

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 702 337**

51 Int. Cl.:

**C07C 279/26** (2006.01)

**A61K 31/155** (2006.01)

**A61P 37/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.04.2015 PCT/KR2015/004299**

87 Fecha y número de publicación internacional: **05.11.2015 WO15167243**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.04.2015 E 15786179 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.10.2018 EP 3130582**

54 Título: **Compuesto que tiene un efecto terapéutico en las enfermedades inmunitarias y uso del mismo**

30 Prioridad:

**29.04.2014 KR 20140051261**

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

**28.02.2019**

73 Titular/es:

**THE CATHOLIC UNIVERSITY OF KOREA  
INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION  
FOUNDATION (100.0%)  
222 Banpo-daero Seocho-gu  
Seoul 137-701, KR**

72 Inventor/es:

**CHO, MI-LA;  
SHIN, DONG-YUN;  
PARK, SUNG-HWAN;  
YANG, CHUL- WOO;  
CHOI, JONG-YOUNG;  
PARK, MIN-JUNG;  
SON, HYE-JIN;  
LEE, SUNG-HEE;  
LEE, SEON-YEONG;  
KIM, EUN-KYUNG;  
KIM, JAE-KYUNG;  
LEE, SEUNG-HUN y  
PARK, SEONG-HYEOK**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

ES 2 702 337 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

Compuesto que tiene un efecto terapéutico en las enfermedades inmunitarias y uso del mismo

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a un nuevo compuesto que tiene excelentes efectos terapéuticos y preventivos de enfermedades inmunitarias y un uso del mismo.

10 **Antecedentes de la técnica**

Las enfermedades inmunitarias son las enfermedades en las que los componentes del sistema inmunitario de los mamíferos causan, median o contribuyen a los estados patológicos de los mamíferos. En particular, los trastornos inflamatorios son uno de los problemas de salud más importantes del mundo. En general, la inflamación es una respuesta protectora localizada de los tejidos corporales contra la invasión del hospedador por sustancias extrañas o estímulos dañinos. Las causas de la inflamación incluyen infecciones como infección bacteriana, infección viral o infección parasitaria; causas físicas tales como quemaduras o irradiación; productos químicos tales como toxinas, fármacos o agentes industriales; respuesta inmunitaria como reacciones alérgicas y autoinmunitarias; o afecciones asociadas al estrés oxidativo.

La inflamación se caracteriza por dolor, enrojecimiento, hinchazón, fiebre y en última instancia pérdida de la función de los sitios afectados. Estos síntomas son el resultado de una serie compleja de interacciones entre los linfocitos del sistema inmunitario. Las respuestas entre los linfocitos dan como resultado la red de interacción de varios grupos de mediadores inflamatorios: proteínas (por ejemplo, citocinas, enzimas (por ejemplo, proteasa, peroxidasa), proteínas básicas principales, moléculas de adhesión (ICAM, VCAM), mediadores de lípidos (por ejemplo, eicosanoides, prostaglandinas, leucotrienos, factor de activación plaquetaria (PAF), especies reactivas de oxígeno (por ejemplo, hidroperóxido, anión superóxido O<sub>2</sub><sup>-</sup>, óxido nítrico (NO) y similares). Sin embargo, la mayoría de estos mediadores inflamatorios también son reguladores en las actividades de los linfocitos normales y, por lo tanto, en caso de deficiencia de la reacción inflamatoria, el hospedador no puede controlar los daños (es decir, las infecciones). La inflamación crónica causa las enfermedades inflamatorias mediadas por la formación excesiva de muchos de los mediadores mencionados anteriormente.

Y también, la enfermedad autoinmunitaria, una de las enfermedades inmunitarias, se caracteriza por respuestas espontáneas del sistema inmunitario para atacar los propios órganos. Estas respuestas son causadas por el reconocimiento de autoantígenos por los linfocitos T, lo que induce respuestas inmunitarias humorales (generadas por autoantígenos) y respuestas inmunitarias mediadas por células (aumento de las actividades citotóxicas de los linfocitos y macrófagos). Las enfermedades autoinmunitarias incluyen las siguientes: enfermedades reumatoides, psoriasis, dermatomiositis sistémica, esclerosis múltiple, lupus eritematoso o deterioro de la respuesta inmunitaria a antígenos, es decir, asma, alergia a medicamentos o alimentos o similares. Todas estas enfermedades son enfermedades restrictivas y crónicas; y también son mortales en algunos casos. Sin embargo, la situación actual es que hasta ahora no existe una terapia eficaz para tratar dichas enfermedades. Por lo tanto, se espera que los medicamentos o agentes capaces de aliviar o mitigar la progresión de tales enfermedades sean medios importantes para la salud del paciente.

Se han llevado a cabo diversas investigaciones de terapias de las enfermedades autoinmunitarias para encontrar fármacos y métodos apropiados para su tratamiento. Las terapias actuales de las enfermedades autoinmunitarias se basan principalmente en el uso de fármacos inmunosupresores como los glucocorticoides, los inhibidores de la calcineurina y los antiproliferativos y antimetabolitos, ver los documento WO 2003/089601, que se refiere a la inhibición de la 2-desoxiglucosona; US 2013/095140, que se refiere al tratamiento de trastornos metabólicos; y US 2011/053941 que se refiere a la inmunosupresión mediada por 2,3-dioxigenasa. Sin embargo, estas terapias farmacológicas actúan sobre diversas dianas, lo que puede causar la disminución de la función inmunológica en general. Por otro lado, el uso a largo plazo de estas terapias farmacológicas provoca varios problemas de citotoxicidad e inhibe el sistema inmunitario de manera no específica, lo que puede exponer a los pacientes al riesgo de infecciones y cánceres. Dado que los inhibidores de la calcineurina y los glucocorticoides provocan otro problema debido a su nefrotoxicidad y sus propiedades inductoras de diabetes, su uso está limitado en los casos de algunos síntomas clínicos (como insuficiencia renal, diabetes, etc.).

Por lo tanto, existe la necesidad de desarrollar nuevos agentes terapéuticos para tratar enfermedades inmunitarias como las enfermedades autoinmunitarias y las enfermedades inflamatorias, que tienen excelentes efectos terapéuticos sin efectos secundarios. Los presentes inventores han llevado a cabo investigaciones para descubrir los agentes que pueden prevenir o tratar con eficacia enfermedades inmunitarias y mostrar pocos efectos secundarios; y, como resultado de las mismas, se confirmó que los compuestos sintetizados pueden tratar eficazmente enfermedades inmunitarias y se completó la presente invención.

La N-etil-N-(4-fluorofenil)-biguanida (RN 1555308-85-4) se ha divulgado en el catálogo químico de Aurora Fine Chemicals. En lo sucesivo también se denomina compuesto SD-282.

**Divulgación**

**Problema técnico**

Por lo tanto, es un objetivo de la presente divulgación proporcionar un compuesto.

5 Es un objetivo de la presente invención proporcionar una composición farmacéutica para prevenir o tratar una enfermedad inmunitaria, que comprende el compuesto como un principio activo.

10 Además, otro objetivo más de la presente divulgación es proporcionar un inmunomodulador que comprende el compuesto como principio activo.

15 Además, otro objetivo de la presente divulgación es proporcionar un método para reducir la diferenciación de linfocitos T nativos en linfocitos Th17 y la actividad de linfocitos Th17, que comprende tratar linfocitos T nativos con el compuesto *in vitro*.

Además, es otro objetivo de la presente divulgación proporcionar un método para aumentar la diferenciación de linfocitos T nativos en linfocitos Treg y la actividad de linfocitos Treg, que comprende tratar linfocitos T nativos con el compuesto *in vitro*.

**20 Solución técnica**

La presente invención se refiere a una composición farmacéutica para su uso para facilitar o aumentar la actividad de los linfocitos T reguladores y para reducir o inhibir la actividad de los linfocitos Th17 patógenos en una enfermedad inmunitaria, que comprende N-etil-N-(4-fluorofenil)-biguanida o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma.

25 En una realización, el compuesto puede reducir o inhibir la formación de citocinas proinflamatorias, inhibir la producción de autoanticuerpos e inhibir la diferenciación en osteoclastos.

30 En una realización, la citocina proinflamatoria puede ser IL-17, IL-6, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , MMP-9 o STAT-3.

En una realización, el anticuerpo puede ser IgG, IgG1 o IgG2a.

35 En una realización, la composición puede comprender el compuesto en una concentración que varía de 0,1 mM a 10 mM.

En una realización, la enfermedad inmunitaria puede seleccionarse del grupo que consiste en una enfermedad autoinmunitaria; una enfermedad inflamatoria; y una enfermedad de rechazo de trasplante de células, tejidos u órganos.

40 En una realización, la enfermedad inmunitaria se puede seleccionar de artritis reumatoide, enfermedad de Behcet, polimiositis o dermatomiositis, citopenia autoinmunitaria, miocarditis autoinmunitaria, dermatitis atópica, asma, cirrosis primaria, dermatomiositis, síndrome de Goodpasture, meningitis autoinmunitaria, síndrome de Sjögren, lupus, enfermedad de Addison, alopecia areata, mielitis anquilosante, hepatitis autoinmunitaria, paperas autoinmunitarias, enfermedad de Crohn, diabetes insulino-dependiente, epidermolisis bullosa distrófica, epididimitis, glomerulonefritis, enfermedad de Graves, enfermedad de Guillain-Barré, enfermedad de Hashimoto, anemia hemolítica, esclerosis múltiple, miastenia gravis, pénfigo vulgar, psoriasis, fiebre reumática, sarcoidosis, esclerodermia, espondiloartropatía, tiroiditis, vasculitis, vitiligo, mixedema, anemia perniciosa, síndrome relacionado con las mitocondrias y colitis ulcerosa.

50 En una realización, la enfermedad de rechazo de trasplante puede ser una enfermedad de injerto contra huésped.

Además, la presente divulgación proporciona un inmunomodulador que comprende el compuesto como un principio activo.

55 Además, la presente divulgación proporciona un método para reducir la diferenciación de linfocitos T nativos en linfocitos Th17 y la actividad de linfocitos Th17, que comprende tratar linfocitos T nativos con el compuesto *in vitro*.

Además, la presente divulgación proporciona un método para aumentar la diferenciación de linfocitos T nativos en linfocitos Treg y la actividad de los linfocitos Treg, que comprende tratar linfocitos T nativos con el compuesto *in vitro*.

**60 Efectos ventajosos**

La presente invención se refiere al compuesto SD-282 capaz de prevenir y tratar eficazmente enfermedades inmunitarias y su uso. El compuesto SD-282 tiene efectos de inhibir la formación de citocinas proinflamatorias, aumentar la actividad de los linfocitos T reguladores que tienen funciones inmunorreguladoras, inhibir la producción de autoanticuerpos para regular las respuestas inmunitarias excesivas e inhibir la diferenciación en osteoclastos y, por lo tanto, puede utilizarse para el tratamiento de enfermedades inmunitarias, como las enfermedades autoinmunitarias,

65

enfermedades inflamatorias y enfermedades de rechazo de trasplantes, que son causadas por la regulación anormal de varios tipos de respuestas inmunitarias.

**Descripción de los dibujos**

- 5 La Figura 1 muestra los resultados obtenidos al analizar la citotoxicidad, la producción de autoanticuerpos, la formación de citocinas proinflamatorias y la expresión de genes proinflamatorios, de acuerdo con el tratamiento de los esplenocitos obtenidos de ratones normales con el compuesto SD-281 en concentraciones predeterminadas.
- 10 También se observó si la diferenciación en osteoclastos se regula de acuerdo con el tratamiento con el compuesto SD-281.
- 15 La Figura 2 muestra los resultados obtenidos al analizar la inhibición de Th17 y la facilitación de la actividad de Treg; y la inhibición de Th17 sobreactivados, de acuerdo con el tratamiento de los esplenocitos obtenidos de ratones normales con el compuesto SD-281 en concentraciones predeterminadas; y los resultados obtenidos al analizar la capacidad inhibidora frente a la diferenciación de células de la médula ósea (BM) de ratón en osteoclastos, de acuerdo con el tratamiento con el compuesto SD-281.
- 20 La Figura 3 muestra los resultados obtenidos al analizar la citotoxicidad, la producción de autoanticuerpos, la formación de citocinas proinflamatorias y la expresión de genes proinflamatorios, de acuerdo con el tratamiento de los esplenocitos obtenidos de ratones inducidos con artritis reumatoide con el compuesto SD-281 en concentraciones predeterminadas.
- 25 La Figura 4 muestra los resultados obtenidos al analizar la inhibición de Th17 y la facilitación de la actividad de Treg; y la inhibición de la diferenciación en osteoclastos, de acuerdo con el tratamiento de los esplenocitos obtenidos de ratones inducidos con artritis reumatoide con el compuesto SD-281 en concentraciones predeterminadas.
- 30 La Figura 5 muestra los resultados obtenidos al analizar la citotoxicidad, la producción de autoanticuerpos, la formación de citocinas proinflamatorias y la expresión de genes proinflamatorios, de acuerdo con el tratamiento de los esplenocitos obtenidos de ratones inducidos con lupus con el compuesto SD-281 en concentraciones predeterminadas.
- 35 La Figura 6 muestra los resultados obtenidos al analizar la inhibición de Th17 y la facilitación de la actividad de Treg, de acuerdo con el tratamiento de los esplenocitos obtenidos de ratones inducidos con lupus con el compuesto SD-281 en concentraciones predeterminadas.
- 40 La Figura 7 muestra los resultados obtenidos al analizar la citotoxicidad y la formación de citocinas proinflamatorias, de acuerdo con el tratamiento de los linfocitos obtenidos de sangre periférica humana con el compuesto SD-281 en concentraciones predeterminadas.
- 45 La Figura 8 muestra los resultados obtenidos al analizar la citotoxicidad, la producción de autoanticuerpos, la formación de citocinas proinflamatorias y la expresión de genes proinflamatorios, de acuerdo con el tratamiento de los esplenocitos obtenidos de ratones normales con el compuesto SD-282 en concentraciones predeterminadas.
- 50 La Figura 9 muestra los resultados obtenidos al analizar la inhibición de Th17 y la facilitación de la actividad de Treg, la inhibición de la diferenciación en osteoclastos y la inhibición de Th17 sobreactivados, de acuerdo con el tratamiento de los esplenocitos obtenidos de ratones normales con el compuesto SD-282 en concentraciones predeterminadas.
- 55 La Figura 10 muestra los resultados obtenidos al analizar la citotoxicidad, la producción de autoanticuerpos, la formación de citocinas proinflamatorias y la expresión de genes proinflamatorios, de acuerdo con el tratamiento de los esplenocitos obtenidos de ratones inducidos con artritis reumatoide con el compuesto SD-282 en concentraciones predeterminadas.
- 60 La Figura 11 muestra los resultados obtenidos al analizar la inhibición de Th17 y la facilitación de la actividad de Treg; y la inhibición de la diferenciación en osteoclastos, de acuerdo con el tratamiento de los esplenocitos obtenidos de ratones inducidos con artritis reumatoide con el compuesto SD-282 en concentraciones predeterminadas.
- 65 La Figura 12 muestra los resultados obtenidos al analizar la citotoxicidad, la producción de autoanticuerpos, la formación de citocinas proinflamatorias y la expresión de genes proinflamatorios, de acuerdo con el tratamiento de los esplenocitos obtenidos de ratones inducidos con lupus con el compuesto SD-282 en concentraciones predeterminadas.
- La Figura 13 muestra los resultados obtenidos al analizar la inhibición de Th17 y la facilitación de la actividad de Treg, de acuerdo con el tratamiento de los esplenocitos obtenidos de ratones inducidos con lupus con el compuesto SD-282 en concentraciones predeterminadas.
- La Figura 14 muestra los resultados obtenidos al analizar la citotoxicidad y la formación de citocinas proinflamatorias, de acuerdo con el tratamiento de los linfocitos derivados de la sangre periférica humana con el compuesto SD-282 en concentraciones predeterminadas.
- La Figura 15 muestra los resultados obtenidos al analizar la citotoxicidad, la producción de autoanticuerpos, la formación de citocinas proinflamatorias y la expresión de genes proinflamatorios, de acuerdo con el tratamiento de los esplenocitos obtenidos de ratones normales con el compuesto SD-283 en concentraciones predeterminadas.
- La Figura 16 muestra los resultados obtenidos al analizar la inhibición de Th17 y la facilitación de la actividad de Treg, la inhibición de la diferenciación en osteoclastos y la inhibición de Th17 sobreactivados, de acuerdo con el tratamiento de los esplenocitos obtenidos de ratones normales con el compuesto SD-283 en concentraciones predeterminadas.
- La Figura 17 muestra los resultados obtenidos al analizar la citotoxicidad, la producción de autoanticuerpos, la

formación de citocinas proinflamatorias y la expresión de genes proinflamatorios, de acuerdo con el tratamiento de los esplenocitos obtenidos de ratones inducidos con artritis reumatoide con el compuesto SD-283 en concentraciones predeterminadas.

5 La Figura 18 muestra los resultados obtenidos al analizar la inhibición de Th17 y la facilitación de la actividad de Treg; y la inhibición de la diferenciación en osteoclastos, de acuerdo con el tratamiento de los esplenocitos obtenidos de ratones inducidos con artritis reumatoide con el compuesto SD-283 en concentraciones predeterminadas.

10 La Figura 19 muestra los resultados obtenidos al analizar la citotoxicidad, la producción de autoanticuerpos, la formación de citocinas proinflamatorias y la expresión de genes proinflamatorios, de acuerdo con el tratamiento de los esplenocitos obtenidos de ratones inducidos con lupus con el compuesto SD-283 en concentraciones predeterminadas.

15 La Figura 20 muestra los resultados obtenidos al analizar la inhibición de Th17 y la facilitación de la actividad de Treg, de acuerdo con el tratamiento de los esplenocitos obtenidos de ratones inducidos con lupus con el compuesto SD-283 en concentraciones predeterminadas.

La Figura 21 muestra los resultados obtenidos al analizar la citotoxicidad y la formación de citocinas proinflamatorias, de acuerdo con el tratamiento de los linfocitos obtenidos de la sangre periférica humana con el compuesto SD-283 en concentraciones predeterminadas.

20 La Figura 22 muestra los resultados obtenidos al analizar la citotoxicidad, la formación de citocinas proinflamatorias y la inhibición de Th17 y la facilitación de la actividad de Treg, de acuerdo con el tratamiento de los esplenocitos obtenidos de ratones normales con el compuesto SD-284 en concentraciones predeterminadas.

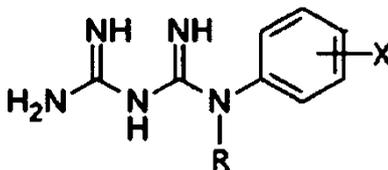
La Figura 23 muestra los resultados obtenidos al analizar la citotoxicidad y la formación de citocinas proinflamatorias, de acuerdo con el tratamiento de los linfocitos obtenidos de sangre periférica humana con el compuesto SD-284 en concentraciones predeterminadas.

25 La Figura 24 muestra los resultados obtenidos analizando las actividades inhibitoras de los nuevos compuestos de la presente invención contra la formación de las citocinas proinflamatorias, es decir, TNF- $\alpha$  e IL-17.

