Italiana de Reumatología en Clin Exp Rheumatol. 2011 (3 Suppl 66):S7-14. - Clin Exp Rheumatol. 2011 (3 Suppl 66):S15-27.- Clin Exp Rheumatol. 2011 (3 Suppl 66):S42-62).

Además, estos fármacos tienen efectos secundarios graves, generalmente proporcionales a su eficacia, y con frecuencia el tratamiento va seguido de inmunosupresión que permite el desarrollo de infecciones oportunistas o la reactivación de infecciones latentes que provocan enfermedades tales como tuberculosis y leucoencefalopatía multifocal progresiva. Por lo tanto, existe la necesidad de nuevos fármacos que interfieren más específicamente con los mecanismos de la respuesta autoinmunitaria, pero que mantienen la capacidad de controlar los agentes infecciosos. El documento US20090163545 describe un compuesto similar con un anillo de trimetoxi (compuesto con un RN: 343358-04-3) que se podría utilizar para tratar varias enfermedades, siendo una de ellas la artritis (véase la página 3). Siguiendo una idea propuesta originariamente en 1988 por L. Adorini, Liu Z, Li B, Li X, Zhang L, Lai L.

publicaron un artículo sobre la identificación de moléculas que inhiben la interacción de HLA-DR4-péptido, titulado "Identification of small-molecule inhibitors against human leukocyte antigen-death receptor 4 (HLA-DR4) through a comprehensive strategy" J. Chem Inf Model. 28 de febrero de 2011;51 (2):326-34. En este trabajo se identificaron armazones de compuestos capaces de ocupar el bolsillo de la molécula de HLA-DR4 con mayor afinidad que la de otros péptidos que se pueden utilizar para el mismo fin. Para aplicar este enfoque a la terapia de la AR, la limitación principal de estos productos es la necesidad de bloquear todas las moléculas de HLA-DR4 para obtener el efecto terapéutico deseado. El artículo mencionado anteriormente es irrelevante para los fines de la presente patente, puesto que tiene ventajas de selectividad de la diana y no interfiere con el reconocimiento del colágeno de los linfocitos T, sino más bien con la presentación de péptidos en el contexto de HLA-DR4. De hecho, para lograr un efecto terapéutico con los productos identificados por Liu y col., se inhibe también la actividad de todos aquellos linfocitos T que reconocen otros péptidos, derivados de patógenos en complejo con HLA-DR4. El objeto del producto que estamos presentando es enfocar la intervención terapéutica solo en estos complejos, consiguiendo de esta manera ventajas en términos de especificidad, selectividad y viabilidad farmacológica.

Breve descripción de la invención

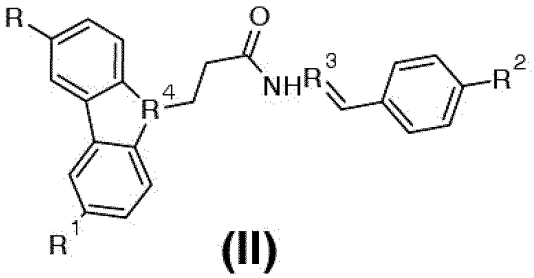
Los linfocitos T específicos del colágeno humano de tipo II, uno de los posibles autoantígenos, tienen una función fundamental en el desarrollo de la artritis reumatoide en el contexto de HLA-DR4. Las interacciones proteína-proteína entre el receptor de linfocitos T (TCR) y el colágeno de tipo II ligado al alelo MHC de clase II HLA-DR4 representan por tanto el objetivo para el desarrollo de nuevos fármacos contra la artritis reumatoide.

La presente invención surge de la búsqueda de compuestos capaces de inhibir la proliferación de linfocitos T como resultado de la interacción entre el receptor de linfocitos T (TCR) y el colágeno de tipo II ligado al alelo HLA de clase II. Utilizando CMSP (Células Mononucleares de Sangre Periférica) de pacientes que padecen artritis reumatoide, la posible toxicidad de los inhibidores candidatos se examina primero *in vitro* y, posteriormente, se demuestra la capacidad de estos inhibidores para bloquear específicamente la respuesta al colágeno humano en el contexto de HLA-DR4 y el HLA-DR7 similar.

Por lo tanto, se identifica una familia de moléculas que es capaz de bloquear selectivamente solo la respuesta inmunitaria al autoantígeno, dejando el resto del sistema inmunitario intacto y eficaz.

Por consiguiente, el objeto de la invención son los compuestos con actividad inhibidora de la interacción entre los TCR y el complejo de colágeno humano de MHCII de tipo II, o el complejo de MHCII y el fragmento peptídico antigénico en la posición 261-273 del colágeno humano de tipo II (huCollp261), mientras que son irrelevantes para las funciones restantes del sistema inmunitario.

El objeto de la presente solicitud son los compuestos que tienen la fórmula general seleccionada de las fórmulas (II) para el uso en el tratamiento de la AR.



(II)

Parte de los compuestos de fórmula (II) la constituye el compuesto: (E)-3-(3,6-dicloro-9H-carbazol-9-il)-N'-(4-hidroxi-bencilideno)propanidrazida

Entre estos compuestos, algunos se han sintetizado por primera vez por los presentes inventores. Por consiguiente, un segundo objeto de la invención son los nuevos compuestos que entran dentro de las fórmulas genéricas (II)

Un tercer objeto de la invención son las composiciones farmacéuticas que contienen todos los compuestos de fórmula (II) y excipientes farmacéuticamente aceptables.

Los compuestos de la invención se pueden utilizar de forma ventajosa en el tratamiento terapéutico, incluso sintomático, de la artritis reumatoide.