#### Mejor modo para llevar a cabo la invención

30 Se describen compuestos que pueden usarse como un nuevo agente terapéutico para prevenir o tratar eficazmente las enfermedades inmunitarias.

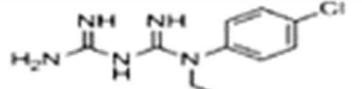
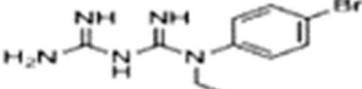
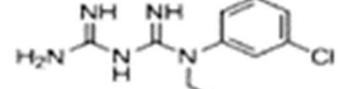
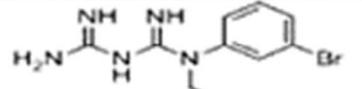
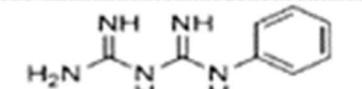
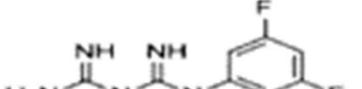
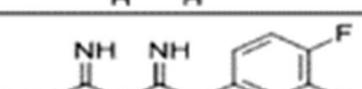
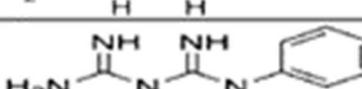
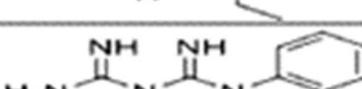
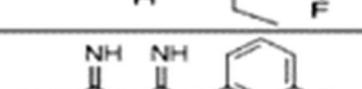
Por lo tanto, la presente divulgación puede proporcionar un nuevo compuesto representado por la siguiente fórmula o una de sus sales farmacéuticamente aceptables:

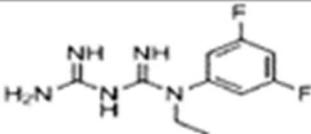
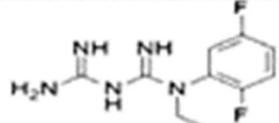
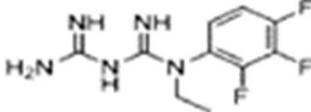
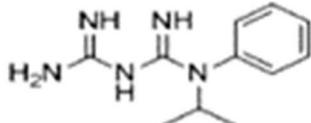
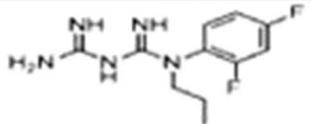
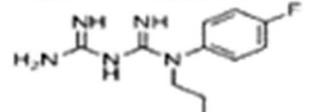


en la que X es uno o más F, Cl, Br o H; y R es hidrógeno o un grupo alquilo.

40 Preferiblemente, el compuesto representado por la fórmula anterior puede ser uno cualquiera de los compuestos seleccionados de los 24 compuestos mostrados en la siguiente tabla.

N.º	Código del compuesto	Nombre químico	Estructura química
1	9D-291	N-(3,4-Difluorofenil)-N-etilbiguanida	
2	9D-292	N-Etil-N-(4-fluorofenil)-N-biguanida	
3	9D-293	N-(2,4-Difluorofenil)-N-etilbiguanida	
4	9D-294	N-(2,4-Difluorofenil)-N-metilbiguanida	
5	9D-562	N-(4-Clorofenil) biguanida	
6	9D-563	N-(4-Bromofenil) biguanida	
7	9D-564	N-(3-Clorofenil) biguanida	
8	9D-565	N-(3-Bromofenil) biguanida	

9	SD-566	N-(4-Clorofenil)-N-etil biguanida	
10	SD-567	N-(4-Bromofenil)-N-etil biguanida	
11	SD-568	N-(3-Clorofenil)-N-etil biguanida	
12	SD-569	N-(3-Bromofenil)-N-etil biguanida	
13	SD-570	N-Fenilbiguanida	
14	SD-571	N-(3,5-Difluorofenil) biguanida	
15	SD-572	N-(3,4-Difluorofenil) biguanida	
16	SD-573	N-Etil-N-fenil biguanida	
17	SD-574	N-Etil-N-(2-fluorofenil) biguanida	
18	SD-575	N-Etil-N-(3-fluorofenil) biguanida	

19	8D-576	N-(3,5-Difluorofenil)-N-etilbiguanida	
20	8D-577	N-(2,5-Difluorofenil)-N-etilbiguanida	
21	8D-578	N-Etil-N-(2,3,4-trifluorofenil)biguanida	
22	8D-579	N-Fenil-N-isopropilbiguanida	
23	8D-580	N-(2,4-Difluorofenil)-N-propilbiguanida	
24	8D-581	N-(4-Difluorofenil)-N-propilbiguanida	

Los presentes inventores llevaron a cabo los experimentos para verificar que los compuestos sintetizados pueden tratar las enfermedades inmunitarias. De acuerdo con una realización de la presente divulgación, todos los compuestos reducen o inhiben la formación de citocinas proinflamatorias, inhiben la producción de autoanticuerpos, inhiben la diferenciación en osteoclastos. La citocina proinflamatoria puede ser IL-17, IL-6, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , MMP-9 o STAT-3, pero no se limita a estas.

Se ha encontrado que los compuestos inhiben la producción de los autoanticuerpos, es decir, IgG, IgG1 e IgG2a, mostrando así la actividad moduladora para inhibir las respuestas inmunitarias excesivas.

Y también, se ha encontrado que los compuestos de la presente divulgación tienen actividades para facilitar o aumentar la actividad de los linfocitos T reguladores y para reducir o inhibir la actividad de los linfocitos Th17 patógenos.

Por lo tanto, se ha confirmado a través de tales resultados que los compuestos sintetizados pueden usarse como un nuevo agente terapéutico para tratar eficazmente las enfermedades inmunitarias.

Mientras tanto, los linfocitos T son una de las poblaciones de células responsables del papel central en el sistema inmunitario como un sistema de defensa biológica contra varios patógenos. Los linfocitos T se producen en el timo del cuerpo y luego se diferencian en células que tienen propiedades específicas. Los linfocitos T diferenciadas se clasifican en linfocitos cooperadores Tipo 1 (Th1) linfocitos cooperadores Tipo 2 (Th2), de acuerdo con sus funciones. Los linfocitos Th1 están involucrados en la inmunidad mediada por células y los linfocitos Th2 están involucrados en la inmunidad humoral. Estas dos poblaciones celulares mantienen el equilibrio del sistema inmunitario al restringir la activación excesiva del mismo.

Por lo tanto, se puede ver que la mayoría de las enfermedades inmunitarias se deben al desequilibrio entre estas dos células inmunitarias. Por ejemplo, se sabe que el aumento anormal en la actividad de los linfocitos Th1 está asociado a enfermedades autoinmunitarias, mientras que el aumento anormal en la actividad de los linfocitos Th2 está asociado a enfermedades inmunitarias asociadas a la hipersensibilidad.

Por otro lado, según estudios recientes sobre la diferenciación de los linfocitos Th1, se ha encontrado que existe una nueva población, es decir, los linfocitos T reguladores (Treg) que modulan la actividad de los linfocitos Th1; y por lo tanto, hay investigaciones en marcha sobre el tratamiento de enfermedades inmunitarias que utilizan los mismos. Dado que los linfocitos Treg tienen una característica para suprimir la función de las células inmunitarias anormalmente activadas para controlar las respuestas inflamatorias, se han publicado varias investigaciones para tratar

enfermedades inmunitarias mediante el aumento de la actividad de los linfocitos Treg.

Además de los linfocitos Treg, los linfocitos Th17 se forman durante la diferenciación como otro grupo. Se sabe que los linfocitos Th17 se forman durante la diferenciación de los linfocitos T nativos, de acuerdo con procesos de diferenciación similares a los de los linfocitos Treg. Es decir, las diferenciaciones en linfocitos Treg y linfocitos Th17 se hacen comúnmente en presencia de TGF- $\beta$ . Sin embargo, la diferenciación en linfocitos Treg no requiere IL-6, mientras que la diferenciación en linfocitos Th17 se realiza en presencia de TGF- $\beta$  y de IL-6. Los linfocitos Th17 diferenciadas se caracterizan por la secreción de IL-17.

Se ha encontrado que los linfocitos Th17, a diferencia de los linfocitos Treg, están involucradas en la primera línea de la respuesta inflamatoria mostrada en las enfermedades inmunitarias maximizando las señales de la respuesta inflamatoria, acelerando así la progresión de la enfermedad. Por lo tanto, en el caso de las enfermedades autoinmunitarias que no son controladas por los linfocitos Treg, tienen una importancia significativa los desarrollos de un agente terapéutico de enfermedades autoinmunitarias dirigido a la inhibición de la actividad de los linfocitos Th17.

Sin embargo, aunque los agentes inmunosupresores para bloquear las vías de señalización de los linfocitos T son los más utilizados como agentes terapéuticos de las enfermedades inmunitarias actualmente en uso, tales agentes inmunosupresores tienen problemas de efectos secundarios, por ejemplo, toxicidad, infección, linfoma, diabetes, temblor, cefalea, diarrea, hipertensión arterial, náuseas, insuficiencia renal, etc.

Además del método para tratar enfermedades inmunitarias mediante la inhibición de la activación de los linfocitos T, se está desarrollando una terapia para controlar la cantidad de citocinas secretadas por las células inmunitarias y una terapia que usa un anticuerpo dirigido a las citocinas secretadas por las células inmunitarias. Sin embargo, el método anterior tarda mucho tiempo en aplicarse a los pacientes a través de los ensayos clínicos, y el método que usa un anticuerpo tiene el problema de requerir un alto costo en los procesos de producción de anticuerpos.

En este sentido, los compuestos proporcionados por la divulgación tienen la función de que la inhibición de la formación de citocinas proinflamatorias, la inhibición de los linfocitos Th17 y la activación de los linfocitos Treg pueden operarse simultáneamente, lo que se espera que sea capaz de tratar enfermedades inmunitarias con mayor eficacia que los agentes terapéuticos convencionales.

Además, según los resultados de una realización de la presente divulgación, se ha confirmado que los compuestos de la presente divulgación también tienen una actividad inhibidora contra la expresión del gen STAT3. Recientemente, las formas activadas de STAT1, STAT3 y STAT5 se encuentran en varios carcinomas. El STAT3 entre ellos se activa en varios tumores sólidos como el cáncer de mama, cáncer de cabeza y cuello, melanoma, cáncer de ovario, cáncer de pulmón, cáncer de páncreas, cáncer de próstata y neoplasias sanguíneas como la leucemia; y por lo tanto se ha utilizado como una diana para los agentes anticancerígenos (Hua Yu y Richard Jove, Nature Review Cancer., 2004, 8, 945).

Además, se sabe que la activación de STAT3 inhibe la apoptosis, induce la angiogénesis e induce privilegios inmunitarios (Wang T. et al., Nature Medicine., 2004, 10, 48). Por lo tanto, a partir de los hechos, la inhibición de la activación de STAT3 puede controlar tumores a través de complejos mecanismos anticancerígenos y la proteína STAT3 implica diversas funciones celulares, así como tumores, y su inhibidor puede desarrollarse como un agente inmunosupresor.

Además, hay algunos casos en que el sistema inmunitario en condiciones normales no solo controla las respuestas inmunitarias específicas a los autoantígenos sino que también suprime la respuesta inmunitaria contra antígenos extraños. Los ejemplos incluyen la respuesta de las mujeres embarazadas al feto; y la respuesta inmunitaria a los microorganismos en el estado de infección crónica. Se sabe que estos fenómenos se inducen por eliminación clónica, anergia y control activo por parte de los linfocitos T inmunorreguladoras (Treg) como un mecanismo que induce tolerancia inmunitaria específica de antígeno. Las investigaciones sobre algunos pacientes que accidentalmente adquirieron tolerancia inmunitaria; y los modelos animales cuya tolerancia inmunitaria se induce experimentalmente han revelado que los tres mecanismos implican la tolerancia inmunitaria en el trasplante. Recientemente, los linfocitos T inmunorreguladores han suscitado la atención como una célula crítica involucrada en el control de casi todas las respuestas inmunitarias en un organismo vivo, por ejemplo, la respuesta autoinmunitaria, la respuesta inmunitaria al tumor, la respuesta inmunitaria a la infección y similares, así como la respuesta inmunitaria en el trasplante.

Los linfocitos T inmunorreguladores [es decir, los linfocitos T inmunomoduladores (Treg)], que se encontraron recientemente, se pueden clasificar como linfocito Treg natural y linfocito Treg adaptativo. Los linfocitos Treg naturales, es decir, los linfocitos T CD4 + CD25 +, tienen una función inmunosupresora desde el momento en que los linfocitos se forman nuevamente en el timo; y existen en la frecuencia de 5 a 10 % en los linfocitos T CD4 + periféricos de individuos normales. Aunque el mecanismo inmunosupresor de los linfocitos no se ha identificado específicamente hasta el momento, se ha encontrado recientemente que el factor transcripcional Foxp3 desempeña un papel importante en la diferenciación y la actividad de los mismos. Además, cuando los linfocitos T naturales periféricos son estimulados por autoantígenos o antígenos extraños en ambientes específicos, los linfocitos pueden diferenciarse en linfocitos que muestran los efectos inmunosupresores, que se denominan linfocitos Treg adaptativos o inducibles. Los

linfocitos Tr1 secretores de IL-10 y los linfocitos Ts Th3 y CD8 secretoras de TGF- $\beta$ , o similares, se incluyen en los mismos.

5 Los linfocitos T también se diferencian en linfocitos Th17 a través del proceso de diferenciación, además de en linfocitos Treg. La diferenciación en linfocitos Th17 se realiza en presencia de TGF- $\beta$ , como en la diferenciación en linfocitos Treg. Sin embargo, aunque la diferenciación en linfocitos Treg no requiere IL-6, la diferenciación en linfocitos Th17 se realiza en presencia de IL-6 y TGF- $\beta$ . Los linfocitos Th17 diferenciados se caracterizan por la secreción de IL-17.

10 Además, los linfocitos Th17 tienen una característica para maximizar las señales de la respuesta inflamatoria, mostrando así la citotoxicidad que acelera la progresión de la enfermedad. Por lo tanto, la inhibición de la diferenciación en linfocitos Th17 o la inhibición de la actividad de los mismos es uno de los métodos para tratar enfermedades inmunitarias.

15 Además, los linfocitos Treg expresan Foxp3. Foxp3, que existe principalmente en los linfocitos T reguladores derivados del timo, es un factor transcripcional que reside en los linfocitos que tienen antígenos de superficie CD4+ CD25+. En el momento en que los linfocitos T que expresan Foxp3 reconocen los antígenos, Foxp3 hace que tengan una baja actividad contra el antígeno. Y también, el Foxp3 tiene un papel como linfocito T supresor para inhibir la formación de IL-2 y la división celular contra los linfocitos T potencialmente inducibles por autoinmunidad entre los linfocitos T CD4+  
20 CD25- diferenciados derivados del timo que no expresan Foxp3. Además, se ha encontrado que el Foxp3 tiene las funciones de inhibir no solo el control transcripcional de IL-2 sino también el control transcripcional de IL-4, IFN-gamma, etc. Por lo tanto, los linfocitos T que expresan Foxp3 que actúan como se ha descrito antes se han aplicado en el tratamiento de enfermedades inmunitarias a través de su actividad de supresión o regulación de la respuesta inmunitaria. Además, ha habido intentos de aplicar como terapia celular, a través del aumento del número de linfocitos  
25 T CD4 que expresan Foxp3 humano al tratar sus clones de linfocitos T específicos de autoantígeno con la alta concentración de citocina IL-2 y el tratamiento conjunto con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28.

30 Por lo tanto, a partir del estado de los desarrollos técnicos relacionados con los métodos convencionales para tratar enfermedades inmunitarias, los compuestos de la presente divulgación muestran efectos farmacológicos más efectivos, además de proporcionar la solución a los problemas que no se resolvieron en la técnica convencional; y, por lo tanto, se puede usar de manera muy útil como agente terapéutico para el tratamiento de enfermedades inmunitarias.

35 Por consiguiente, la composición farmacéutica para prevenir o tratar enfermedades inmunitarias de la presente divulgación puede comprender los nuevos compuestos o sus sales farmacéuticamente aceptables. Preferiblemente, las sales pueden ser una sal de adición de ácido derivada de un ácido libre farmacéuticamente aceptable. Como ácido libre, se pueden usar un ácido orgánico y un ácido inorgánico. El ácido orgánico incluye ácido cítrico, ácido acético, ácido láctico, ácido tartárico, ácido maleico, ácido fumárico, ácido fórmico, ácido propiónico, ácido oxálico, ácido trifluoroacético, ácido benzoico, ácido glucónico, ácido metasulfónico, ácido glicólico, ácido succínico, ácido 4-  
40 toluensulfónico, ácido glutámico y ácido aspártico, pero sin limitarse a ellos. El ácido inorgánico incluye ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico y ácido fosfórico, pero no se limita a estos.

45 Los compuestos de acuerdo con la presente divulgación pueden aislarse de productos naturales o prepararse usando métodos de síntesis química conocidos en la técnica. Los presentes inventores prepararon los compuestos mediante las síntesis de acuerdo con los métodos descritos en los siguientes Ejemplos.

50 Como se usa en la presente memoria, la expresión "enfermedad inmunitaria" se refiere a las enfermedades que los componentes del sistema inmunitario de los mamíferos causan, median o que contribuyen a las afecciones patológicas en los mamíferos. Y también, dicha expresión puede incluir todas las enfermedades en las que la estimulación o interrupción de la respuesta inmunitaria conduce a efectos compensatorios sobre la progresión de las mismas; y puede incluir las enfermedades causadas por la respuesta inmunitaria hipersensible. Ejemplos de la enfermedad inmunitaria incluyen enfermedades autoinmunitarias; enfermedades inflamatorias; y rechazos de trasplantes de células, tejidos u órganos, pero no se limitan a estas.

55 Y también, como una de las características más importantes, todos los individuos normales tienen la capacidad de reconocer, responder y eliminar los antígenos no propios, mientras que no respondan de manera perjudicial a las sustancias antigénicas. La no respuesta se conoce como "falta de respuesta inmunológica" o "tolerancia".

60 Sin embargo, cualquier problema para inducir o mantener la tolerancia propia tiene como resultado una respuesta inmunitaria a los antígenos propios, lo que lleva a un fenómeno de ataque a los propios tejidos. La enfermedad causada por estos procesos se conoce como "enfermedad autoinmunitaria".

65 Además, la expresión "enfermedad inflamatoria" se refiere a las enfermedades causadas por sustancias inflamatorias (citocinas proinflamatorias) como el TNF- $\alpha$  (factor de necrosis tumoral- $\alpha$ ), IL-1 (interleucina-1), IL-6, prostaglandina, leucotrieno u óxido nítrico (NO), que son secretados de las células inmunitarias, por ejemplo, macrófagos, en respuesta a una estimulación excesiva del sistema inmunitario debido a estímulos dañinos como los factores inductores de la

inflamación o la irradiación.

Y también, para garantizar el éxito de un trasplante de órganos, se requiere superar el rechazo inmunitario entre los linfocitos trasplantados y el órgano del receptor. Los linfocitos T son los principales mediadores del rechazo inmunitario al trasplante. Los receptores de los linfocitos T reconocen los principales complejos de histocompatibilidad (MHC) expresados en el injerto para inducir la respuesta inmunitaria, lo que conduce al rechazo del trasplante. Los principales complejos de histocompatibilidad dependen del tipo de antígenos de glicoproteína de los mismos. Debido a que las respuestas inmunitarias debidas al desajuste de los antígenos de histocompatibilidad son un obstáculo que dificulta el éxito del trasplante, la precisión del examen del antígeno de histocompatibilidad y la investigación de la compatibilidad de los antígenos de histocompatibilidad son elementos críticos.

El ser humano tiene varios antígenos de histocompatibilidad, por ejemplo, antígenos de clase I como HLA-A, -B y -C; y antígenos de clase II, tales como HLA-DR, -DP y -DQ. La función biológica de estos antígenos es presentar un antígeno a los linfocitos T. Los antígenos de Clase I se expresan en la mayoría de las células nucleadas; y los antígenos liberados de este modo son reconocidos por linfocitos T citotóxicos CD8+. Los antígenos de clase II se expresan en células dendríticas conocidas como células presentadoras de antígeno, linfocitos B, linfocitos T activados, macrófagos, etc.; y presentan los antígenos a los linfocitos T CD4+. Los linfocitos T reconocen los antígenos a través de la unión de los antígenos presentados a los linfocitos T a los receptores en los linfocitos T. Durante el transcurso del trasplante, los linfocitos T reconocen los antígenos de histocompatibilidad derivados de la otra persona en mayor frecuencia que los propios antígenos de histocompatibilidad. Del 1 % al 10 % de todos los linfocitos T en un donante o un paciente reconoce los antígenos de histocompatibilidad derivados del paciente o del donante; y proliferan en respuesta a los mismos, provocando así una serie de respuestas inmunitarias, que se denominan "alorespuestas". Y también, la respuesta inmunitaria que provocan los linfocitos T del donante contra los antígenos de histocompatibilidad del paciente se denomina "enfermedad de injerto contra huésped (GVHD)". Por el contrario, la respuesta inmunitaria que los linfocitos T del paciente provocan contra los antígenos de histocompatibilidad del donante se denomina "rechazo de injerto".

Por lo tanto, los agentes inmunosupresores se utilizan para reducir las respuestas anormales debidas a las respuestas inmunitarias ocurridas durante el trasplante. Los agentes inmunosupresores normalmente suprimen las respuestas inmunitarias mediadas por linfocitos T a los injertos. Recientemente, se han intentado métodos para tratar las enfermedades de rechazo de trasplantes mediante la supresión de las respuestas inmunitarias utilizando linfocitos T reguladores.

Además, las enfermedades inmunitarias que pueden prevenirse y tratarse en la presente invención pueden incluir artritis reumatoide, enfermedad de Behcet, polimiositis o dermatomiositis, citopenia autoinmunitaria, miocarditis autoinmunitaria, dermatitis atópica, asma, cirrosis primaria, dermatomiositis, síndrome de Goodpasture, síndrome de autoinmunidad, meningitis, síndrome de Sjögren, lupus, enfermedad de Addison, alopecia areata, mielitis anquilosante, hepatitis autoinmunitaria, paperas autoinmunitarias, enfermedad de Crohn, diabetes insulino-dependiente, epidermolisis bullosa distrófica, epididimitis, glomerulonefritis, enfermedad de Graves, síndrome de Guillain-Barré, enfermedad de Hashimoto, anemia hemolítica, esclerosis múltiple, miastenia gravis, pénfigo vulgar, psoriasis, fiebre reumática, sarcoidosis, esclerodermia, espondiloartropatía, tiroiditis, vasculitis, vitiligo, mixedema, anemia perniciosa, síndrome relacionado con la mitocondria y colitis ulcerosa, pero sin limitarse a estas.

Por lo tanto, la composición de acuerdo con la divulgación se puede usar como una composición farmacéutica para prevenir o tratar enfermedades inmunitarias.

El término "terapia" significa, a menos que se indique lo contrario, revertir o aliviar las enfermedades o trastornos a los que se aplica dicho término o al menos un síntoma de la enfermedad o trastornos; o inhibir o prevenir el progreso de los mismos. El término "tratar" como se usa en la presente memoria se refiere al acto de tratamiento cuando la "terapia" se define como anteriormente. Por lo tanto, "tratar" o "terapia" de enfermedades inmunitarias en el mamífero puede incluir uno o más de los siguientes:

- (1) inhibir el crecimiento de enfermedades inmunitarias, es decir, bloquear el desarrollo de las mismas,
- (2) prevenir la diseminación de las enfermedades inmunitarias, es decir, prevenir la metástasis de las mismas,
- (3) aliviar las enfermedades inmunitarias,
- (4) prevenir la recurrencia de enfermedades inmunitarias, y
- (5) paliar los síntomas de las enfermedades inmunitarias.

La composición para prevenir o tratar enfermedades inmunitarias de acuerdo con la presente divulgación puede comprender una cantidad farmacológicamente eficaz de uno o más de los compuestos de la presente divulgación o sus sales solas, o una cantidad farmacológicamente eficaz de uno o más de los compuestos de la presente divulgación o sus sales junto con uno o más vehículos, aditivos o diluyentes farmacéuticamente aceptables. La cantidad farmacológicamente efectiva se refiere a la cantidad suficiente para prevenir, mejorar y tratar los síntomas de enfermedades inmunitarias.

La cantidad farmacológicamente eficaz de los compuestos de la presente divulgación o sus sales se puede cambiar

de manera apropiada según la gravedad de los síntomas de la enfermedad inmunitaria, la edad del paciente, el peso corporal, la salud, el sexo, la vía de administración y el período de tratamiento, etc.

5 La expresión “farmacéuticamente aceptable” se refiere a una composición fisiológicamente aceptable que no causa trastornos gastrointestinales, reacciones alérgicas o reacciones similares en el momento en que la composición se administra a un ser humano. Los ejemplos de vehículos, aditivos y diluyentes incluyen lactosa, dextrosa, sacarosa, sorbitol, manitol, xilitol, eritritol, maltitol, almidón, goma arábica, alginato, gelatina, fosfato de calcio, silicato de calcio, celulosa, metilcelulosa, polivinilpirrolidona, agua, hidroxibenzoato de metilo, hidroxibenzoato de propilo, talco, estearato de magnesio y aceite mineral. Además, se pueden incluir cargas, anticoagulantes, lubricantes, agentes humectantes, agentes aromatizantes, agentes emulsionantes y conservantes.

15 Y también, la composición de la presente divulgación puede formularse usando métodos conocidos en la técnica para proporcionar una liberación rápida, sostenida o retardada del principio activo después de administrarse al mamífero. Las formulaciones pueden estar en forma de polvos, gránulos, comprimidos, emulsión, jarabe, aerosol, cápsulas de gelatina blanda o dura, soluciones inyectables estériles o polvos estériles.

20 Y también, la composición para prevenir o tratar enfermedades inmunitarias de acuerdo con la invención puede administrarse a través de diversas vías, incluyendo la oral, transdérmica, subcutánea, intravenosa, intramuscular. La dosis del principio activo puede seleccionarse de manera apropiada de acuerdo con diversos factores, como la vía de administración, la edad del paciente, el sexo, el peso corporal y la gravedad. La composición para prevenir o tratar enfermedades inmunitarias según la invención puede administrarse en combinación con otros compuestos conocidos que tienen un efecto de prevención, mejora o tratamiento de síntomas de enfermedades inmunitarias.

25 La presente divulgación también proporciona un uso de la composición que comprende los compuestos como un principio activo para la fabricación de un medicamento para prevenir o tratar enfermedades inmunitarias. La composición de la presente divulgación que comprende los compuestos de la presente divulgación como un principio activo puede usarse como un uso para la fabricación de un medicamento para prevenir o tratar enfermedades inmunitarias.

30 Como se usa en la presente memoria, el término “mamífero” se refiere a un mamífero que es objeto de tratamiento, observación o experimento, y preferiblemente se refiere a un ser humano.

35 La expresión “cantidad terapéuticamente eficaz” como se usa en la presente memoria significa la cantidad del principio activo o la composición farmacéutica para inducir una respuesta médica o biológica en el sistema tisular, animal o humano, que es determinada por un investigador, un veterinario o un médico u otro profesional médico. La expresión incluye las cantidades que tienen como resultado el alivio de los síntomas de la enfermedad o trastorno que se está tratando. La dosis terapéuticamente efectiva y la frecuencia de administración del principio activo de la presente invención se variarán de acuerdo con los efectos deseados; y será obvio para los expertos en la materia. Por lo tanto, los expertos en la materia pueden determinar fácilmente la dosis óptima que se administrará y que se ajustará según los diversos factores, incluido el tipo de enfermedad, la gravedad de la enfermedad, la cantidad de principio activo y otros componentes contenidos en la composición, el tipo de formulación y la edad, el peso corporal, el estado de salud general, el sexo y la dieta del paciente, tiempo de administración, vía de administración y proporción de secreción de la composición, período de tratamiento y fármacos administrados conjuntamente.

45 Además, la presente divulgación puede proporcionar un inmunomodulador que comprende el compuesto de la presente divulgación como un principio activo.

50 Y también, la presente divulgación puede proporcionar un método para reducir la actividad de los linfocitos Th17, que comprende tratar células con los compuestos de la presente invención *in vitro* y un método para aumentar la actividad de los linfocitos Treg, que comprende tratar células con compuestos de la presente invención *in vitro*.

### Modo para llevar a cabo la invención

55 La presente invención se describirá con más detalle en referencia a los siguientes ejemplos. Estos ejemplos pretenden ilustrar la presente invención más específicamente, pero el alcance de la presente invención no pretende limitarse a estos ejemplos.

Los compuestos *per se* o las composiciones que los comprenden no forman parte de la invención.

#### 60 <Ejemplo 1>

##### Síntesis de compuestos de la divulgación que tienen el efecto terapéutico en enfermedades inmunitarias

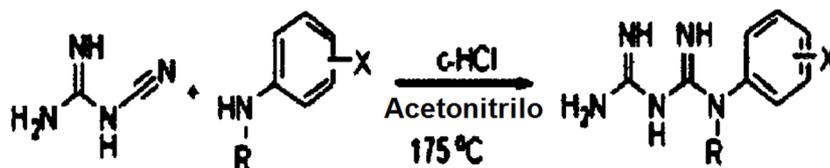
65 Los compuestos representados por las fórmulas mostradas en la Tabla 1 se prepararon en el siguiente esquema de reacción. Específicamente, después de disolver cada compuesto de anilina (1,0 mmol) en disolvente acetonitrilo en un reactor sellable, se añadió dicianodiamida (1,0 mmol) y ácido sulfúrico concentrado (1,0 mmol). Después de sellar

el reactor, la mezcla de reacción se agitó a 175 °C durante 1 hora. La mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente para producir el sólido blanco. Después de eliminar el disolvente, el sólido resultante se lavó con hexano y alcohol isopropílico para sintetizar los compuestos en forma de un sólido blanco.

- 5 Los 24 compuestos se sintetizaron en las mismas condiciones, excepto por el uso de los diferentes compuestos de anilina. Los compuestos de anilina utilizados en la síntesis de los respectivos compuestos y los nombres químicos y las estructuras químicas de los compuestos sintetizados se describen en la siguiente tabla.

El esquema de reacción representativo usado para sintetizar los compuestos se muestra a continuación.

10

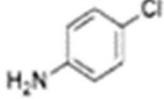
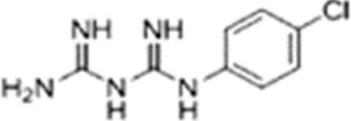
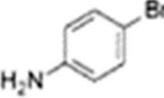
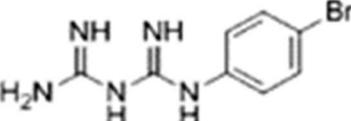
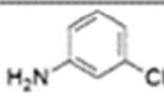
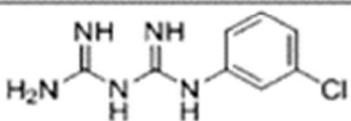
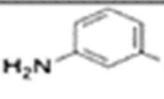
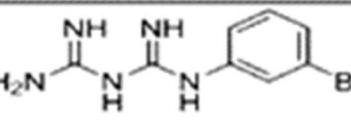
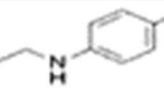
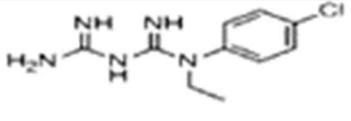
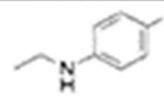
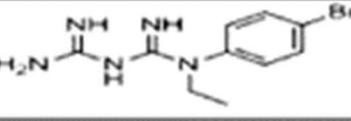
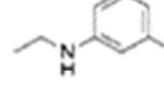
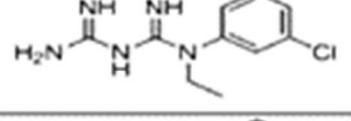
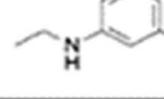
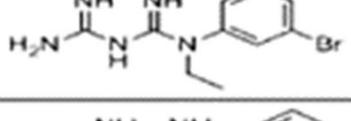
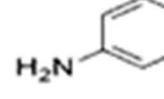
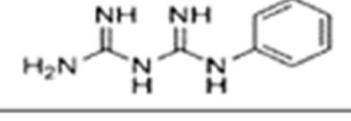


Dicianodiamida      Anilina      En la fórmula química, R = alquilo, X = uno o más F, Cl o Br

[Tabla 1]

Código del compuesto	Nombre químico	Anilina usada	Estructura química
8D-281	N-(3,4-Difluorofenil)-N-etilbiguanida		
8D-282	N-Etil-N-(4-fluoro fenil)biguanida		
8D-283	N-(2,4-Difluorofenil)-N-etilbiguanida		
8D-284	N-(2,4-Difluorofenil)-N-metilbiguanida		

15

9D-562	N-(4-Clorofenil) biguanida		
9D-563	N-(4-Bromofenil) biguanida		
9D-564	N-(3-Clorofenil) biguanida		
9D-565	N-(3-Bromofenil) biguanida		
9D-566	N-(4-Clorofenil)-N-etilbiguanida		
9D-567	N-(4-Bromofenil)-N-etilbiguanida		
9D-568	N-(3-Clorofenil)-N-etilbiguanida		
9D-569	N-(3-Bromofenil)-N-etilbiguanida		
9D-570	N-Fenilbiguanida		

SD-571	N-(3,5-Difluorofenil) biguanida		
SD-572	N-(3,4-Difluorofenil) biguanida		
SD-573	N-Etil-N-fenil biguanida		
SD-574	N-Etil-N-(2-fluorofenil) biguanida		
SD-575	N-Etil-N-(3-fluorofenil)biguanida		
SD-576	N-(3,5-Difluorofenil)-N-etilbiguanida		
SD-577	N-(2,5-Difluorofenil)-N-etilbiguanida		
SD-578	N-Etil-N-(2,3,4-trifluorofenil)biguanida		
SD-579	N-Fenil-N-isopropilbiguanida		
SD-580	N-(2,4-Difluorofenil)-N-propilbiguanida		
SD-581	N-(4-Difluorofenil)-N-propilbiguanida		

5 Los respectivos derivados de la presente invención sintetizados como antes se identificaron mediante análisis de RMN de  $^1\text{H}$  y los resultados del mismo se muestran en la siguiente tabla

[Tabla 2]

Código del compuesto	Nombre químico	Resultado del análisis de RMN
8D-281	N-(3,4-Difluorofenil)-N-etilbiguanida	RMN de $^1\text{H}$ (600MHz, $\text{DMF}-d_7$ ) $\delta$ (ppm) : 8,13(bs, 2H), 7,47-7,39(m, 2H), 7,26-7,16(m, 2H), 6,98(bs, 3H), 3,62(q, $J=7,2\text{Hz}$ , 2H), 1,03(t, $J=7,2\text{Hz}$ , 3H) MS $[\text{M}+\text{H}]^+$ 242,2
8D-282	N-Etil-N-(4-fluorofenil)biguanida	RMN de $^1\text{H}$ (600MHz, $\text{DMF}-d_7$ ) $\delta$ (ppm) : 7,36-7,34 (m, 2H), 7,30(t, $J=6,5\text{Hz}$ , 2H), 7,10(bs, 2H), 6,85(bs, 4H), 3,68(q, $J=7,2\text{Hz}$ , 2H), 1,06(t, $J=7,2\text{Hz}$ , 3H) MS $[\text{M}+\text{H}]^+$ 224,6
8D-283	N-(2,4-Difluorofenil)-N-etilbiguanida	RMN de $^1\text{H}$ (600MHz, $\text{DMF}-d_7$ ) $\delta$ (ppm) : 7,50-7,42(m, 3H), 7,25-7,18(m, 2H), 7,02(bs, 4H), 3,66(q, $J=7,2\text{Hz}$ , 2H), 1,06(t, $J=7,2\text{Hz}$ , 3H) MS $[\text{M}+\text{H}]^+$ 242,2
8D-284	N-(2,4-Difluorofenil)-N-metilbiguanida	RMN de $^1\text{H}$ (600MHz, $\text{DMF}-d_7$ ) $\delta$ (ppm) : 7,56-7,52(m, 1H), 7,39-7,36(m, 2H), 7,17-7,14(m, 5H), 6,79(s, 1H), 3,22(s, 3H) MS $[\text{M}+\text{H}]^+$ 228
8D-562	N-(4-Clorofenil)biguanida	RMN de $^1\text{H}$ (600MHz, $\text{DMF}-d_7$ ) $\delta$ (ppm) : 9,86 (s, 1H), 7,39-7,32(m, 8H), 7,06(bs, 2H) MS $[\text{M}+\text{H}]^+$ 212,6
8D-563	N-(4-Bromofenil)biguanida	RMN de $^1\text{H}$ (600MHz, $\text{DMF}-d_7$ ) $\delta$ (ppm) : 9,84(s, 1H), 7,46-7,44(m, 2H), 7,36-7,33(m, 6H), 7,06(bs, 2H) MS $[\text{M}+\text{H}]^+$ 257,1
8D-564	N-(3-Clorofenil)biguanida	RMN de $^1\text{H}$ (600MHz, $\text{DMF}-d_7$ ) $\delta$ (ppm) : 9,81 (s, 1H), 7,55 (s, 1H), 7,39 (bs, 3H), 7,29 (t, $J=7,8\text{Hz}$ , 1H), 7,24 (d, $J=7,8\text{Hz}$ , 1H), 7,08-7,06 (m, 3H) MS $[\text{M}+\text{H}]^+$ 212,6
8D-565	N-(3-Bromofenil)biguanida	RMN de $^1\text{H}$ (600MHz, $\text{DMF}-d_7$ ) $\delta$ (ppm) : 9,78 (s, 1H), 7,67 (bs, 1H), 7,38 (bs, 3H), 7,29 (d, $J=7,8\text{Hz}$ , 1H), 7,23 (t, $J=7,8\text{Hz}$ , 1H), 7,20-7,19 (m, 1H), 7,05 (bs, 2H) MS $[\text{M}+\text{H}]^+$ 257,1
8D-566	N-(4-Clorofenil)-N-etilbiguanida	RMN de $^1\text{H}$ (600MHz, $\text{DMF}-d_7$ ) $\delta$ (ppm) : 7,49 (d, $J=6,6\text{Hz}$ , 2H), 7,30 (d, $J=6,6\text{Hz}$ , 2H), 7,28 (bs, 2H), 7,06 (bs, 4H), 3,68 (q, $J=7,2\text{Hz}$ , 2H), 1,04 (t, $J=7,2\text{Hz}$ , 3H) MS $[\text{M}+\text{H}]^+$ 240,7
8D-567	N-(4-Bromofenil)-N-etilbiguanida	RMN de $^1\text{H}$ (600MHz, $\text{DMF}-d_7$ ) $\delta$ (ppm) : 7,60 (d, $J=6,9\text{Hz}$ , 2H), 7,23 (d, $J=6,9\text{Hz}$ , 2H), 7,16 (bs, 2H), 7,00 (bs, 4H), 3,68 (q, $J=7,2\text{Hz}$ , 2H), 1,03 (t, $J=7,2\text{Hz}$ , 3H) MS $[\text{M}+\text{H}]^+$ 285,2
8D-568	N-(3-Clorofenil)-N-etilbiguanida	RMN de $^1\text{H}$ (600MHz, $\text{DMF}-d_7$ ) $\delta$ (ppm) : 7,43 (t, $J=7,8\text{Hz}$ , 1H), 7,40 (t, $J=7,8\text{Hz}$ , 1H), 7,38-7,36 (m, 1H), 7,20-7,24 (m, 1H), 7,23 (bs, 2H), 6,96 (bs, 4H), 3,68 (q, $J=7,2\text{Hz}$ , 2H), 1,