Descripción de las figuras

Fig. 1: La figura muestra los resultados de un ensayo de proliferación de linfocitos T estimulado por el péptido antigénico 261-273 de colágeno humano (huCollp261). El ensayo se realiza en ausencia de antígeno (ag-), en

presencia de antígeno (ag+) y en presencia de ag+ y de un compuesto inhibidor candidato (2S, 1S y 3S). El compuesto 2S, es decir, (9-[4-(3(R)-fenil-1(S)-propilpirrolidin-1-io-1-il)but-2-inil]fluoren-9-ol) es capaz de reducir fuertemente (aproximadamente 100 %) el índice de estimulación relativa (RSI por sus siglas en inglés: *Relative Stimulation Index*) en el contexto de HLA-DR4 y HLA-DR7. El compuesto 1S (es decir, (E)-3-(3,6-dicloro-9H-carbazol-9-il)-N'-(4-hidroxi-bencilideno) propanidrazida) reduce fuertemente (aproximadamente 100 %) el RSI en el contexto de HLA-DR11, mientras que los compuestos 2S y 3S, es decir, (N1, N5-bis (dibenzo[b,d]furan-3-il) glutaramida), reduce el RSI menos eficazmente, pero sin embargo significativamente (casi 20 %), en el contexto de HLA-DR11.

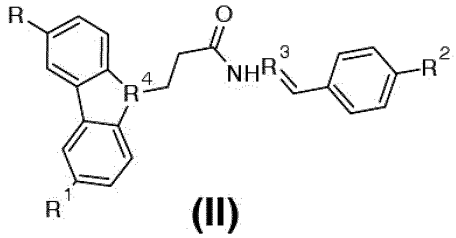
Fig. 2: La figura muestra los resultados de un ensayo de proliferación de linfocitos T obtenidos de DR1 + de un paciente, estimulado por el péptido antigénico 261-273 de colágeno humano (huCollp261). El ensayo se realiza en ausencia de antígeno (ag-), en presencia de antígeno (ag+) y en presencia de ag+ y de un compuesto inhibidor candidato (2S, 1S).

Descripción detallada de la invención

Los compuestos de la invención comparten la misma actividad farmacológica, particularmente la inhibición de la interacción entre los TCR y el complejo de MHCII- colágeno humano de tipo II, o el complejo de MHCII y el fragmento peptídico antigénico en la posición 261-273 del colágeno humano de tipo II (huCollp261), a pesar de ser irrelevante para las funciones restantes del sistema inmunitario.

Químicamente, los derivados de la invención son moléculas que comparten algunas estructuras químicas biológicamente equivalentes, tales como el grupo flúor, el grupo carbazol, el grupo dibenzofurano y que tienen la fórmula general (II)

En una realización de los compuestos de la invención estos son compuestos con la fórmula (II),



(II)

en la que R es un sustituyente seleccionado de hidrógeno y halógeno, seleccionado de cloro, bromo y yodo; R^1 es un sustituyente seleccionado de hidrógeno o halógeno seleccionado de cloro, bromo o yodo; R^2 es un sustituyente seleccionado de hidroxilo o alquilo C1-3 (metilo; etilo, n-propilo, isopropilo); R^3 es un grupo seleccionado de -N= y -CH= y R^4 es un grupo seleccionado de N o CH.

Los compuestos preferidos de fórmula (II) son los compuestos 1 a 15 indicados a continuación, incluido el compuesto (E)-3-(3,6-dicloro-9H-carbazol-9-il)-N'-(4-hidroxi-bencilideno) propanidrazida (compuesto 1).

(II)

1.
R = —Cl
R¹ = —Cl
R² = —OH
R³ = —N
R⁴ = >N—

2.
R = —Br
R¹ = —Br
R² = —OH
R³ = —N
R⁴ = >N—

3.
R = —I
R¹ = —I
R² = —OH
R³ = —N
R⁴ = >N—

4.
R = —H
R¹ = —H
R² = —OH
R³ = —N
R⁴ = >N—

5.
R = —Cl
R¹ = —Cl
R² = —CH₃
R³ = —N
R⁴ = >N—

6.
R = —Br
R¹ = —Br
R² = —CH₃
R³ = —N
R⁴ = >N—

7.
R = —I
R¹ = —I
R² = —CH₃
R³ = —N
R⁴ = >N—

8.
R = —H
R¹ = —H
R² = —CH₃
R³ = —N
R⁴ = >N—

9.
R = —Cl
R¹ = —Cl
R² = —OH
R³ = —CH
R⁴ = >N—

10.
R = —Br
R¹ = —Br
R² = —OH
R³ = —CH
R⁴ = >N—

11.
R = —I
R¹ = —I
R² = —OH
R³ = —CH
R⁴ = >N—

12.
R = —H
R¹ = —H
R² = —OH
R³ = —CH
R⁴ = >N—

13.
R = —Cl
R¹ = —Cl
R² = —OH
R³ = —N
R⁴ = >CH—

14.
R = —Br
R¹ = —Br
R² = —OH
R³ = —N
R⁴ = >CH—

15.
R = —I
R¹ = —I
R² = —OH
R³ = —N
R⁴ = >CH—

Todos los compuestos de fórmula (II) pueden estar en forma de sal en uno de los átomos de nitrógeno, tales como, por ejemplo, cloruro, bromuro, yoduro.

En el caso en el que R^4 es "=CH-" y R y R^1 son diferentes, R^4 es un centro de asimetría. En este caso, tanto la mezcla racémica como los enantiómeros individuales (R) o (S) que separan una mezcla enriquecida con uno de los enantiómeros, forman parte de la invención.

A continuación se indican las afinidades de unión de todos los compuestos de fórmula (II) calculadas por el programa AutoDock.

Compuestos de fórmula (II)	
Compuesto	Afinidad de unión (kcal/mol)
1	-7,82
2	-5,57
3	-6,34
4	-7,59

Compuestos de fórmula (II)	
Compuesto	Afinidad de unión (kcal/mol)
5	-7,44
6	-7,23
7	-7,59
8	-7,76
9	-7,80
10	-6,24
11	-5,83
12	-7,29
13	-7,23
14	-6,01
15	-6,07

Los compuestos divulgados en el presente documento se identifican y seleccionan la primera vez a través de un enfoque de "diseño de fármaco basado en la estructura" basado en la estructura tridimensional del complejo ternario TCR/huColl261/HLA-DR4.

Sin embargo, algunos de los compuestos de la invención están disponibles en el comercio a través de productores apropiados. Para el compuesto de fórmula general (II), las moléculas 1, 4 y 8 se pueden adquirir online en el sitio www.ibscreen.com usando los códigos de identificación respectivos: STOCK1S-19103, STOCK1 S-01057 y STOCK3S-37745.