		04 (t, J=7,2 Hz, 3H) MS [M+H] <sup>+</sup> 240,2
8D-569	N-(3-Bromofenil)-N-etilbiguanida	RMN do <sup>1</sup> H (600MHz, DM80-d <sub>6</sub> ) (ppm) 7,53 (t, J=2,4 Hz, 1H), 7,51-7,49 (m, 1H), 7,37 (t, J=7,8 Hz, 1H) 7,30-7,28 (m, 1H), 7,19 (bs, 2H), 7,09 (bs, 1H), 6,97 (bs, 3H), 3,68 (q, J=7,2 Hz, 2H), 1,04 (t, J=7,2 Hz, 3H) MS [M+H] <sup>+</sup> 285,2
8D-570	N-Fenilbiguanida	RMN do <sup>1</sup> H (600MHz, DM80) δ(ppm) : 9,504 (s, 1H), 7,33 (d, J=7,8 Hz, 2H), 7,28 (t, J=7,2 Hz, 2H), 7,229 (bs, 3H), 7,034 (t, J=7,2 Hz, 1H), 6,989 (bs, 2H). MS [M+H] <sup>+</sup> 178,2
8D-571	N-(3,5-Difluorofenil)biguanida	RMN do <sup>1</sup> H (600MHz, DM80) δ(ppm) : 10,25 (s, 1H), 7,97 (bs, 4H), 7,19-7,11 (m, 4H), 6,88-6,84 (m, 1H) MS [M+H] <sup>+</sup> 214,2
8D-572	N-(3,4-Difluorofenil)biguanida	RMN do <sup>1</sup> H (600MHz, DM80) δ(ppm) : 10,08 (s, 1H), 7,62-7,59 (m, 1H), 7,48 (s, 4H), 7,42-7,32 (m, 1H), 7,12 (bs, 3H) MS [M+H] <sup>+</sup> 214,2
8D-573	N-Etil-N-fenilbiguanida	RMN do <sup>1</sup> H (600MHz, DM80) δ(ppm) : 8,85 (t, J=7,2 Hz, 2H), 8,84 (t, J=6,6 Hz, 1H), 8,80 (t, J=7,2 Hz, 2H), 8,57 (bs, 2H) 8,42 (s, 4H), 5,21 (q, J=7,2 Hz, 2H), 2,57 (t, J=7,2 Hz, 3H) MS [M+H] <sup>+</sup> 206,2
8D-574	N-Etil-N-(2-fluorofenil)biguanida	RMN do <sup>1</sup> H (600MHz, DM80) δ(ppm) : 7,39 (t, J=7,8 Hz, 2H), 7,32 (t, J=9 Hz, 2H), 7,36 (t, J=7,2 Hz, 2H), 6,92 (s, 4H), 3, 65 (q, J=7,2 Hz, 2H), 1,04 (t, J=7,2 Hz, 3H) MS [M+H] <sup>+</sup> 224,2
8D-575	N-Etil-N-(3-fluorofenil)biguanida	RMN do <sup>1</sup> H (600MHz, DM80) δ(ppm) : 7,45 (q, J=7,2 Hz, 1H), 7,22-7,13 (m, 5H), 7,023 (s, 4H), 3,704 (q, J=7,2 Hz, 2H) 1,05 (t, J=7,2 Hz, 3H) MS [M+H] <sup>+</sup> 224,2
8D-576	N-(3,5-Difluorofenil)-N-etilbiguanida	RMN do <sup>1</sup> H (600MHz, DM80) δ(ppm) : 7,28 (s, 2H), 7,22-7,19 (m, 1H) 7,11 (dd, J=7,8 Hz, J=2,4 Hz, 2H), 7,02 (s, 4H), 3,71 (q, J=7,2 Hz, 2H) 1,05 (t, J=7,2 Hz, 3H) MS [M+H] <sup>+</sup> 242,2
8D-577	N-(2,5-Difluorofenil)-N-etilbiguanida	RMN do <sup>1</sup> H (600MHz, DM80) δ(ppm) : 7,40-7,24 (m, 5H) 7,07 (s, 4H), 3,71 (q, J=7,2 Hz, 2H), 1,04 (t, J=7,2 Hz, 3H) MS [M+H] <sup>+</sup> 242,2
8D-578	N-Etil-N-(2,3,4-trifluorofenil)biguanida	RMN do <sup>1</sup> H (600MHz, DM80) δ(ppm) : 7,41 (q, J=9 Hz, 1H), 7,32-7,29 (m, 2H), 7,14 (s, 5H), 3,65 (q, J=7,2 Hz, 2H), 1,0 4 (t, J=7,2 Hz, 3H) MS [M+H] <sup>+</sup> 260,2
8D-579	N-fenil-N-isopropilbiguanida	RMN do <sup>1</sup> H (600MHz, DM80) δ(ppm) : 7,48 (t, J = 7,2 Hz, 2H), 7,43 (t, J = 7,2 Hz, 1H), 7,22 (d, J=7,2 Hz, 2H), 7,05 (s, 1H), 6,85 (s, 3H), 6,73 (s, 2H), 4,99 (t, J=6,8 Hz, 1H), 0,98 (d, J = 6,6 Hz, 6H) MS [M+H] <sup>+</sup> 220,3
8D-580	N-(2,4-Difluorofenil)-N-propilbiguanida	RMN do <sup>1</sup> H (600MHz, DM80) δ(ppm) : 7,47-7,35 (m, 3H), 7,26-7,15 (m, 2H), 6,99 (s, 4H), 3,53 (t, J=7,2 Hz, 2H), 1,45 (m, 2H), 0,80 (t, J=7,2 Hz, 3H) MS [M+H] <sup>+</sup> 256,3
8D-581	N-(4-Difluorofenil)-N-propilbiguanida	RMN do <sup>1</sup> H (600MHz, DM80) δ(ppm) : 7,36-7,33 (m, 2H), 7,29-7,26 (m, 2H), 7,12 (s, 3H), 6,94 (s, 3H), 3,59 (t, J = 7,8 Hz, 2H), 1,49-1,43 (m, 2H), 0,82 (t, J=7,8 Hz, 3H) MS [M+H] <sup>+</sup> 238,2

<Método experimental>

5

<1> Células analizadas

Los presentes inventores llevaron a cabo los siguientes experimentos basados en los siguientes grupos experimentales, con el fin de confirmar que los compuestos respectivos sintetizados en la presente descripción pueden tratar y prevenir enfermedades inmunitarias.

10

[Tabla 3]

Grupos experimentales realizados en los experimentos de la presente invención

Grupo experimental	Células para experimentos.
Grupo de ratones normales	Esplenocitos y células de médula ósea obtenidos de ratones normales (ratón DBA/1J)
Grupo de ratones inducidos con artritis reumatoide	Esplenocitos y células de médula ósea obtenidos de ratones DBA/1J inducidos con artritis reumatoide por tratamiento CIA
Grupo de ratones inducidos con lupus	Esplenocitos y células BM obtenidas de ratones sanroque inducidos con lupus
Grupo SP humana	Linfocitos obtenidos de sangre periférica humana (SP)

5 Específicamente, en el grupo de ratones normales, los esplenocitos obtenidos de ratones DBA/1J normales se activaron mediante el cultivo en condiciones estimulantes del anticuerpo anti-CD3 (0,5 µg/ml) durante 72 horas, antes del tratamiento de los compuestos de la presente invención.

10 Además, los ratones inducidos con artritis reumatoide se prepararon utilizando ratones normales DBA/1J. La solución de colágeno tipo II (CII) en solución de ácido acético 0,1 N (4 mg/ml) se dializó en el tampón de diálisis (Tris 50 mM, NaCl 0,2 N) y luego se mezcló con el mismo volumen del adyuvante completo de Freund (CFA, Chondrex) que contiene *M. tuberculosis*. El inmunógeno resultante se inyectó por vía subcutánea en la base de la cola de los ratones normales, en 100 µl por ratón (es decir, 100 µl/100 µg) (inyección primaria). Después de 2 semanas, la solución (100 µl) obtenida mezclando el CII con el mismo volumen del adyuvante incompleto de Freud (IFA, Chondrex) se inyectó en una de las patas traseras (almohadilla del pie) (es decir, 100 µl/100 µg) (inyección secundaria) para preparar los ratones inducidos con artritis reumatoide. Los esplenocitos obtenidos de los ratones inducidos con artritis reumatoide preparados se activaron mediante cultivo en condiciones estimulantes de anticuerpo anti-CD3 (0,5 µg/ml) durante 72 horas y luego se utilizaron en los experimentos.

20 Además, como grupo modelo de ratones inducidos con lupus, utilizamos los ratones sanroque usados como modelo de lupus en la técnica. En el grupo de SP humana utilizamos los linfocitos obtenidos de la sangre periférica humana. Los aislamientos de esplenocitos y linfocitos de ratones y sangre periférica humana se realizaron de acuerdo con métodos convencionales conocidos en la técnica. Todos los linfocitos aislados se activaron mediante el cultivo en condiciones estimulantes del anticuerpo anti-CD3 (0,5 µg/ml) durante 72 horas y luego se utilizaron en los experimentos.

### 25 <2> Ensayo de citotoxicidad (ensayo MTT)

30 El ensayo MTT se llevó a cabo para determinar si los compuestos sintetizados en la presente invención causan citotoxicidad. Se añadieron las respectivas células a cada pocillo de una placa de 96 pocillos ( $2 \times 10^5$  células por pocillo), tratadas con los compuestos de la presente invención en concentraciones predeterminadas y después se incubaron durante 72 horas. La solución de MTT (0,5 %, bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-2H-tetrazolio) se añadió a los respectivos linfocitos, que luego se incubaron adicionalmente durante 4 horas. La absorbancia a 540 nm se midió con un lector ELISA (ensayo inmuno-específico ligado a enzimas) para determinar la citotoxicidad.

### 35 <3> Análisis del control contra la respuesta inmunitaria mediante la producción de autoanticuerpos

40 El ensayo inmuno-específico ligado a enzimas (ELISA) se realizó para determinar si los nuevos compuestos de la presente invención afectan a las producciones de anticuerpos IgG total, IgG1 total e IgG2a en el suero. Es decir, el nivel de IgG total y los niveles de IgG1 e IgG2a específicos del anticuerpo se midieron en las células tratadas con los compuestos de la presente invención, utilizando el ELISA de tipo sándwich. En una placa de 96 pocillos, cada IgG anti-ratón monoclonal y el CII se hicieron reaccionar durante 1 hora a temperatura ambiente. La solución de bloqueo (1 % BSA/PBST) se añadió a la misma para bloquear los enlaces no específicos. El suero de control de ratón se sometió a medias diluciones secuenciales y luego se usó como patrón. El sobrenadante de cultivo celular se añadió a la mezcla de reacción, la cual después se hizo reaccionar durante 1 hora a temperatura ambiente. Y luego, la IgG anti-ratón-HRP y la IgG2a anti-ratón-HRP se hicieron reaccionar durante 1 hora a temperatura ambiente, seguido de lavado cuatro veces. La mezcla de reacción se sometió a desarrollo de color con el sistema TMB y luego se midió la absorbancia a una longitud de onda de 450 nm.

### 50 <4> Análisis de los efectos sobre la formación de citocinas proinflamatorias

55 Los niveles de formación de IL-17, IL-6, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , MMP-9 y STAT-3 y los niveles de expresión de ARNm de los mismos se midieron para determinar si los compuestos de la presente divulgación pueden afectar a la formación de citocinas proinflamatorias, que son materiales causantes de la inflamación y de enfermedades inmunitarias. El sobrenadante se obtuvo de las células cultivadas que se habían tratado con los compuestos de la presente invención; y luego se analizó utilizando el método de ensayo inmuno-específico ligado a enzimas (ELISA) para determinar los niveles de formación de las citocinas proinflamatorias. Específicamente, las respectivas células se hicieron reaccionar con los anticuerpos específicos de citocinas (anticuerpos anti-IL-17, anti-IL-6, anti-TNF- $\alpha$ , anti-IFN- $\gamma$ , anti-MMP-9 y

anti-STAT-3) a 4 °C durante la noche. La solución de bloqueo (1 % BSA/PBST) se añadió a la misma para bloquear los enlaces no específicos. Y a continuación, los respectivos anticuerpos biotinilados se hicieron reaccionar durante 2 horas a temperatura ambiente, seguido de lavado 4 veces. Se añadió el conjugado de fosfatasa alcalina extraavídina diluida y luego se hizo reaccionar a temperatura ambiente durante 2 horas. La mezcla de reacción se sometió a desarrollo de color con la solución de PNPP/DEA y luego se midió la absorbancia a una longitud de onda de 405 nm.

Además, para analizar las cantidades de ARNm, se obtuvieron los ARN totales de las células. Y a continuación, se llevó a cabo la RT-PCR utilizando los cebadores unidos específicamente a IL-17, IL-6, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ , para determinar los niveles de expresión de las citocinas proinflamatorias.

#### <5> Análisis de las actividades para inhibir linfocitos Th17 e inducir células Treg

Además, los presentes inventores realizaron el ensayo de citometría de flujo para determinar si los compuestos de la divulgación no solo inhiben la diferenciación y la actividad de los linfocitos Th17 asociadas con la inflamación, sino que también facilitan la actividad de los linfocitos Treg que tienen función inmunomoduladora. Es decir, los linfocitos T se cultivaron en la condición de diferenciación en linfocitos Th17 o en la condición de diferenciación en células Treg; y luego se midió el número de linfocitos Treg Foxp3+ o el número de linfocitos Th 17 IL-17+ con un instrumento de citometría de flujo.

#### <6> Efecto inhibitorio frente a la diferenciación en osteoclastos.

Para investigar el efecto de los compuestos de la presente divulgación sobre la diferenciación en osteoclastos, las células de médula ósea de ratón obtenidas se indujeron para diferenciarse en las presencias de MCSF (factor estimulante de colonias de macrófagos) y RANKL soluble (Sugatani et al. 2003, J. Cell. Biochem. 90, 59-67). Las células de la médula ósea se prepararon a partir del fémur y la tibia de ratones de 6 semanas de edad y luego se mantuvieron, en presencia de M-CSF (30 ng/ml: R&D Systems, Minneapolis, MN), a 37 °C en un portaobjetos de cámara de ocho pocillos (3  $\times$  10<sup>5</sup> células/pocillo; Nalge Nunc International, Naperville, IL). Después de 3 días, se eliminaron los linfocitos que incluyen células no adhesivas y luego se cultivaron las células progenitoras de osteoclastos adhesivas durante otros cuatro días en presencia de M-CSF (30 ng/ml) y RANKL (30 ng/ml; Strathmann, Hamburgo, Alemania) para obtener los osteoclastos. El medio de cultivo celular se intercambiaba una vez en presencia de M-CSF y RANKL. Las células se fijaron y luego se realizó la tinción TRAP (fosfatasa ácida resistente a tartrato) con el kit de tinción (Sigma) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Cada cámara se observó con un microscopio (aumento de 40X) y las células multinucleadas TRAP positivo que contenían más de tres núcleos se consideraron osteoclastos (Sugatani. et al. 2003, J. Cell. Biochem. 90, 59-67).

Además, los linfocitos de la médula ósea se diferenciaron en osteoclastos y se trataron con los compuestos de la presente divulgación en las concentraciones predeterminadas en presencia de M-CSF y RANKL. Después de cultivar durante 48 horas, las células se sometieron a la tinción TRAP y luego se contaron las células multinucleadas TRAP positivo.

#### **<Ejemplo experimental 1>**

##### Resultados del ensayo de citotoxicidad de los compuestos de la presente divulgación

Con el fin de determinar si los compuestos sintetizados en el Ejemplo 1 causan citotoxicidad, la viabilidad celular de cada grupo de células descrito en la Tabla 3 se midió mediante el ensayo MTT. Es decir, las células de cada grupo (2  $\times$  10<sup>5</sup> células) se trataron con los compuestos sintetizados en la presente divulgación y luego se analizaron sus viabilidades celulares.

Como resultado, los compuestos SD-281, SD-282, SD-283 y SD-284 no mostraron citotoxicidad según los tratamientos de los mismos, en comparación con el grupo de control o con el grupo tratado con metformina. Por lo tanto, se ha confirmado que estos compuestos no tienen citotoxicidad en las células normales ni en las células inducidas por la enfermedad.

#### **<Ejemplo experimental 2>**

##### Resultados del análisis del control de los compuestos de la presente divulgación frente a la respuesta inmunitaria mediante la producción de autoanticuerpos

Con el fin de investigar los efectos de los compuestos sintetizados en el Ejemplo 1 sobre la respuesta inmunitaria mediante la producción de autoanticuerpos, se recogieron muestras de sangre del seno orbital de cada ratón en los cuatro grupos descritos anteriormente y luego se midieron los niveles de IgG, IgG1 e IgG2a en cada suero.

Como resultado, las cantidades de las inmunoglobulinas (IgG total, IgG1 e IgG2), que reflejan el estado de producción de autoanticuerpos en condiciones patológicas, se redujeron de acuerdo con las concentraciones tratadas de todos los compuestos de la presente divulgación. Se ha confirmado que los compuestos descritos en la Tabla 4 tienen una

excelente actividad inmunomoduladora para suprimir las respuestas inmunitarias excesivas.