Todas las moléculas conocidas se pueden adquirir también en las empresas: www.aurorafinechemicals.com, www.chemir.com, www.cyanta.com.

A diferencia de los compuestos anteriores, los compuestos 2 y 3, de 5 a 7, de 9 a 15 de la fórmula general (II),son nuevos compuestos, sintetizados por los presentes inventores. Estos compuestos como tales, sus mezclas diastereoisómeras o mezclas conformacionales o racémicas o enantiómeros individuales aislados, o sus sales correspondientes, son un objeto adicional de la presente solicitud.

Los compuestos de fórmula general (II) se pueden sintetizar también de acuerdo con métodos conocidos por el experto.

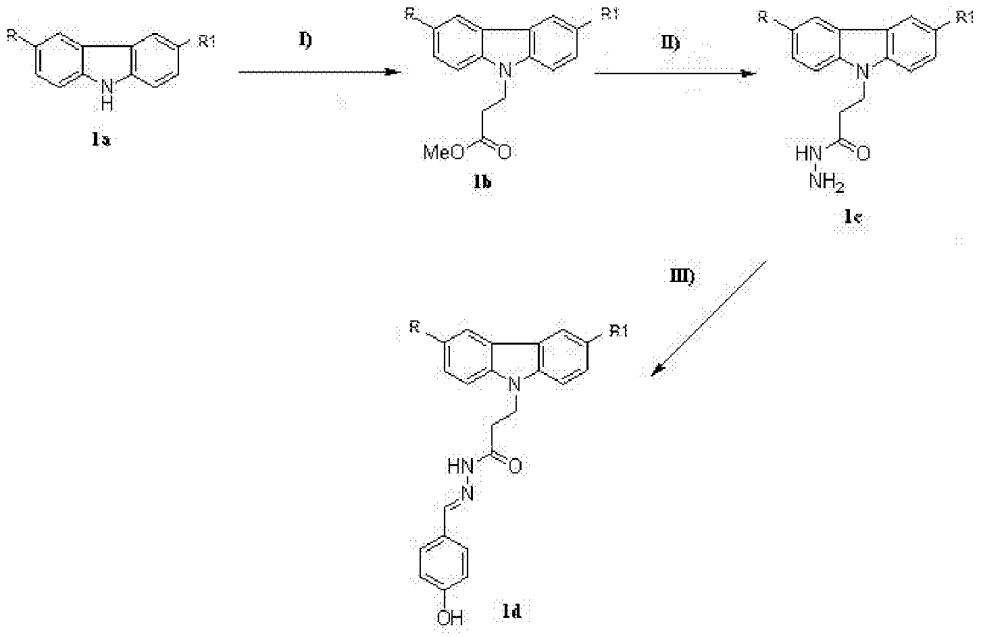
El objeto de la invención son también las composiciones farmacéuticas que contienen uno o más compuestos de la invención como su principio activo junto con un excipiente farmacéuticamente aceptable y, opcionalmente, los aditivos y estabilizadores habituales en la industria farmacéutica.

Dichas composiciones son adecuadas para el uso local o sistémico y pueden estar tanto en una formulación líquida, sólida, semisólida, como en una formulación para supositorio.

Son ejemplos de formulaciones líquidas las soluciones, las suspensiones y las emulsiones, que son adecuadas, por ejemplo, para la administración parenteral, administración parenteral local, administración oral o también en forma de pulverización. Son ejemplos de formulaciones sólidas los comprimidos, las grageas, las cápsulas, los gránulos, los comprimidos liofilizados, que son adecuados para la administración oral. Son ejemplos de formulaciones semisólidas las pastas, las pomadas, los geles, ungüentos, que son adecuados para la aplicación tópica.

Cada una de estas formulaciones debe contener una cantidad del compuesto activo que varía entre 10 microgramos y 1000 mg, preferiblemente entre 100 microgramos y 100 mg, o entre 100 microgramos y 50 mg, por ejemplo, entre 420 microgramos a 42 miligramos, por ejemplo, 0,5, 1, 10, 30 mg por unidad de dosificación (basado en las concentraciones utilizadas en los ensayos de toxicidad).

Además, el objeto de la presente invención es también un método para preparar compuestos de fórmula (II) que comprende al menos una de las etapas enumeradas en el siguiente esquema 2



Esquema de síntesis 2

El trabajo experimental subyacente a la presente invención ha permitido la selección de moléculas capaces de inhibir parcialmente o bloquear totalmente la proliferación de linfocitos T provocada por la presencia del antígeno correspondiente: en este caso provocado por el colágeno humano de tipo II, y más precisamente sus fragmentos antigénicos, tales como el fragmento 261-273 (huCollp261). La inhibición parcial se define como cualquier grado de inhibición inferior al 100 %, entre 10 % y 99 %, por ejemplo, 20 %, 30 %, 40 %, 50%, 60 %, 70 %, 80 %.

Las observaciones relevantes se muestran en la Fig 1 y en la Tabla I en el ejemplo 2. En el experimento mostrado en la Fig 1, las CMSP de cuatro pacientes (uno DR4+, uno DR7+ y dos negativos para los alelos HLA-DR asociados a AR) se cultivan en ausencia o presencia de huCollp261 (10 microM) y en el último caso también en presencia de cada uno de los tres inhibidores candidatos (I)-1 (2S), (II)-1 (1S) y (III)-1 (3S) en la misma concentración. Los resultados indican claramente cómo es capaz 2S de bloquear la proliferación de las células que responden a huCollp261 en sujetos de DR4+ o DR7+. De conformidad con la observación de que estos compuestos carecen de efectos tóxicos a concentraciones de hasta 100 microM, la proliferación de linfocitos T esporádicos que responden al mismo péptido, pero en el contexto de moléculas de HLA diferentes de DR4 1 o 7, permanece intacta. En el experimento mostrado en la Tabla I, examinamos la capacidad de 1S, 2S y 3S de inhibir la proliferación de linfocitos T específicos de huCollp261 en un mayor número de pacientes de DR4. En total, examinamos 4 pacientes de DR4+ y observamos las respuestas de 15 linfocitos T diferentes. El compuesto 1S inhibe el 13 % de estas células, 2S inhibe el 60 % y 3S inhibe el 45 %, lo que indica que los tres compuestos poseen actividad inhibidora. Es importante destacar que los tres compuestos tienen actividad inhibidora en el mismo grupo de linfocitos T; en otras palabras, las células inhibidas por 1S son también inhibidas por 2S y 3S, y las células inhibidas por 3S son también inhibidas por 2S. Esto indica que los tres compuestos tienen el mismo mecanismo de acción aunque no sean estructuralmente idénticos. Finalmente, se enfatiza que las células inhibidas por 2S son también aquellas capaces de realizar un reconocimiento en cruzado del péptido (véase anteriormente).