[Tabla 4]

	IgG total			IgG1			IgG2		
	A	B	C	A	B	C	A	B	C
Control	11	83,2	141,5	311,4	286	422,3	103,2	109,6	151,9
SD-281	2,3	58,1	124,5	83,8	135,2	258,2	35,6	33,5	84,3
SD-282	0,7	60,3	127,7	1	218,7	425,4	37,1	38,3	110,9
SD-283	2,9	49,6	113,5	41	135,3	296,5	97,6	99,4	76

Unidad: ng/ml  
 A: células de ratón normales, B: células de ratón inducidas con artritis reumatoide, C: células de ratón inducidas con lupus, D: linfocitos obtenidos de sangre periférica humana

5 <Ejemplo experimental 3>

Resultados del análisis de inhibición frente a la formación y expresión génica de citocinas proinflamatorias

10 Con el fin de determinar si los compuestos de la presente divulgación inhiben la formación de citocinas proinflamatorias que inducen inflamación y enfermedades inmunitarias y si además inhiben las citocinas proinflamatorias a nivel genético, llevamos a cabo los experimentos según el análisis de los efectos sobre la formación de citocinas proinflamatorias descrita en el aparatado <4> anterior.

15 Como resultado de esto, todos los compuestos sintetizados en la presente divulgación inhibieron las formaciones de las citocinas proinflamatorias, es decir, IL-17, IL-6, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , MMP-9 y STAT-3 y expresiones de los genes de las mismas de una manera dependiente de la concentración. Por lo tanto, a partir de estos resultados, se puede ver que los compuestos de la presente divulgación previenen y tratan enfermedades inmunitarias mediante la inhibición de la formación de citocinas proinflamatorias.

20 [Tabla 5]

Análisis de los efectos de los compuestos de la presente divulgación sobre la formación de citocinas proinflamatorias

	IL-17				IL-6				TNF- $\alpha$				IFN- $\gamma$			
	A	B	C	D	A	B	C	D	A	B	C	D	A	B	C	D
Control	3,2	3,7	0,9	0,3	2,2	1,9	1,8		0,9	0,1	1,3		9,4	8,3	14,5	0,2
SD-281	1,7	2,2	0,6	0,1	1,4	1,4	1		0,5	0,4	0,7		5,8	5,3	10	0,1
SD-282	1,7	2,1	0,6	0,1	1,3	1,3	1		0,4	0,4	0,7		3,3	2,9	7,6	0,1
SD-283	1,6	2,2	0,4	0,1	1,4	1,1	0,9		0,5	0,3	0,6		7,2	5,4	5,5	0,1
SD-284				0,1												0,08

Unidad: ng/ml  
 A: células de ratón normales, B: células de ratón inducidas con artritis reumatoide, C: células de ratón inducidas con lupus, D: linfocitos obtenidos de sangre periférica humana

[Tabla 6]

Análisis de los efectos del compuesto SD-284 sobre la formación de citocinas proinflamatorias en ratones normales

	IL-17	IL-6	TNF- $\alpha$	IFN- $\gamma$
Control	7,6	1,8	0,7	10
SD-284	6,5	0,7	0,5	4,9

Unidad: ng/ml

25

[Tabla 7]

Análisis de los efectos inhibidores de los compuestos de la presente divulgación frente a la actividad de citocinas proinflamatorias

	TNF- $\alpha$			MMP-9			STAT3
	A	B	C	A	B	C	A
Control	1	1	1	1	1	1	1
SD-281	0,2	0,6	0,1	0,5	0,4	0,4	1,2
SD-282	0,07	0,06	0,8	0,1	0,08	1,3	0,6
SD-283	0,4	0,06	0,1	0,3	1	0,04	1,3

Unidad: expresión génica.  
 A: células de ratón normales, B: células de ratón inducidas con artritis reumatoide, C: células de ratón inducidas con lupus

30

**<Ejemplo experimental 4>**

Resultados del análisis de las actividades de modulación en los linfocitos Th17 y los linfocitos Treg

- 5 Con el fin de investigar si los compuestos de la presente divulgación controlan tanto la diferenciación como la actividad de los linfocitos Th17 que secretan la citocina proinflamatoria IL-17 y la diferenciación y la actividad de los linfocitos Treg que tienen función inmunomoduladora, llevamos a cabo el análisis de las actividades para inhibir los linfocitos Th17 y e inducir los linfocitos Treg como se describe en el apartado <5> anterior.
- 10 Como resultado de ello, todos los compuestos de la presente divulgación inhibieron tanto la expresión de IL-17 en las células inducidas con la enfermedad como la diferenciación en los linfocitos Th17 en la condición de diferenciación en los linfocitos Th17. Y además, todos los compuestos de la presente divulgación aumentan tanto la expresión de Foxp3 (el marcador de células inmunomoduladoras) como el número de células que expresan Foxp3, en la condición de diferenciación en linfocitos Treg. Además, se ha encontrado que los compuestos pueden suprimir eficazmente los linfocitos Th17 sobreactivados.

[Tabla 8]

Análisis de los efectos de los compuestos de la presente divulgación sobre la inhibición de Th17 y la actividad Treg

Condición TCR	Th17			Treg		
	A	B	C	A	B	C
Control	2	3,4	1,1	2,6	3,3	2,8
SD-281	1,2	1,5	0,8	2	4,6	2,8
SD-282	1,2	1,5	0,9	2,5	4,6	2,9
SD-283	1,1	2,3	0,5	3	5,1	3,3

A: células de ratón normales, B: células de ratón inducidas con artritis reumatoide, C: células de ratón inducidas con lupus

20

[Tabla 9]

Análisis de los efectos de los compuestos de la presente divulgación sobre los linfocitos Th17 en la condición de diferenciación en linfocitos Th17

Condición de Th17	Th17
	A
Control	5,7
SD-281	0,4
SD-282	0,5
SD-283	0,9
SD-284	2

25

Por lo tanto, a partir de estos resultados, se puede ver que los compuestos de la presente divulgación pueden controlar tanto Th17 como Treg simultáneamente (es decir, no por separado) para inducir la actividad inmunomoduladora de manera más eficaz, por lo que se pueden usar más eficientemente como un agente inmunomodulador o un agente terapéutico para enfermedades inmunitarias.

**<Ejemplo 5>**

30

Resultados del análisis sobre inhibición frente a la diferenciación en osteoclastos

35 Con el fin de investigar si los compuestos de la presente divulgación pueden tratar eficazmente enfermedades inmunitarias, se confirmaron los niveles de inhibición de los compuestos de la presente divulgación frente a la diferenciación en osteoclastos en las células estimuladas con M-CSF y RANKL mediante la tinción del factor de diferenciación de osteoclastos TRAP.

40 Como resultado de ello, todos los compuestos de la presente divulgación redujeron el número de células que expresan el marcador de diferenciación de osteoclastos TRAP. Se puede ver a partir de estos resultados que los compuestos de la presente divulgación reducen efectivamente el potencial de diferenciación en osteoclastos inductores de la destrucción de la articulación, por lo que pueden usarse para prevenir o tratar enfermedades causadas por la diferenciación en osteoclastos.

[Tabla 10]

45 Análisis de los efectos inhibidores de los compuestos de la presente divulgación frente a la diferenciación en osteoclastos

	Células TRAP+	
	A	B
Control	310	246

SD-281	196	57
SD-282	157	89
SD-283	123	85
A: células de ratón normales, B: células de ratón inducidas con artritis reumatoide		

**<Ejemplo 6>**Efecto inhibidor contra la formación de las citocinas proinflamatorias TNF- $\alpha$  e IL-17 en esplenocitos de ratón

5

Además, para evaluar la eficacia del efecto inhibidor de los compuestos sintetizados en el Ejemplo 1 contra las citocinas proinflamatorias, los linfocitos obtenidos del bazo de ratones DBA1/J normales se trataron con un anticuerpo anti-CD3 de ratón en una concentración de 0,5  $\mu\text{g/ml}$  y luego se estimularon con cada compuesto en las concentraciones de 200 y 500  $\mu\text{M}$  respectivamente. Los niveles de inhibición de las citocinas proinflamatorias IL-17 y TNF $\alpha$  se determinaron mediante el método ELISA.

10

Como resultado de ello, como se muestra en la Figura 24, se ha encontrado que los compuestos SD-563, SD-564, SD-566, SD-567, SD-573, SD-574 y SD-580 tienen la actividad inhibidora contra las citocinas proinflamatorias IL-17 y TNF- $\alpha$  simultáneamente y que las actividades inhibidoras de las mismas aumentan de una manera dependiente de la concentración.

15

Todos los cambios que están dentro del significado y rango de equivalencia de las reivindicaciones deben incluirse dentro del alcance de la presente invención.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Una composición farmacéutica para su uso para facilitar o aumentar la actividad de los linfocitos T reguladores y reducir o inhibir la actividad de los linfocitos Th17 patógenos en una enfermedad inmunitaria, que comprende N-etil-N-(4-fluorofenil)-biguanida o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma como un principio activo.
- 10 2. La composición farmacéutica para el uso de la reivindicación 1, en la que la N-etil-N-(4-fluorofenil)-biguanida o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma reduce o inhibe adicionalmente la formación de citocinas proinflamatorias, inhibe la producción de autoanticuerpos e inhibe la diferenciación en osteoclastos.
- 15 3. La composición farmacéutica para el uso de la reivindicación 2, en la que la citocina proinflamatoria son IL-17, IL-6, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , MMP-9 o STAT-3.
4. La composición farmacéutica para el uso de la reivindicación 2, en la que el autoanticuerpo es IgG, IgG1 o IgG2a.
- 20 5. La composición farmacéutica para el uso de la reivindicación 1, en donde la composición comprende la N-etil-N-(4-fluorofenil)-biguanida o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma en una concentración que varía de 0,1 mM a 10 mM.
6. La composición farmacéutica para el uso de la reivindicación 1, en donde la enfermedad inmunitaria se selecciona del grupo que consiste en una enfermedad autoinmunitaria; una enfermedad inflamatoria; y una enfermedad de rechazo de trasplante.
- 25 7. La composición farmacéutica para el uso de la reivindicación 6, en donde la enfermedad autoinmunitaria se selecciona de artritis reumatoide, enfermedad de Behcet, polimiositis, citopenia autoinmunitaria, miocarditis autoinmunitaria, dermatitis atópica, asma, cirrosis primaria, dermatomiositis, síndrome de Goodpasture, meningitis autoinmunitaria, síndrome de Sjögren, lupus, enfermedad de Addison, alopecia areata, mielitis anquilosante, hepatitis autoinmunitaria, paperas autoinmunitarias, enfermedad de Crohn, diabetes insulino-dependiente, epidermólisis bullosa distrófica, epididimitis, glomerulonefritis, enfermedad de Graves, síndrome de Guillain-Barré, enfermedad de Hashimoto, anemia hemolítica, esclerosis múltiple, miastenia gravis, pénfigo vulgar, psoriasis, fiebre reumática, sarcoidosis, esclerodermia, espondiloartropatía, tiroiditis, vasculitis, vitiligo, mixedema, anemia perniciosa, síndrome mitocondrial y colitis ulcerativa.
- 30 8. La composición farmacéutica para el uso de la reivindicación 6, en la que la enfermedad de rechazo de trasplante es una enfermedad de injerto contra huésped.
- 35

FIG. 1

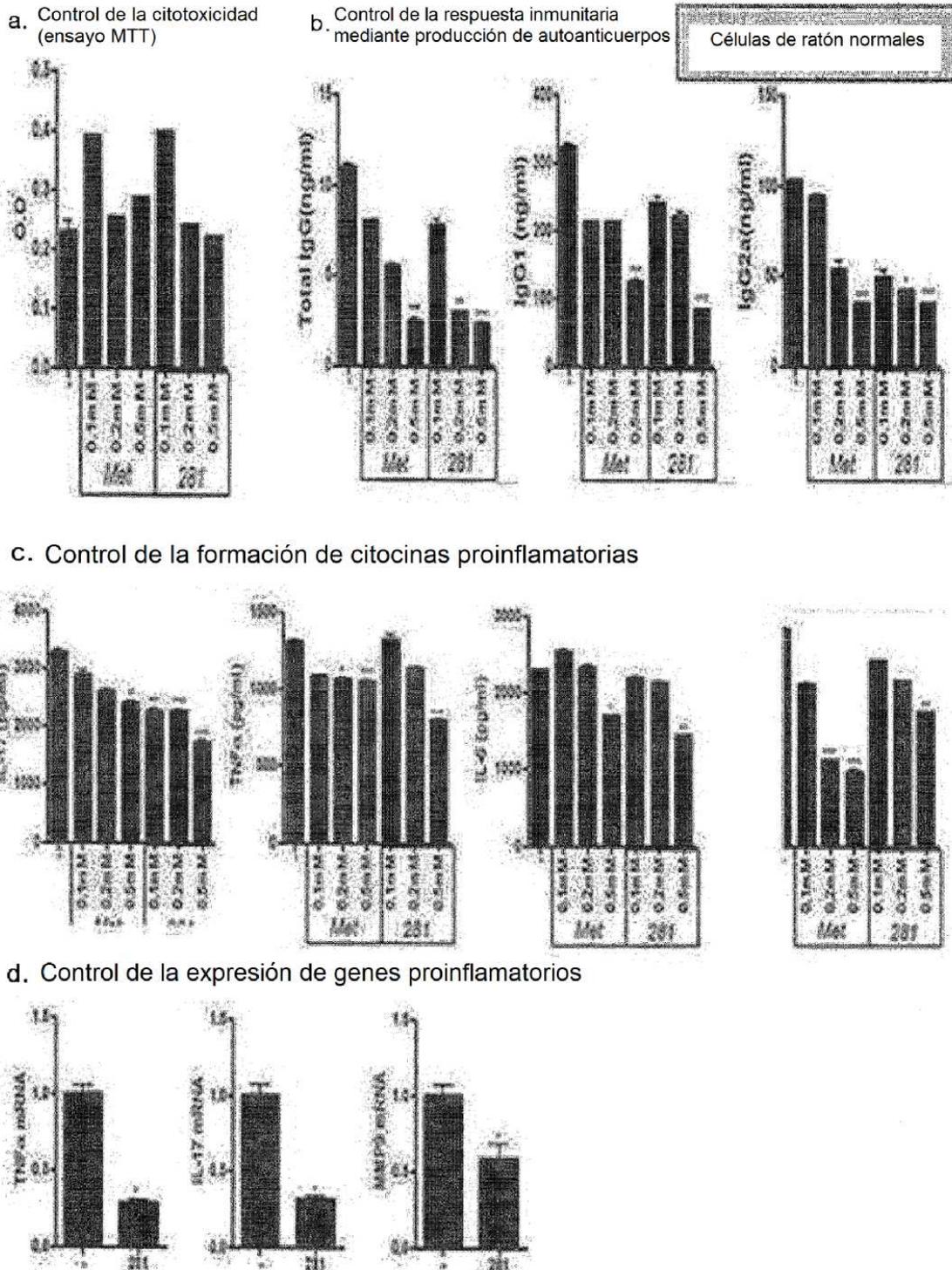
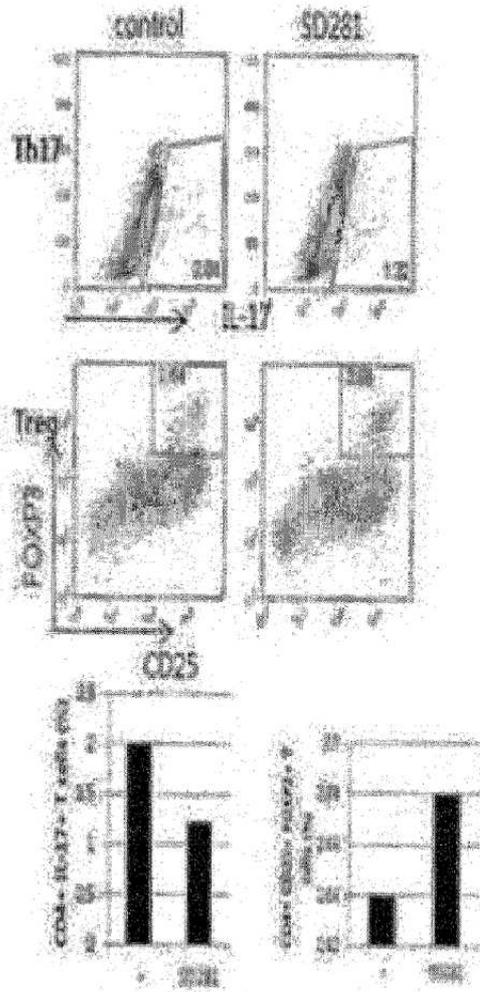
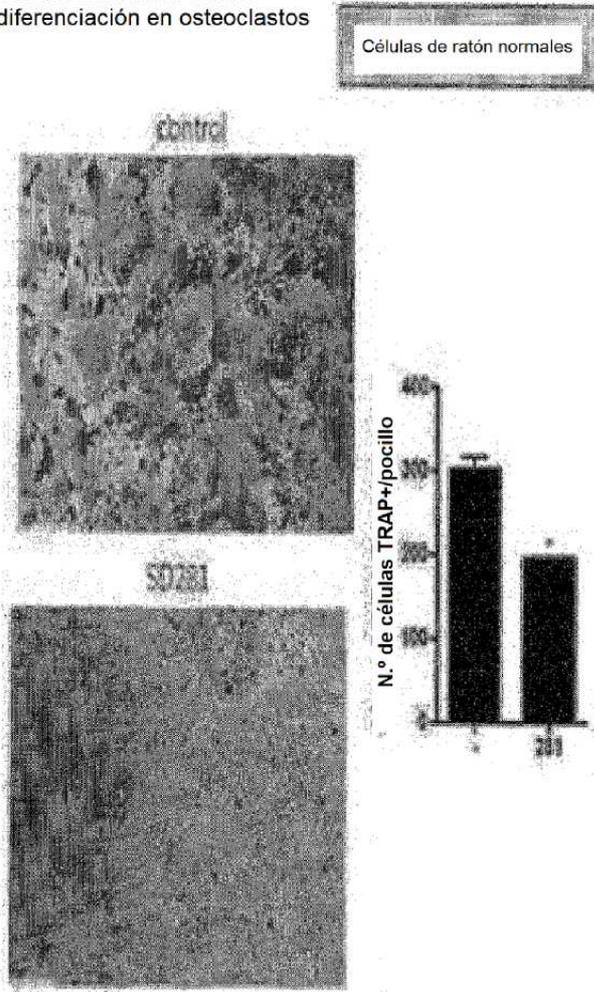