Sin desear limitar la invención a la teoría científica específica, se considera que la inhibición de la proliferación de linfocitos T por los compuestos de la invención es la consecuencia de la interferencia inhibidora sobre los mecanismos de interacción entre los receptores de linfocitos T (TCR) y el complejo HLA DR-Colágeno.

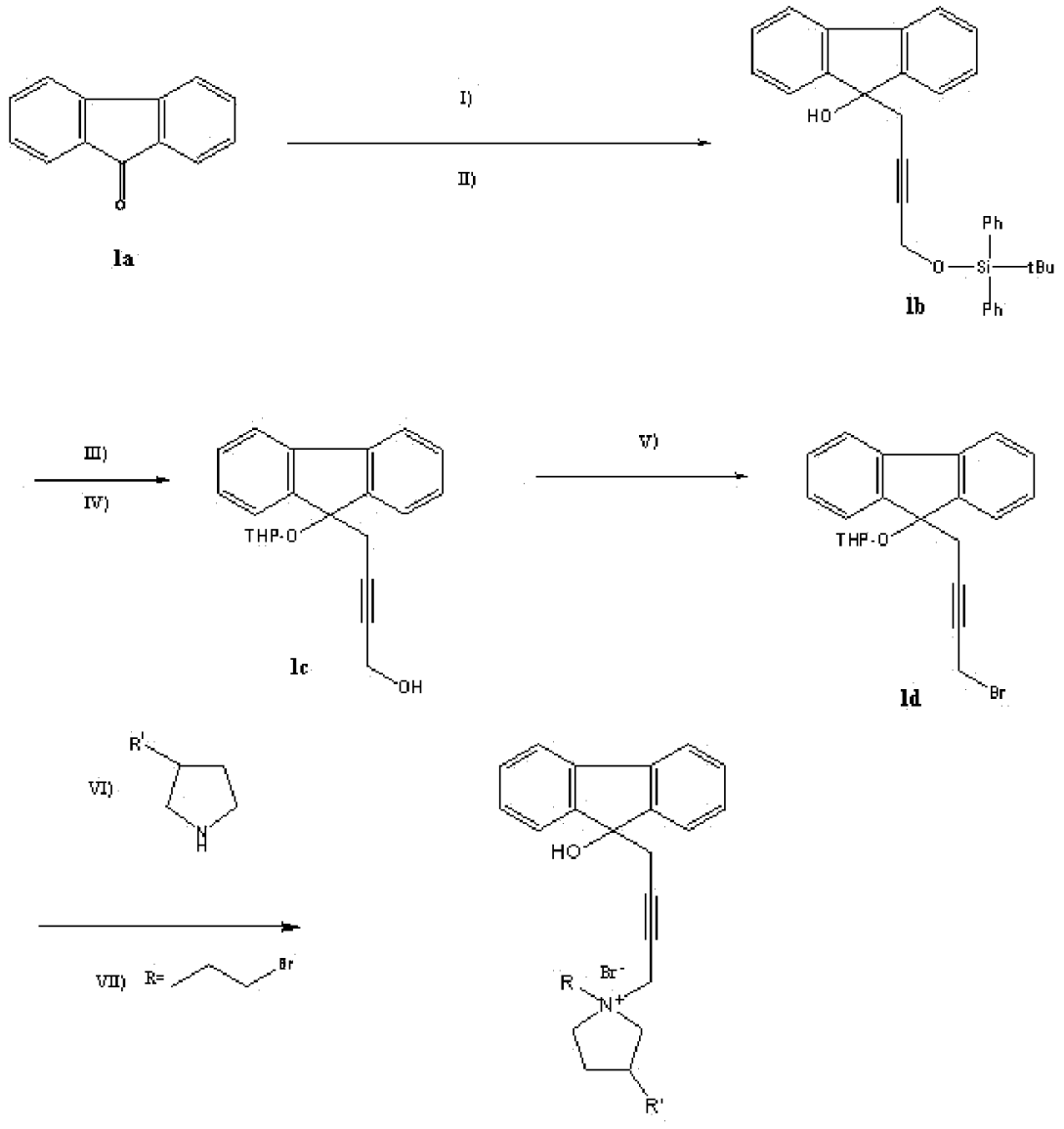
Esta hipótesis está respaldada por las siguientes observaciones: 1. Los compuestos no presentan toxicidad sobre las CMSP, 2. Aunque los compuestos no son idénticos estructuralmente, inhiben la proliferación de células que pertenecen funcionalmente al mismo grupo, lo que indica que el mecanismo subyacente a la inhibición es el mismo; 3. Los linfocitos T que están sometidos a la acción inhibidora son los mismos que tienen la capacidad de realizar un reconocimiento en cruzado del péptido de otro origen. En consecuencia, la acción de los compuestos está limitada específicamente a un grupo homogéneo de linfocitos T que comparten la base molecular del reconocimiento del complejo huCollp261 en complejo con HLA-DR4, DR1 y DR7. Además, los datos de modelado molecular no demuestran de forma convincente que los compuestos actúen bloqueando el bolsillo de unión de la molécula de HLA para el péptido huCollp261.

En consecuencia, se puede afirmar de forma razonable que las moléculas de la invención bloquean selectivamente solo la respuesta inmunitaria del autoantígeno, es decir, el péptido 261-273 de colágeno humano de tipo II, dejando el resto del sistema inmunitario intacto y eficiente.

Las concentraciones de los compuestos ensayados con respecto a su toxicidad son del orden de micromoles/l. Por ejemplo, 1, 5, 10, 20, 50, 100 micromoles/l. La concentración ensayada con respecto a la actividad es de aproximadamente 10 micromoles/l.

Los resultados experimentales demuestran que la molécula (2S): 9-[4-(3-fenil-1-propilpirrolidin-1-io-1-il)-but-2-inil]fluoren-9-ol bloquea completamente la proliferación de linfocitos T específicos del fragmento de colágeno huCollp261 en el contexto de DR4 (Fig.1), que la molécula (1S): (E)-3-(3,6-dicloro-9H-carbazol-9-il)-N'-(4-hidroxi-bencilideno) propanidrazida) reduce fuertemente RSI (aproximadamente 100 %) en el contexto de HLA-DR11, mientras que los compuestos 2S (anteriormente) y 3S: N1, N5-bis (dibenzo[b,d]furan-3-il) glutaramida, suprimen la proliferación de linfocitos T en el contexto de DR11 de una manera estadísticamente significativa, aunque menos eficazmente.

Ejemplo de referencia 1: Síntesis del compuesto 9-[4-(3(S)-fenil-1(S)-propilpirrolidin-1-io-1-il)but-2-mil]fluoren-9-ol. La síntesis se realiza de acuerdo con el siguiente esquema 1:



la lb lc ld

1

Esquema de síntesis 1

I) El compuesto 1a (3 g, $1{,}66 \cdot 10^{-2}$ mol), disponible en el comercio, se disuelve en Et_2O (dietiléter) (250 ml). Al mismo se le añade una solución de éter de *t*-$BuPh_2SiOCH_2CCCH_2MgBr$ (bromuro de {4-[(terc-Butildifenilsilil)-oxi]-2-butin-1-il}magnesio), (1,66 • 10^{-2} mol en 250ml) (Tetrahedon Letters 1993, 5467).

II) La solución de NH_4Cl (cloruro de amonio) se añade, se agita durante 15 minutos y después se extrae con AcOEt (acetato de etilo). La fase orgánica se concentra al vacío y se purifica por cromatografía de gravedad [gel de sílice, $CHCl_3$(cloroformo)-MeOH(metanol) (98:2)]. El producto1b se obtiene con un rendimiento del 70 %.

III) A una solución de 1b (5,67 g, $1{,}162 \cdot 10^{-2}$ mol) y PPTS (p-toluenosulfonato de piridinio) (0,117 g, $4{,}6 \cdot 10^{-4}$ mol) en CH_2Cl_2(diclorometano) (500 ml), se le añade por goteo una solución de DHP (dihidropirano) (3,2 ml, $3{,}5 \cdot 10^{-2}$ mol). La reacción se deja bajo agitación a temperatura ambiente durante 4h, se lava con una solución saturada de $NaHCO_3$ (bicarbonato de sodio) y se extrae con CH_2Cl_2.

La fase orgánica se anhidrifica con Na_2SO_4 (sulfato de sodio), se filtra y se concentra al vacío.

IV) El producto en bruto se disuelve en THF anhidro (tetrahidrofurano). Esta solución se lleva a una temperatura de 0 °C, se añade TBAF (fluoruro de tetrabutilamonio) (2,63 g, $1{,}3.10^{-2}$ mol) y se coloca bajo agitación a temperatura ambiente durante 45 min. La mezcla resultante se diluye con CH_2Cl_2 y se desactiva con H_2O (agua). La fase orgánica se lava con salmuera (solución saturada de cloruro sódico), anhidrificada con Na_2SO_4 y concentrada al vacío.

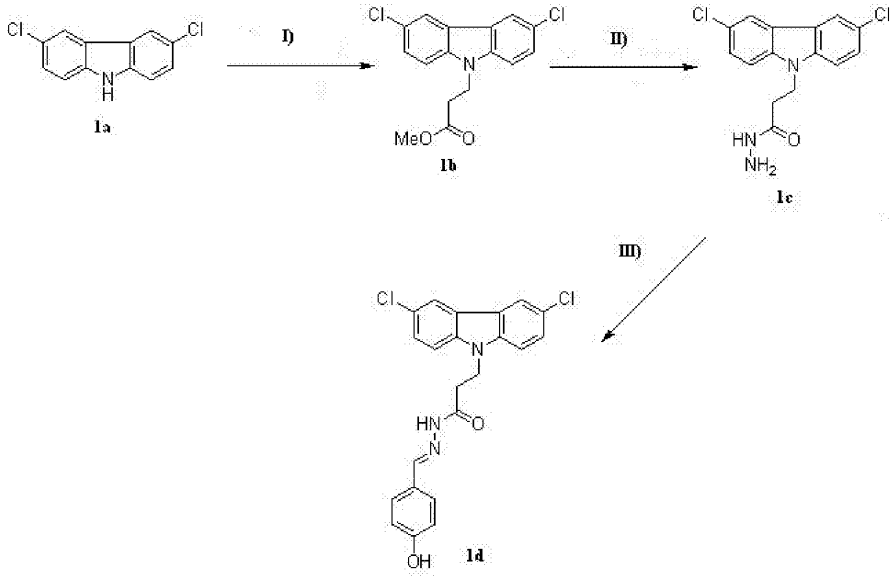
V) A una solución de compuesto 1c (3,88 g, $1{,}162 \cdot 10^{-2}$ mol) y Et_3N (trietilamina) (4,8 ml, $3{,}2 \cdot 10^{-2}$ mol) en THF anhidro (500 ml), PBr3 (tribromuro de fósforo) se añade (1,5 ml, 1,162 • 10^{-2} mol) a una temperatura de -20 °C. La reacción se deja bajo agitación a temperatura ambiente durante 4h añadiéndose después H_2O. La mezcla obtenida de esta manera se extrae con AcOEt. La fase orgánica se lava con salmuera (solución saturada de cloruro sódico), anhidrificada con Na_2SO_4 y concentrada al vacío. El producto en bruto se purifica por cromatografía de gravedad [gel de sílice, Hexano-EtOAc (70:30)]. El producto 1d se obtiene con un rendimiento del 50 %.