FIG. 2

a. Control simultáneo de la inhibición de Th17 / inducción de linfocitos Treg



b. Control inhibitorio contra diferenciación en osteoclastos



c. Control de células Th17 sobreactivadas

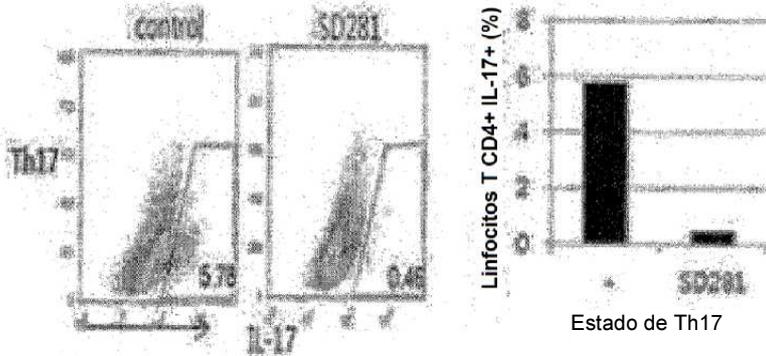
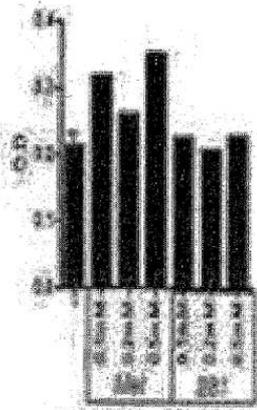
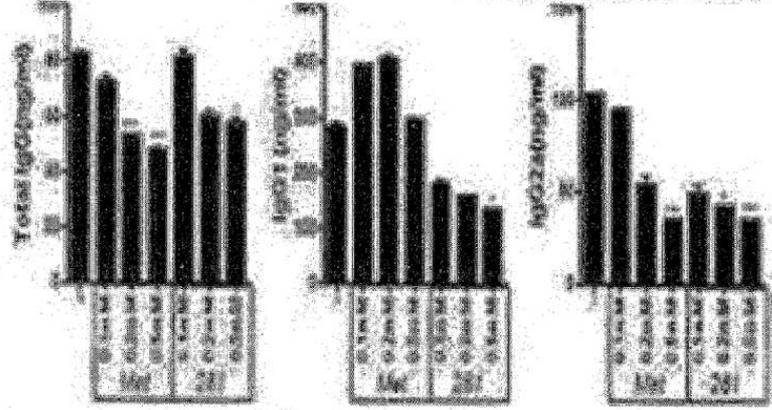


FIG. 3

a. Control de la citotoxicidad (ensayo MTT)

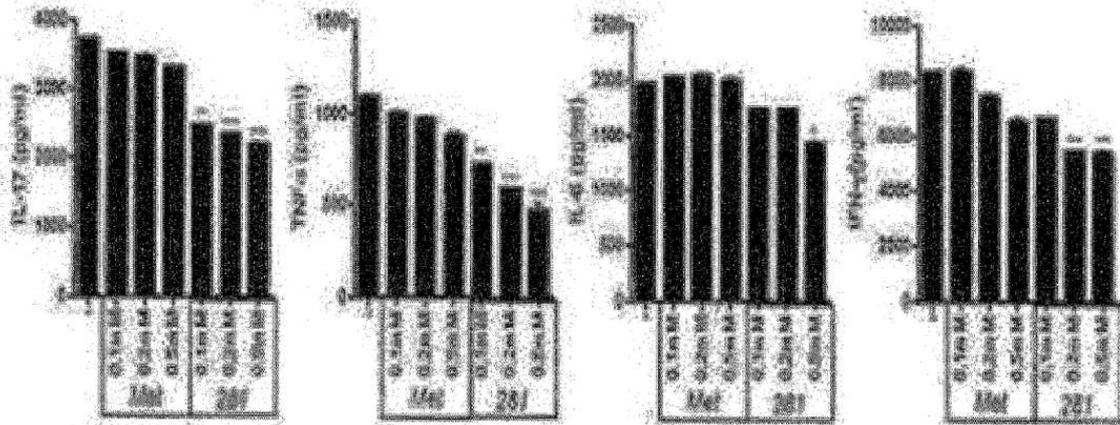


b. Control de la respuesta inmunitaria mediante producción de autoanticuerpos



Células de ratón inducidas con artritis reumatoide

c. Control de la formación de citocinas proinflamatorias



d. Control de la expresión de genes proinflamatorios

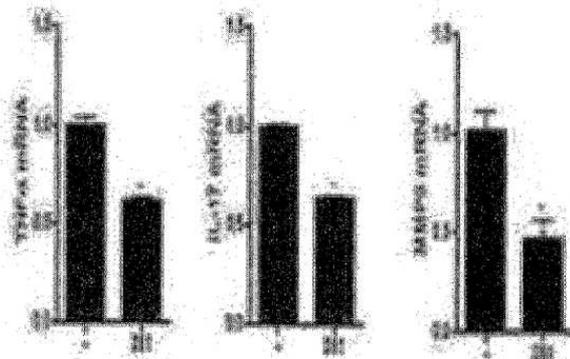
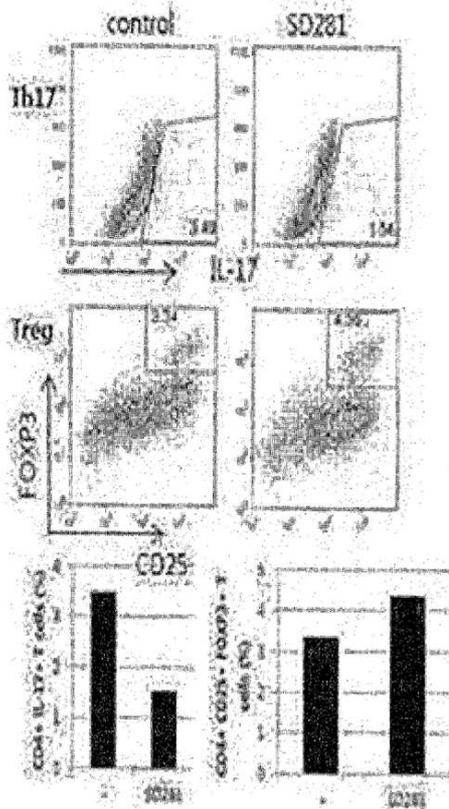


FIG. 4

Células de ratón inducidas con artritis reumatoide

a. Control simultáneo de la inhibición de Th17 / inducción de linfocitos Treg



b. Control inhibitorio contra diferenciación en osteoclastos

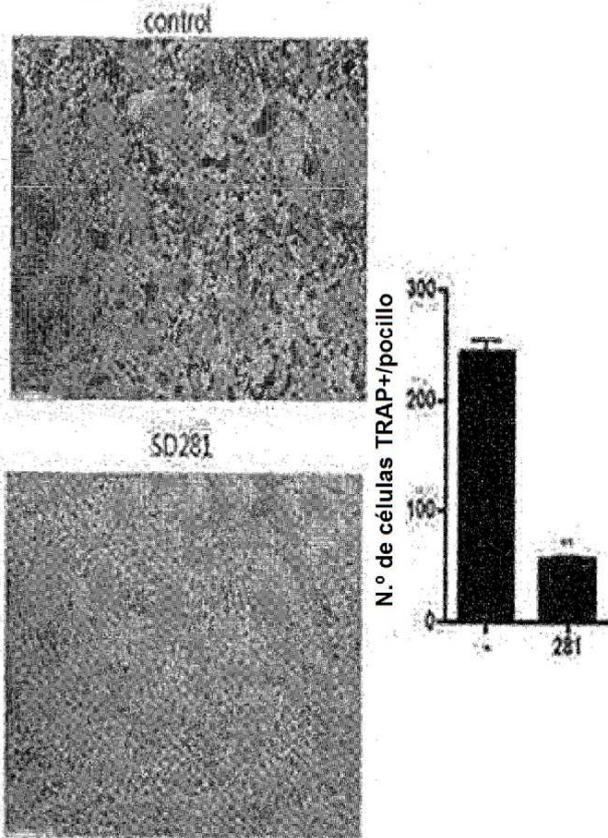
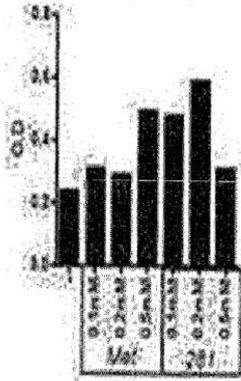


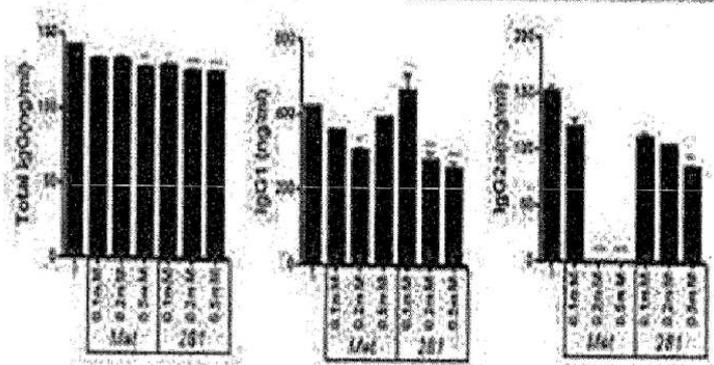
FIG. 5

a. Control de la citotoxicidad (ensayo MTT)

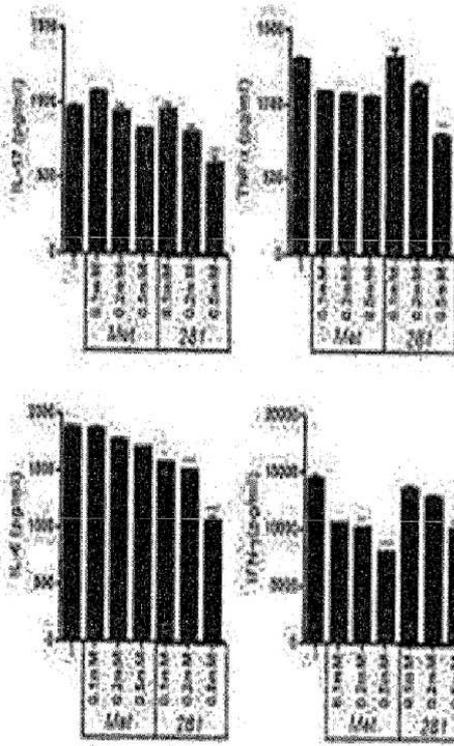


b. Control de la respuesta inmunitaria mediante producción de autoanticuerpos

Ratón inducido con lupus



c. Control de la formación de citocinas proinflamatorias



d. Control de genes proinflamatorios

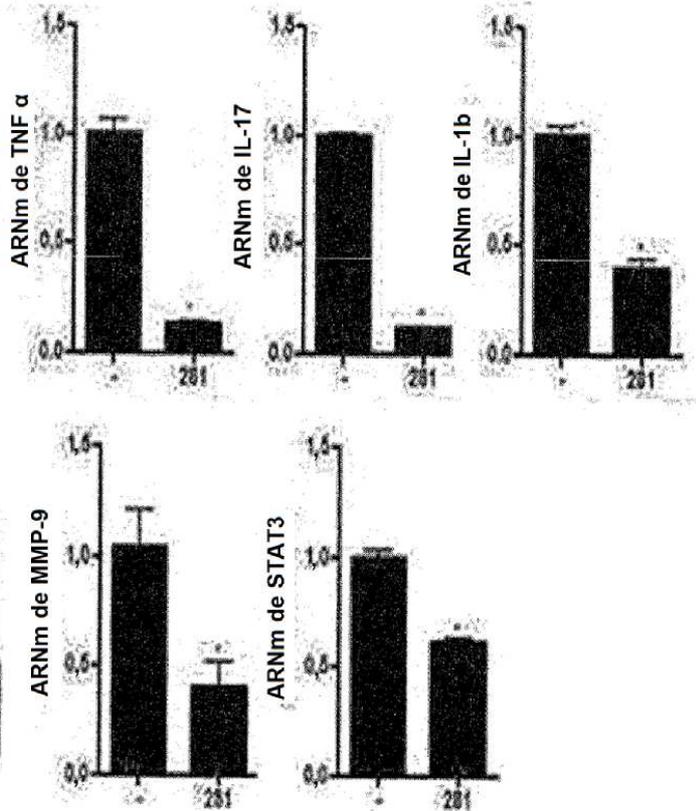


FIG. 6

Control simultáneo de la inhibición de Th17 / inducción de linfocitos Treg

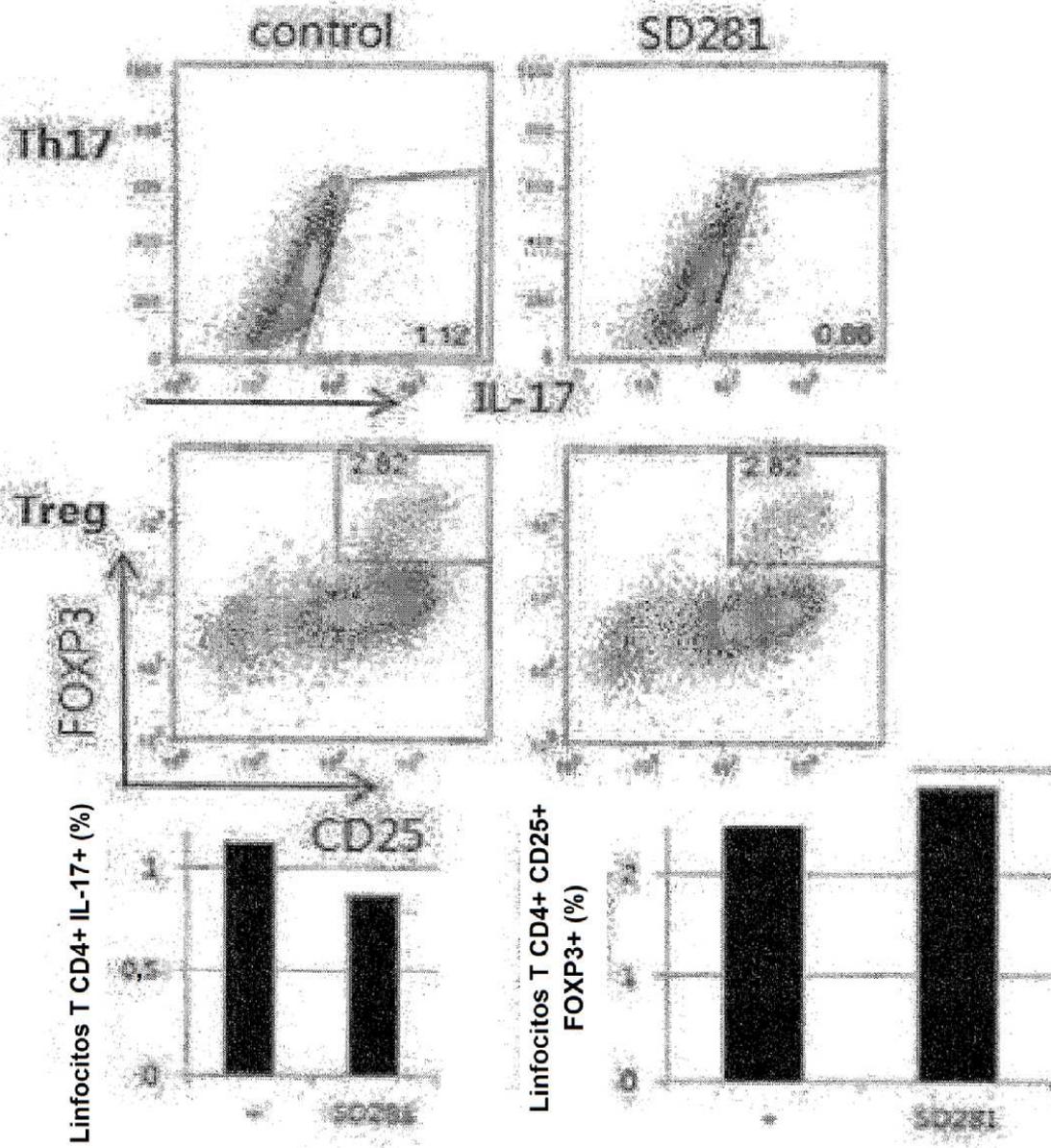
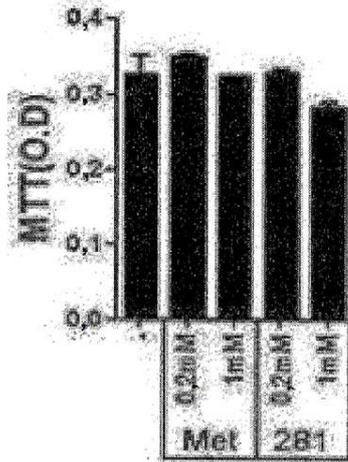


FIG. 7

a. Control de la citotoxicidad (ensayo MTT)

SP humana



b. Control de la formación de citocinas proinflamatorias

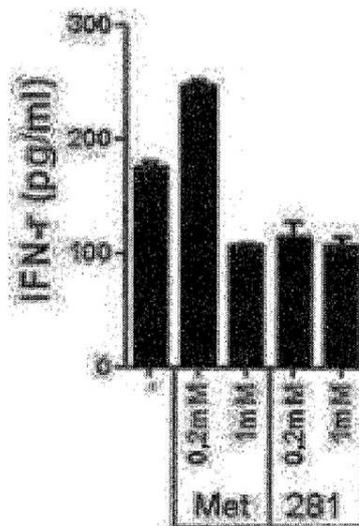
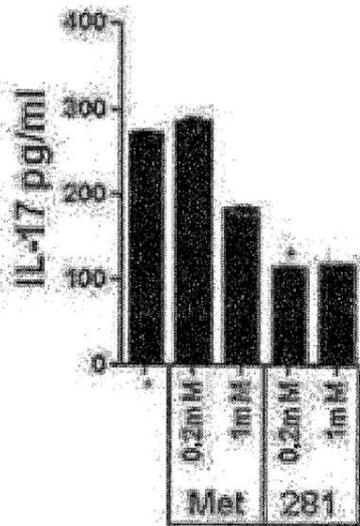
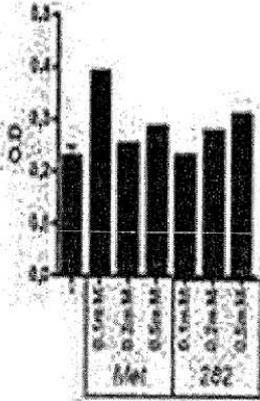


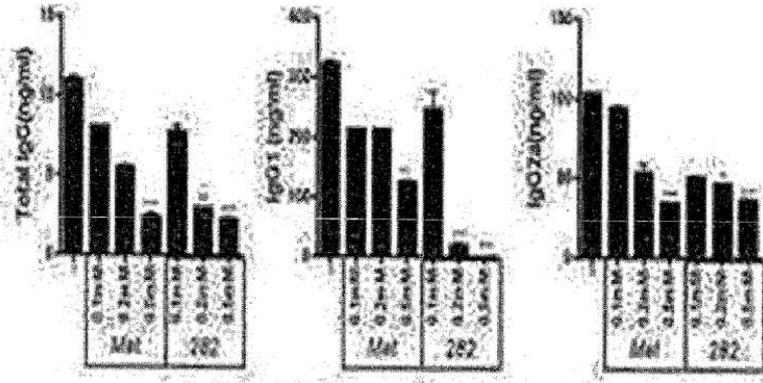
FIG. 8

a. Control de la citotoxicidad (ensayo MTT)