VI) A una solución de compuesto 1d (2,3 g, $5{,}8 \cdot 10^{-3}$ mol) y Et_3N (0,725 ml, $1{,}16 \cdot 10^{-2}$ mol) en THF anhidro (380 ml), se le añade el compuesto 3 (0,848 g, $5{,}8 \cdot 10^{-3}$ mol) (Khimiko-Farmatsevticheskii Zhurnal, 25(4), 60-2; 1991) a una temperatura de -20 °C. La reacción se deja bajo agitación a temperatura ambiente durante 4h añadiéndose después H_2O. La mezcla obtenida de esta manera se extrae con AcOEt. La fase orgánica se lava con salmuera (solución saturada de cloruro sódico), anhidrificada con Na_2SO_4 y concentrada al vacío.

VII) El producto en bruto se disuelve en THF caliente y a la solución se le añade n-PrBr (0,528 ml, $5{,}8 \cdot 10^{-3}$ mol) (bromuro de propilo). La reacción se deja a reflujo durante 2h y se concentra al vacío.

VIII) El producto en bruto se solubiliza en THF seco, la solución se lleva a 0 °C, se acidifica con AcOH 1M (ácido acético) y se deja bajo agitación durante 3h a temperatura ambiente. La solución se concentra al vacío.

Ejemplo 2: Síntesis del compuesto ((E)-3-(3,6-dicloro-9H-carbazol-9-il)-N'-(-4-hidroxi-bencilideno)propanidrazida



Esquema de síntesis 3

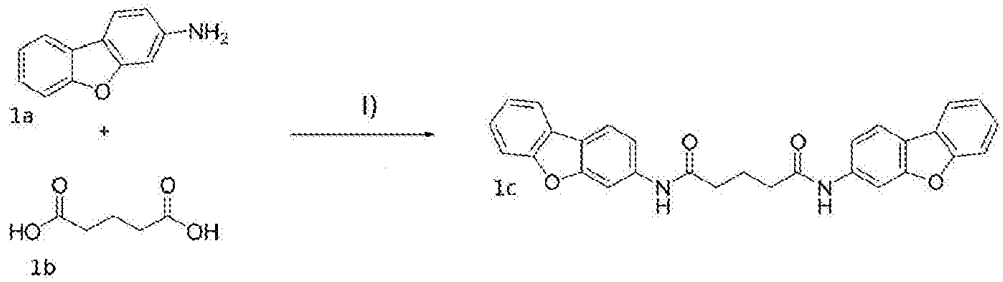
I) Una solución de 3,6-dicloro-9H-carbazol (compuesto 1a), disponible en el comercio, (1,06 g, 4,5 mmol) y acrilato de metilo (0,45 ml, 5 mmol) en ácido acético se deja bajo agitación durante 24 horas en un tubo cerrado a una temperatura de 90 °C. La mezcla reactiva se purifica en agua y hielo, se basifica con Na2CO3 y se extrae en diclorometano. Los extractos orgánicos se lavan con una solución saturada de Na2CO3, se secan en Na2SO4, y se concentran a presión reducida. El resto se purifica por cromatografía ultrarrápida (SiO_2, eluyendo en un gradiente de hexano a hexano/EtOAc 8:2) para producir el compuesto 1b, metil3-(3,6-dicloro-carbazol-9-il) propionato (1,28 g, 88 %).

II) Una solución de 1b (1,28 g, 3,96 mmol y sol de hidrato de hidrazina al 50 % (0,25 ml, 4 mmol) en etanol se calienta a reflujo y se deja bajo agitación durante 6 horas. El disolvente se elimina a presión reducida. El compuesto 1c, hidrazida de ácido 3-(3,6-dicloro-carbazol-9-il)-propiónico se obtiene en un rendimiento cuantitativo sin purificación adicional.

III) Una solución de 1c (1,28 g, 3,96 mmol) e 4-hidroxibenzaldehído (484 mg, 3,96 mmol) en etanol se calienta a reflujo y se agita durante 12 horas. Después, el disolvente se elimina a presión reducida. La reacción en bruto se redisuelve en acetato de etilo y se lava con HCl 1N y con salmuera (solución acuosa saturada de NaCl). La fase orgánica se seca en Na2SO4, y se concentra a presión reducida. El resto se cristaliza a partir de una mezcla de EtOAc/éter de petróleo 40:60 para dar un sólido cristalino de compuesto 1d, (4-hidroxi-bencilideno)-hidrazida de ácido (E)-3-(3,6-dicloro-carbazol-9-il)-propiónico (1,5 g, 90 %).

Un procedimiento sintético análogo se puede utilizar para los compuestos con la fórmula (II) 2,3,4, utilizando 3,6-dibromo-9H-carbazol, 3,6-diyodo-9H-carbazol y 9H-carbazol como producto inicial, respectivamente.

Ejemplo de referencia 3: Síntesis del compuesto 3S (N1,N5-bis(dibenzo[b,d]furan-3-il) glutaramida.



Esquema de síntesis 4

I) En un matraz se introducen 366 mg de 1a (3-aminodibenzofurano, 2,0 mmol), 1b (132 mg de ácido glutárico, 1,0 mmol), 135 mg de HOBT (1,0 mmol), 10 ml de diclorometano y 0:14 ml de trietilamina (1,0 mmol). La solución se enfría a 0 °C con un baño de hielo y se añaden 206 mg de DCC (1,0 mmol). Se deja bajo agitación durante 15 minutos y después se elimina el baño de hielo. Después de un tiempo corto, se forma un precipitado blanco de ciclohexilurea, se deja bajo agitación durante otras 3 horas, después se filtra en un filtro de Gooch y el disolvente se evapora a presión reducida. El producto en bruto se purifica por cromatografía de columna (eluyente EtOAc: hexano 25:75), el producto puro 1c se obtiene con un rendimiento del 80 %.

Para la síntesis de los otros derivados es suficiente trabajar con un exceso de ácido glutárico de tal manera que se aísle el producto mono-amidificado. Después procedemos con la siguiente reacción en las mismas condiciones, pero utilizando un 3-aminodibenzofurano o un 3-aminodibenzotiofeno sustituido de manera apropiada.

Ejemplo 4: Ensayo de proliferación de linfocitos T para pacientes de DR4+ y DR7+

Utilizando un gradiente de densidad, se aíslan células mononucleares (CMSP, Células Mononucleares de Sangre Periférica) de cuatro pacientes con artritis reumatoide. Un paciente es DR4+, uno es DR7+ (DR4, DR7 y DR1 presentan los mismos péptidos y la respuesta al péptido de colágeno humano 261-273 restringido por estos alelos, utiliza los mismos TCR); dos pacientes son negativos para DR4, DR1 o DR7. Las CMSP se cultivan a una concentración de 5x106 células/ml en placas de 24 pocillos en medio RPMI 1640 complementado como se describe (Arth Res Ther, 2008) sin (ag-) o con el péptido antigénico (10 µg/ml, ag+) o con la misma concentración de péptido en presencia de una concentración equimolar de la mezcla diastereoisómera comercial de 9-[4-(3-fenil-1-propilpirrolidin-1-io-1-il)but-2-inil]fluoren-9-ol (2S) comprendiendo el enantiómero activo 9-[4-(3(R)-fenil-1(S)-propilpirrolidin-1-io-1-il)but-2-inil] fluoren-9-ol, en un volumen final de 1 ml. Después de tres días, las células se recogen y se realiza el análisis con "inmunoscopio" como se ha descrito anteriormente. Este análisis permite la identificación de linfocitos T que proliferan en respuesta al antígeno. Esta proliferación se denomina RSI (índice de estimulación específica) correspondiendo un valor de 1 a la muestra no estimulada. El gráfico (figura 1) muestra la capacidad de 9-[4-(3-fenil-1-propilpirrolidin-1-io-1-il)but-2-inil]fluoren-9-ol para bloquear la proliferación de los linfocitos T que responden a la presencia del péptido antigénico 261-273 (huCollp261) solo en el contexto de HLA-DR4 o DR7 que comparten ampliamente la capacidad de unir péptidos.

Mientras que se limitan a este experimento, las otras dos moléculas sometidas a ensayo (1S y 3S) muestran una capacidad y especificidad de inhibición más moderadas, en un experimento realizado en un grupo más grande de pacientes, cuyos resultados se enumeran en la Tabla I, 1S y 3S también muestran una capacidad significativa para inhibir la proliferación de linfocitos T específicos al colágeno de Tipo II en el contexto de DR4+.

Tabla I

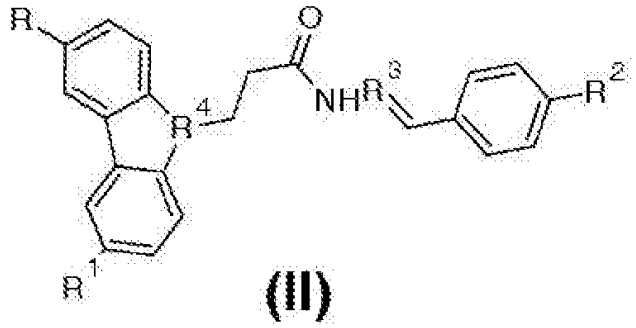
CMSP de 4 pacientes con AR HLA-DR4+ se estimulan con huCollp261 en presencia de cada uno de los 3 compuestos que son el objeto de esta patente.			
Compuesto	Número de linfocitos T específicos	Número de células inhibidas	%
1S	15	2	13
2S	15	9	60
3S	11*	5	45
*en un paciente no es posible ensayar este compuesto debido a la cantidad insuficiente de células obtenida del muestreo.			

Ejemplo 4: ensayo para la proliferación de linfocitos T en pacientes de DR1+

Tres tipos de linfocitos T específicos para huCollp262 (TRBV25 (133), TRBV19 (101) y TRBV25 (146)), obtenidos de un paciente de Dr1+ DR4-, se someten a un ensayo de proliferación efectuado como se describe en el ejemplo 2 anterior. En particular, el ensayo se realiza en ausencia de antígeno (ag-), en presencia de antígeno (ag +) y en presencia de ag+ y de un compuesto inhibidor candidato (1S y 2S). Los resultados se expresan como un % de inhibición de expansión de linfocitos T (TRBV25 (133), TRBV19 (101) y TRBV25 (146)) en ausencia de inhibidor, a las concentraciones indicadas de dos inhibidores. Como se muestra en la figura 2, el compuesto 1S, es decir, ((E)-3-(3,6-dicloro-9H-carbazol-9-il)-N'-(4-hidroxibencilideno) propanidrazida) es capaz de reducir fuertemente (aproximadamente 100 %) la tasa de estimulación específica (RSI) de linfocitos T en el paciente de DR1+, en dos células de tres a una concentración 10 veces inferior que la del compuesto 2S (9-[4-(3(R)-fenil-1(S)-propilpirrolidin-1-io-1-il)but-2-inil]fluoren-9-ol). Por lo tanto, estos datos demuestran que el compuesto 1S es un inhibidor específico del reconocimiento de colágeno II, también en el contexto de DR1 +.

REIVINDICACIONES

1. Un inhibidor de la interacción entre linfocitos T y el complejo de MHC-II y el colágeno humano de tipo II o fragmento antigénico del mismo, para su uso en el tratamiento de la artritis reumatoide, caracterizado por que dicho inhibidor tiene la fórmula química (II)



(II)

en la que R y R^1 se seleccionan independientemente de hidrógeno, cloro, bromo o yodo; R^2 es un sustituyente de hidroxilo, metilo, etilo, n-propilo, isopropilo; R^3 se selecciona de N y CH y R^4 se selecciona de N o CH, y está en forma de una mezcla racémica de enantiómeros aislados o sus sales.

2. El inhibidor de acuerdo con la reivindicación 1, para su uso en el tratamiento de la artritis reumatoide, en el que el fragmento antigénico de colágeno humano de tipo II es el péptido 261-273.