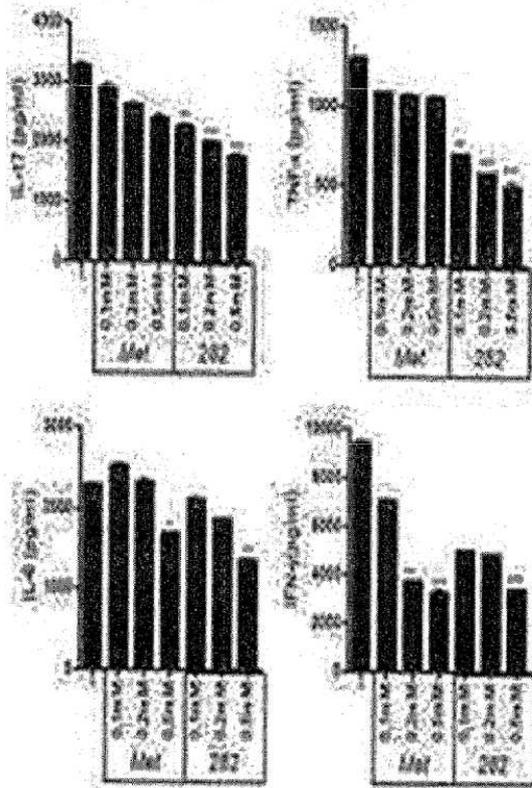


b. Control de la respuesta inmunitaria mediante producción de autoanticuerpos

Células de ratón normales



c. Control de la formación de citocinas proinflamatorias



d. Control de genes proinflamatorios

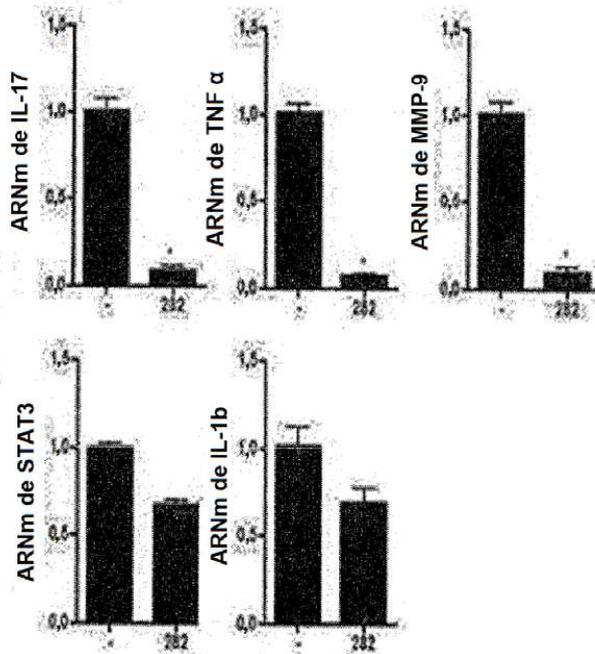


FIG. 9

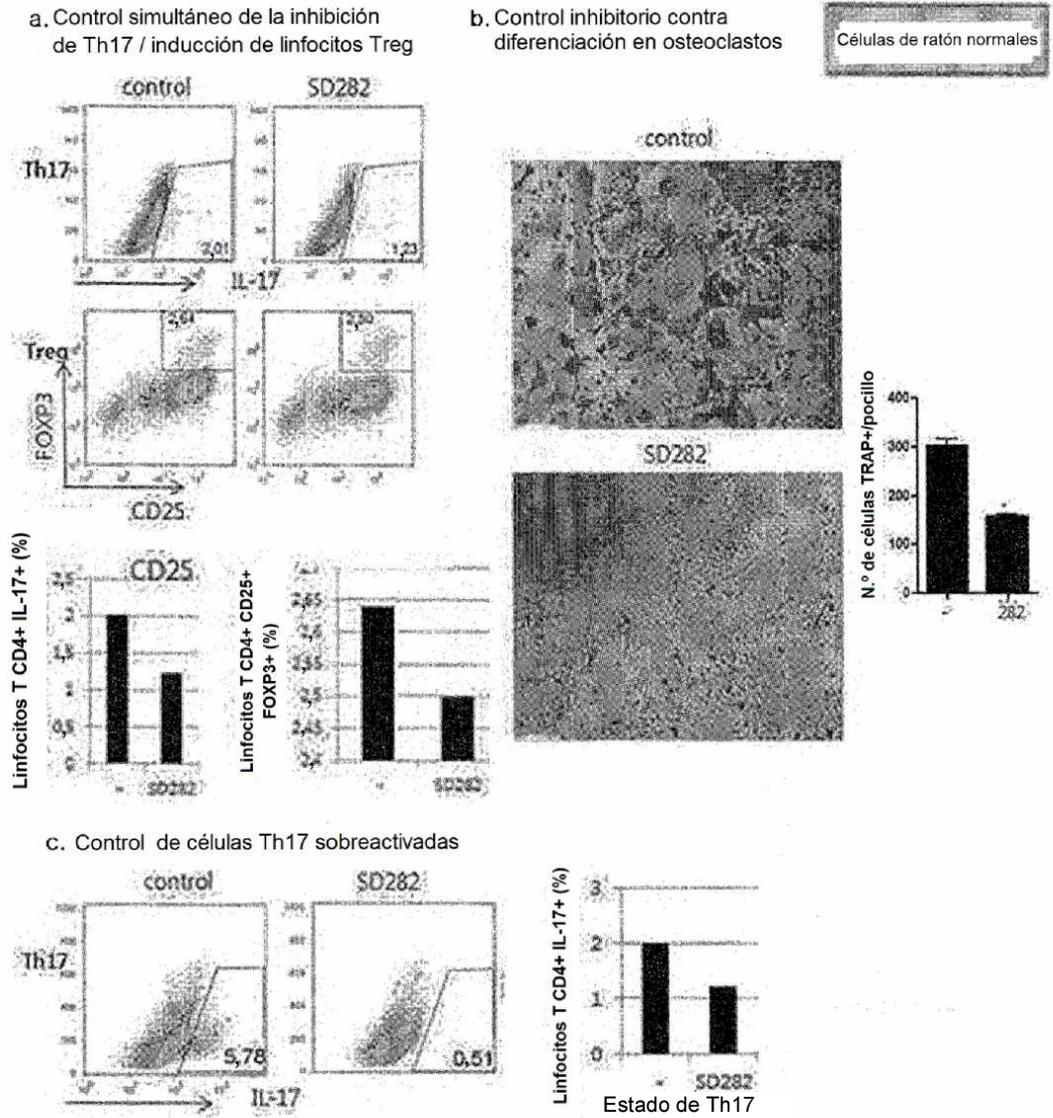
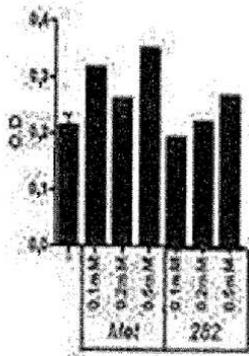


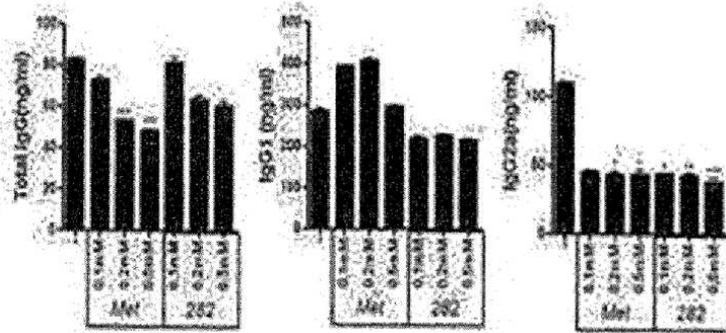
FIG. 10

a. Control de la citotoxicidad (ensayo MTT)

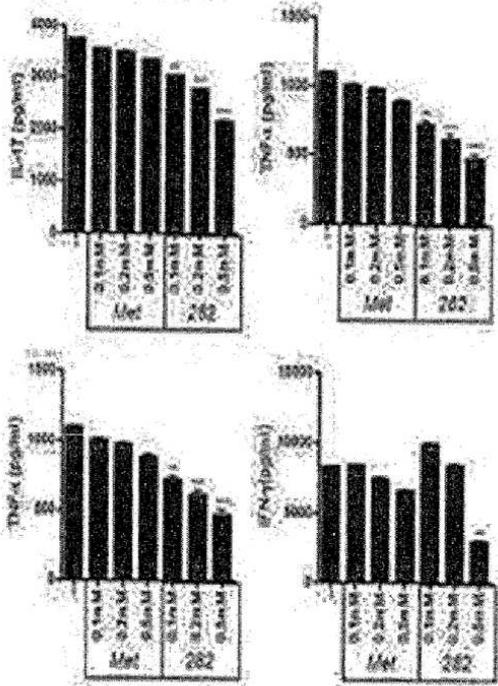


b. Control de la respuesta inmunitaria mediante producción de autoanticuerpos

Células de ratón inducidas con artritis reumatoide



c. Control de la formación de citocinas proinflamatorias



d. Control de genes proinflamatorios

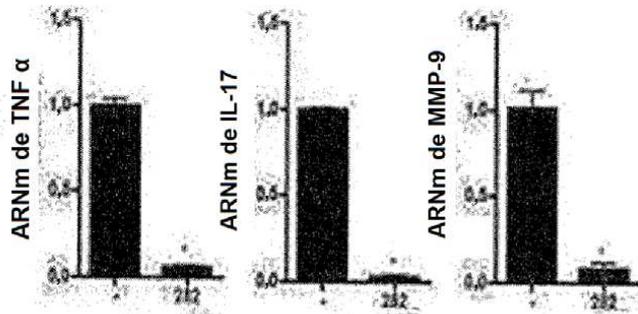


FIG. 11

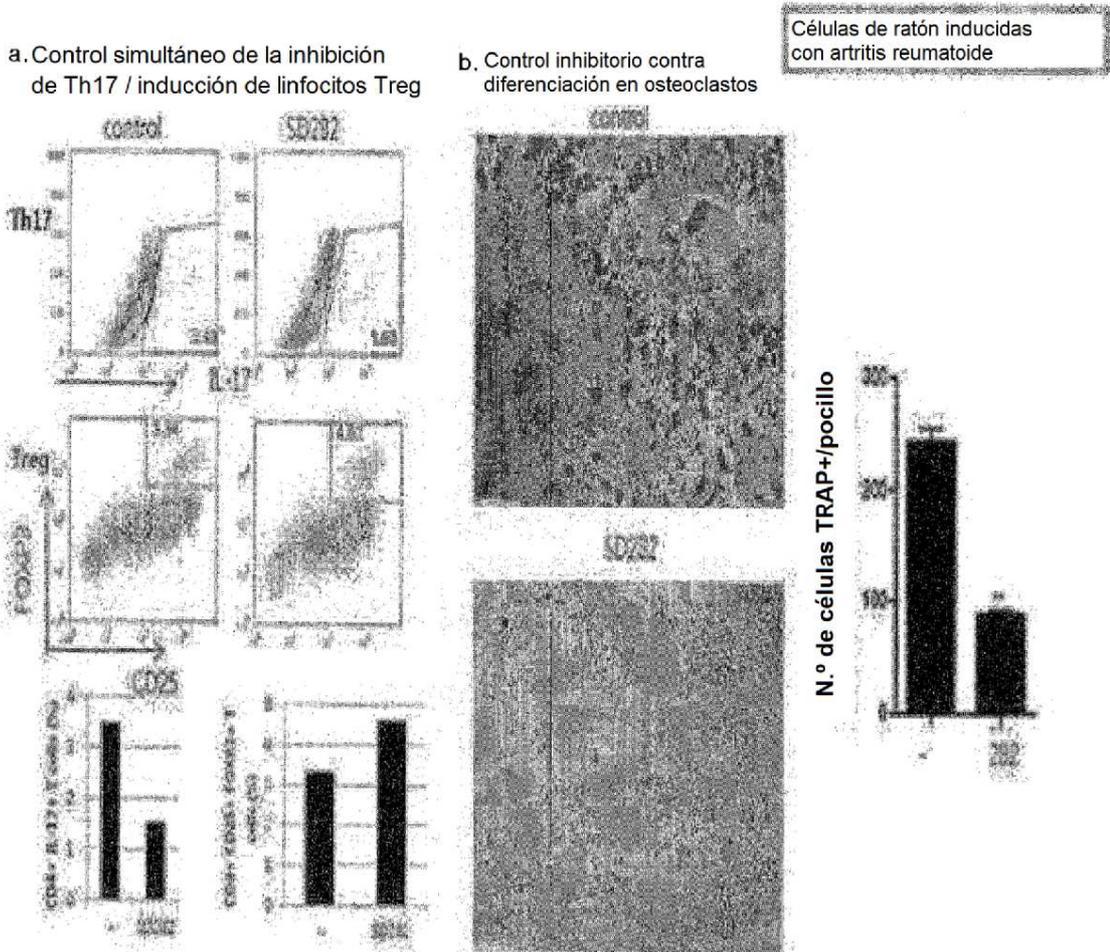


FIG. 12

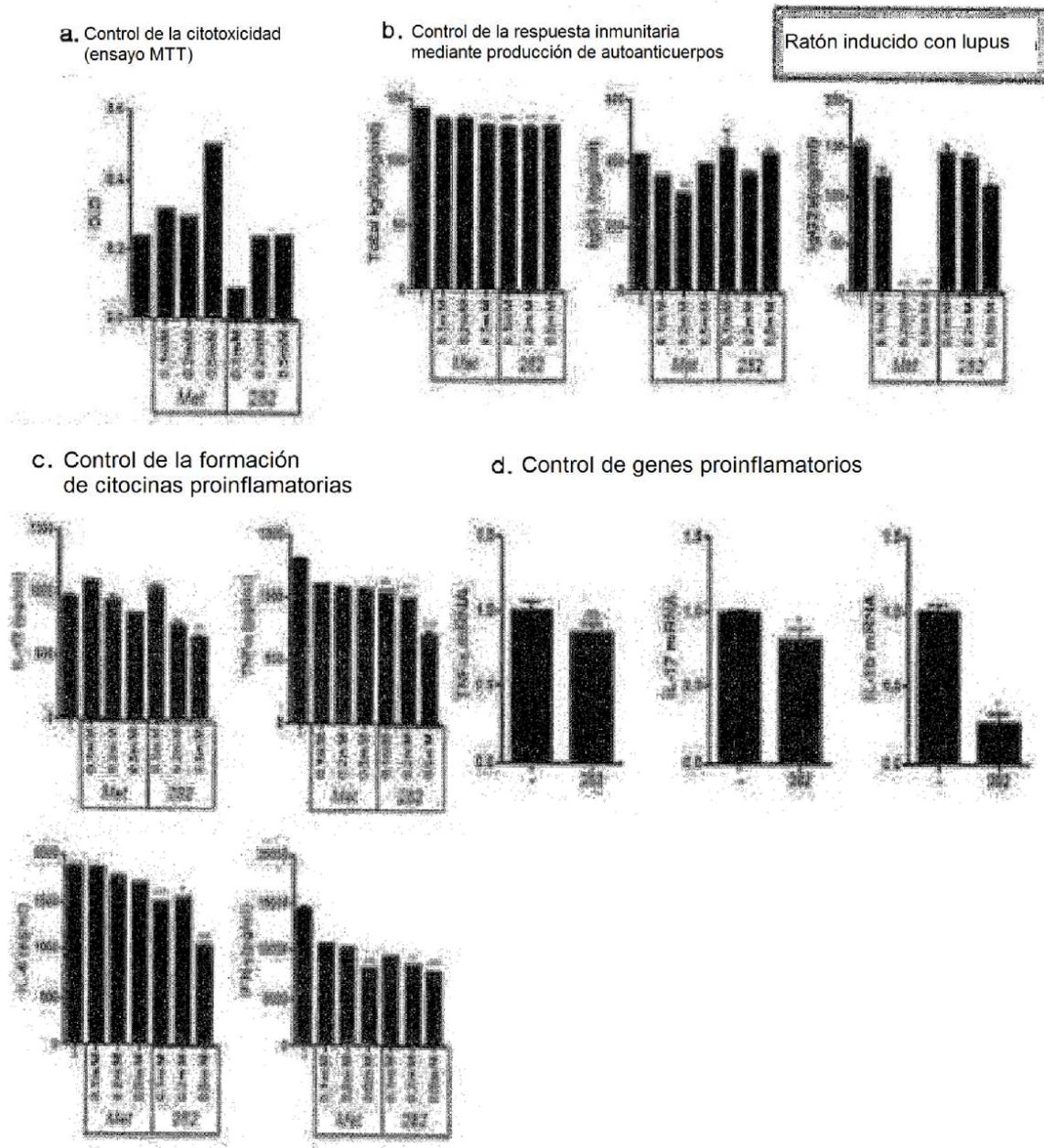


FIG. 13

Control simultáneo de la inhibición de Th17 / inducción de linfocitos Treg

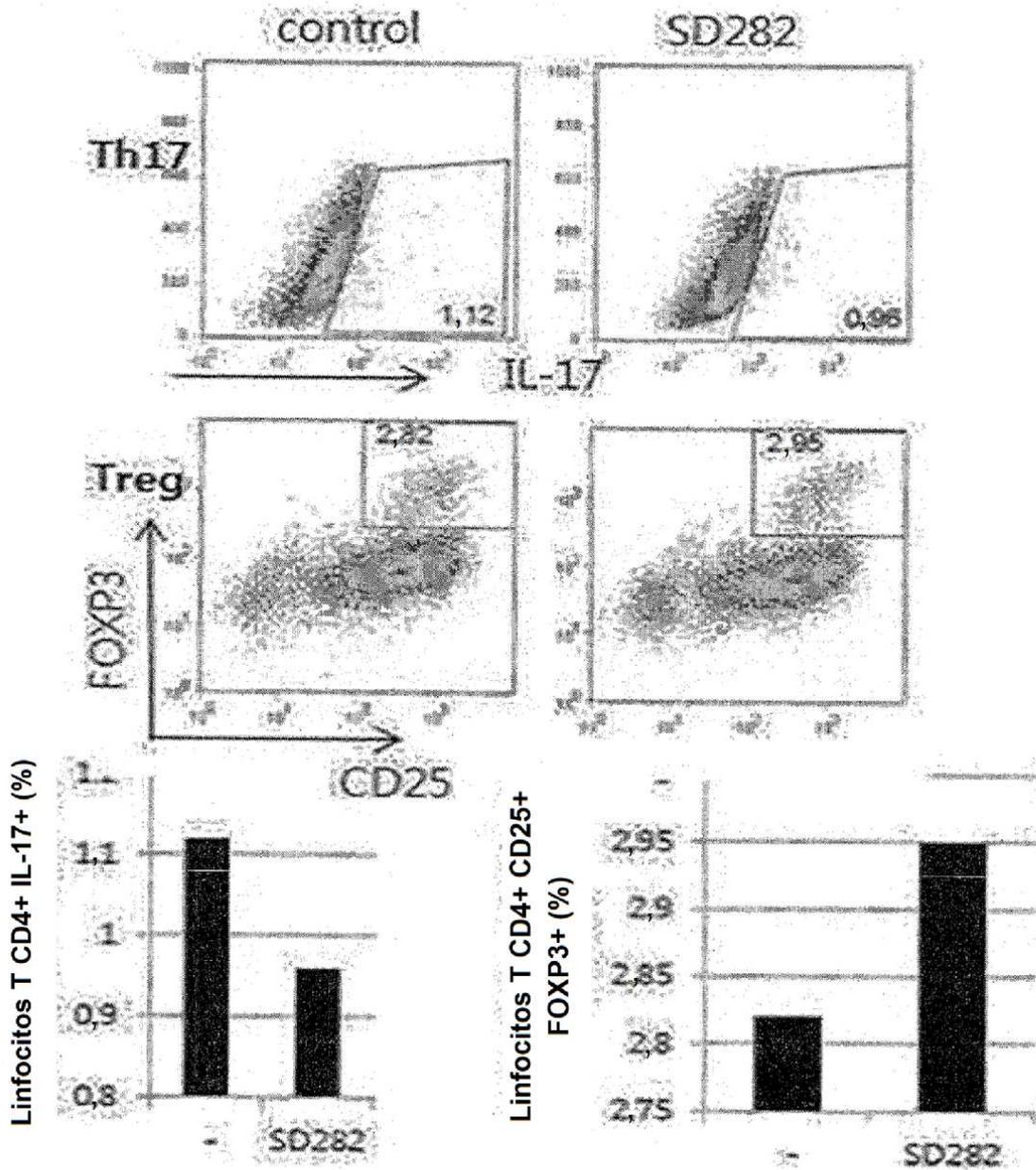
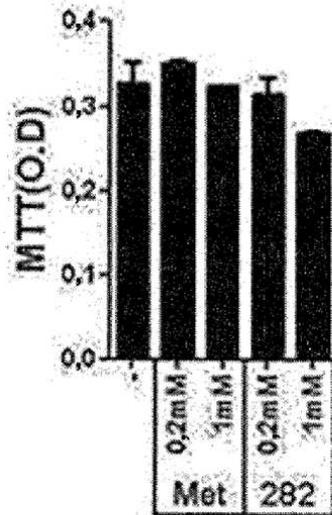