3. El inhibidor según la reivindicación 1, para su uso en el tratamiento de la artritis reumatoide, seleccionado de:

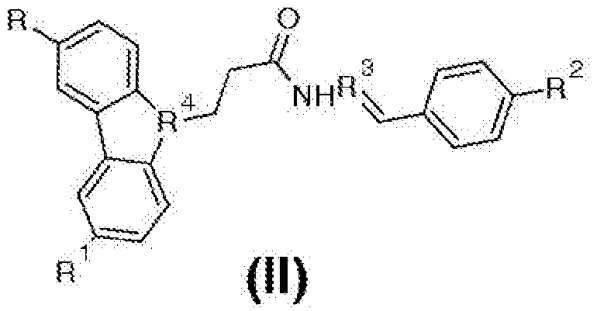
(E)-3-(3,6-dicloro-9H-carbazol-9-il)-N'-(4-hidroxi-bencilideno) propanidrazida o sus sales.

4. El inhibidor de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, para su uso en el tratamiento de la artritis reumatoide, en el que el paciente es HLA-DR4 y/o HLA-DR7 positivo.

5. Una composición farmacéutica que incluye, como principio activo, un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

6. La composición de acuerdo con la reivindicación 5, para su uso en el tratamiento de la artritis reumatoide.

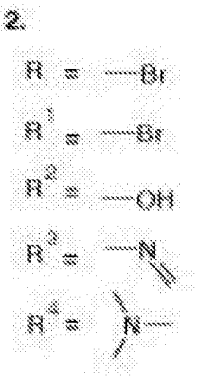
7. Los compuestos de fórmula general (II)



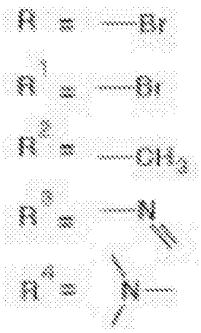
(II)

o sus sales, seleccionados de acuerdo con los siguientes compuestos

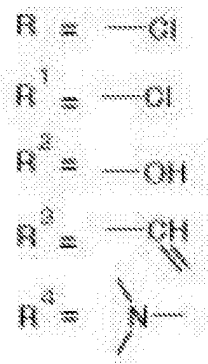
2.



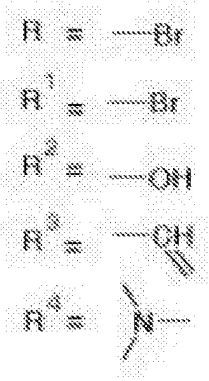
6.



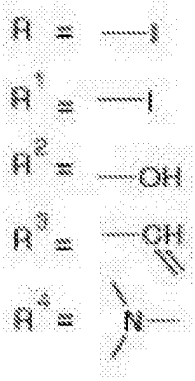
9.



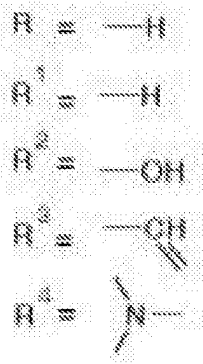
10.



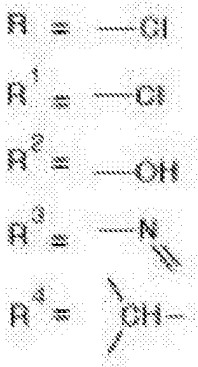
11.



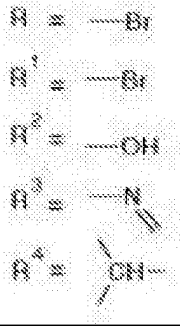
12.



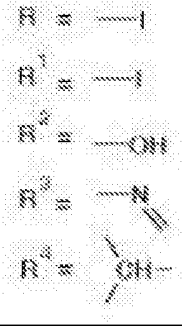
13.



14.



15.



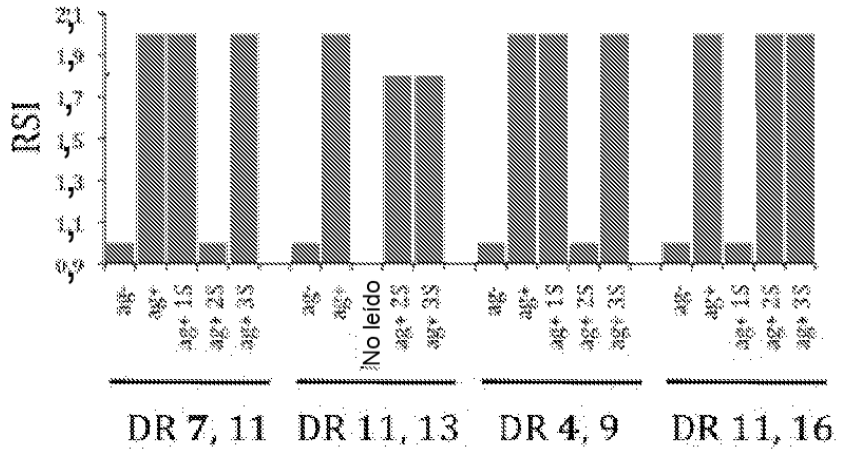


FIG: 1

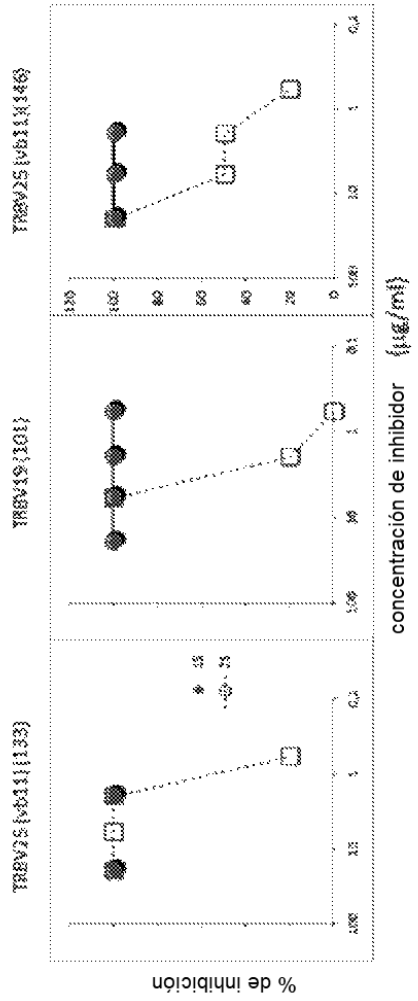


FIG: 2