FIG. 14

1. Control de la citotoxicidad (ensayo MTT)

SP humana



2. Control de la formación de citocinas proinflamatorias

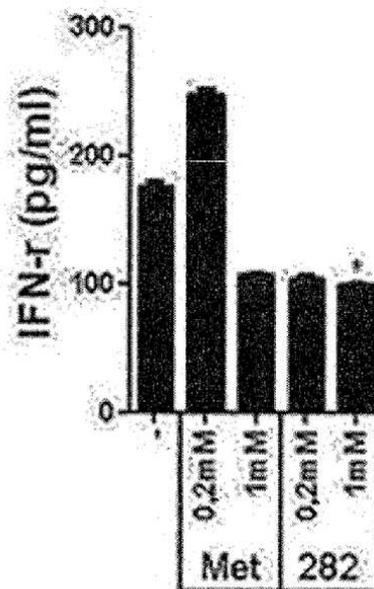
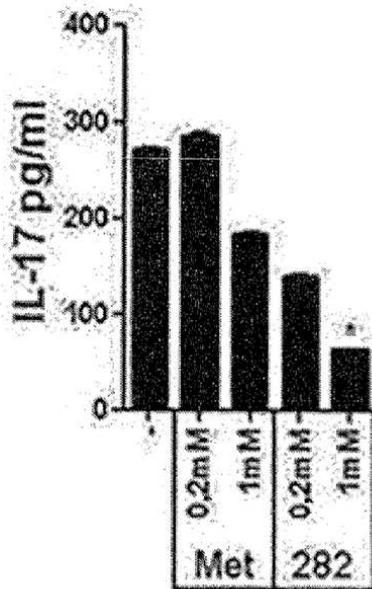
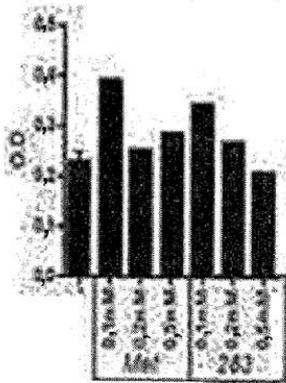


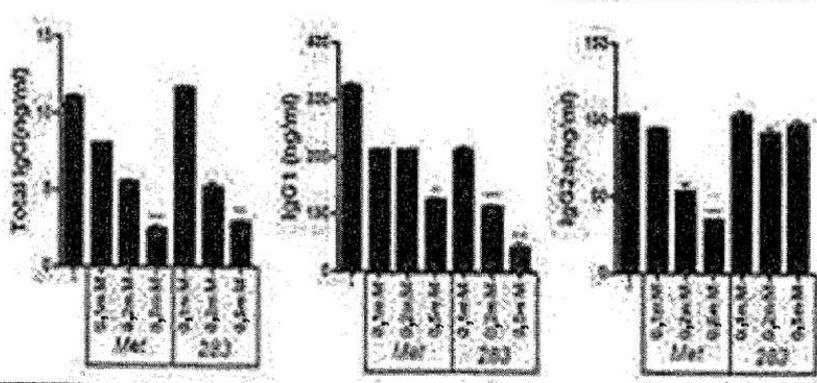
FIG. 15

a. Control de la citotoxicidad (ensayo MTT)

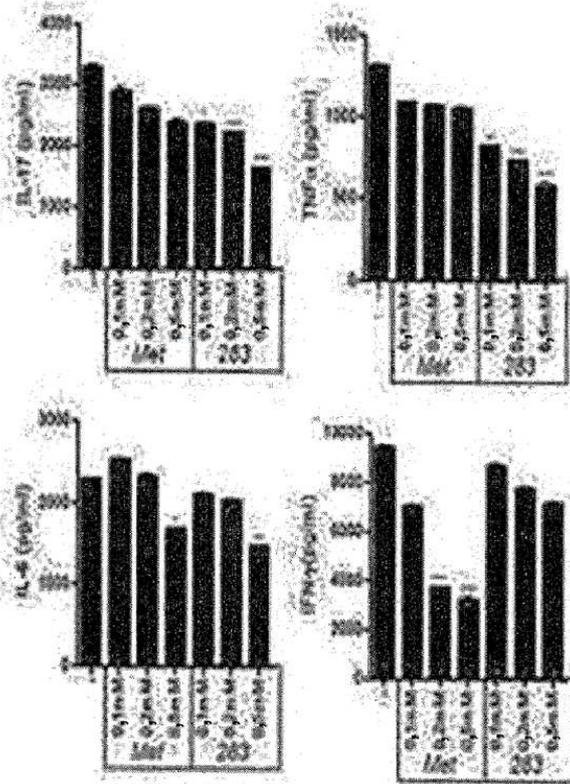


b. Control de la respuesta inmunitaria mediante producción de autoanticuerpos

Células de ratón normales



c. Control de la formación de citocinas proinflamatorias



d. Control de genes proinflamatorios

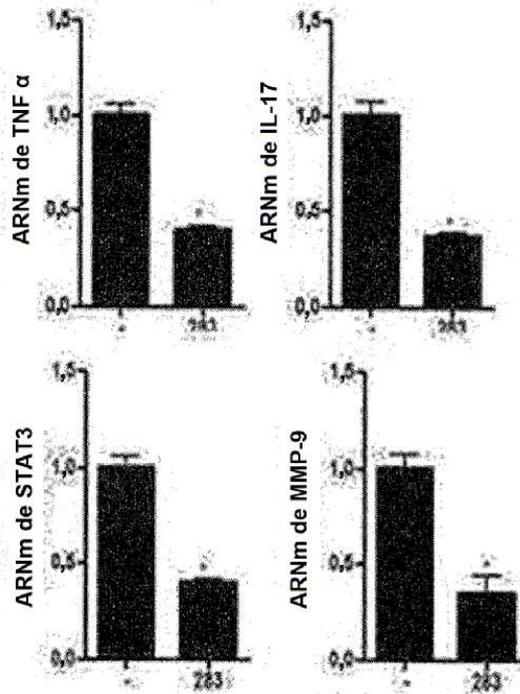


FIG. 16

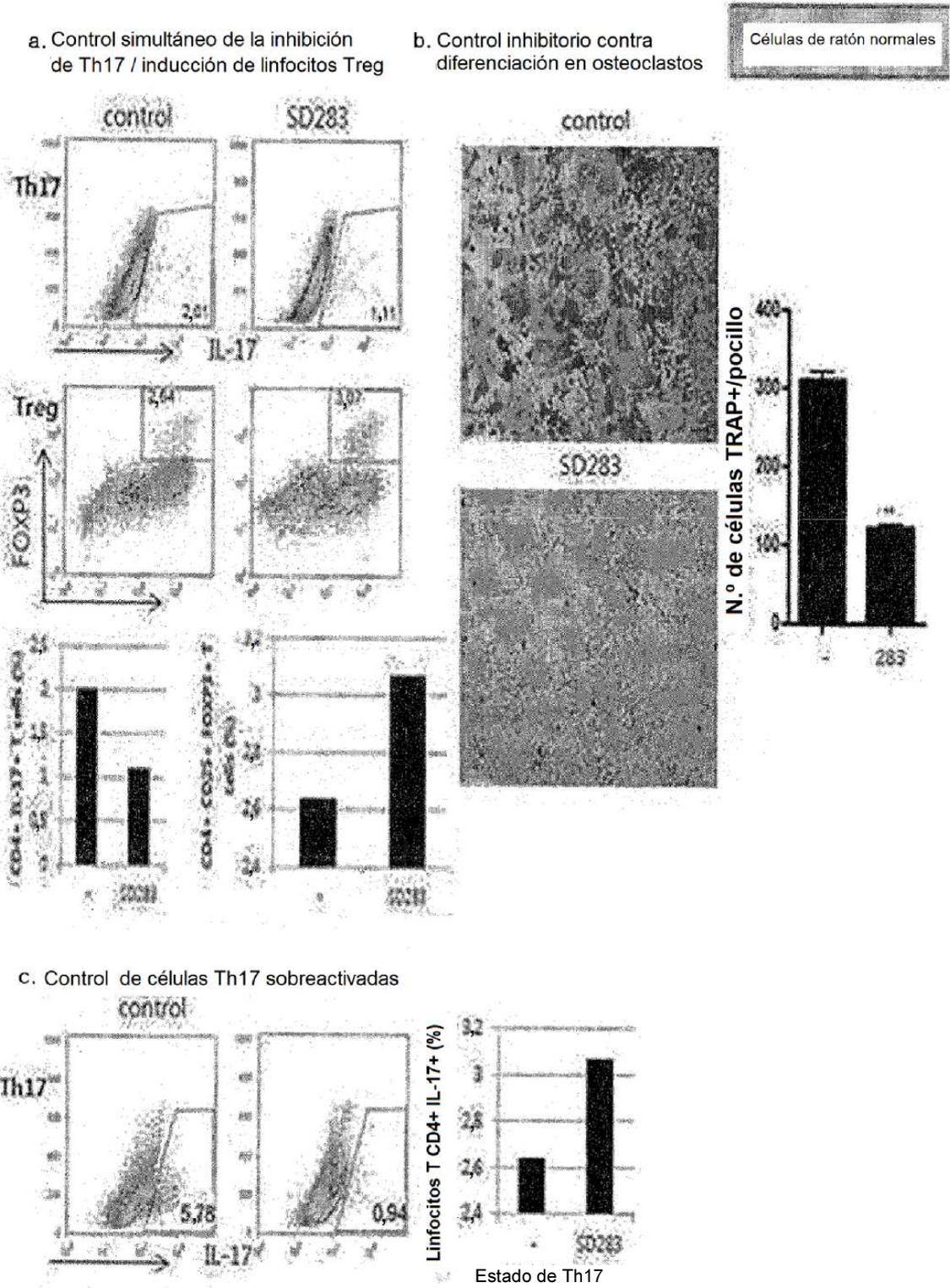
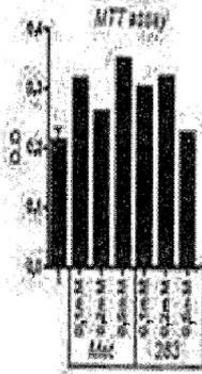


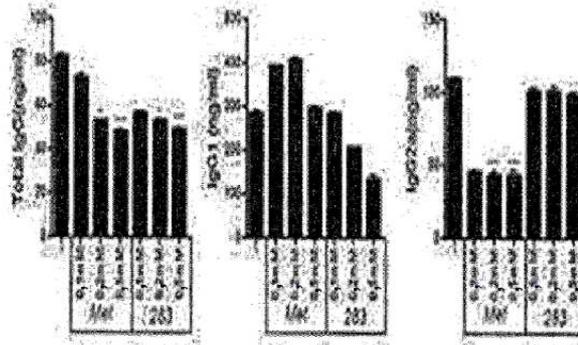
FIG. 17

Células de ratón inducidas con artritis reumatoide

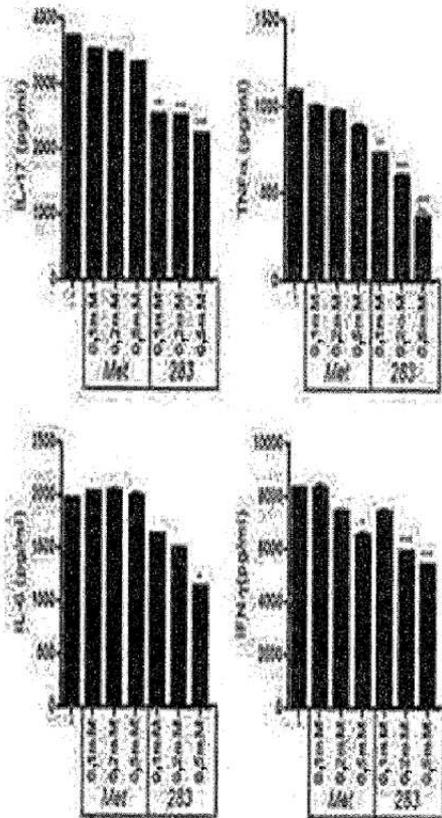
a. Control de la citotoxicidad (ensayo MTT)



b. Control de la respuesta inmunitaria mediante producción de autoanticuerpos



c. Control de la formación de citocinas proinflamatorias



d. Control de genes proinflamatorios

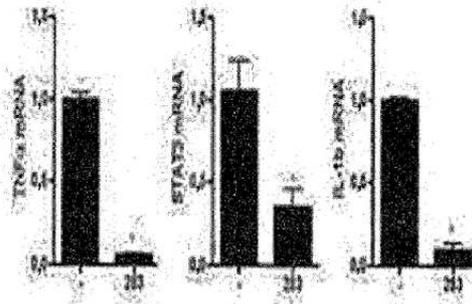


FIG. 18

a. Control simultáneo de la inhibición de Th17 / inducción de linfocitos Treg

b. Control inhibitorio contra diferenciación en osteoclastos

Células de ratón inducidas con artritis reumatoide

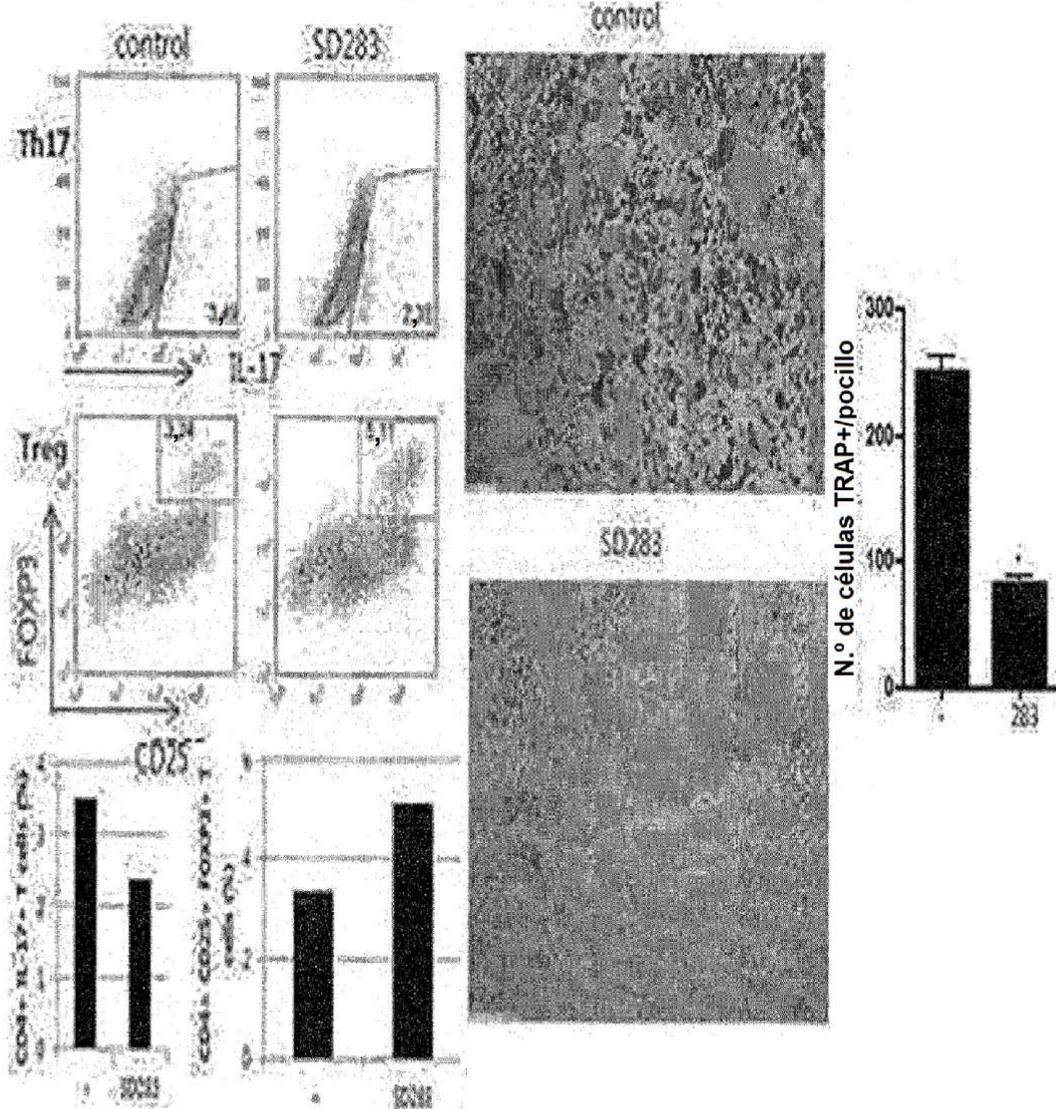
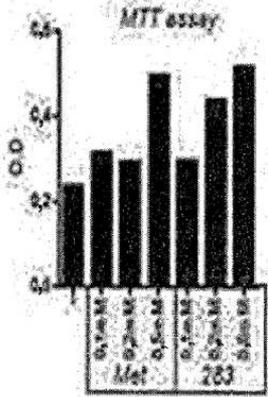


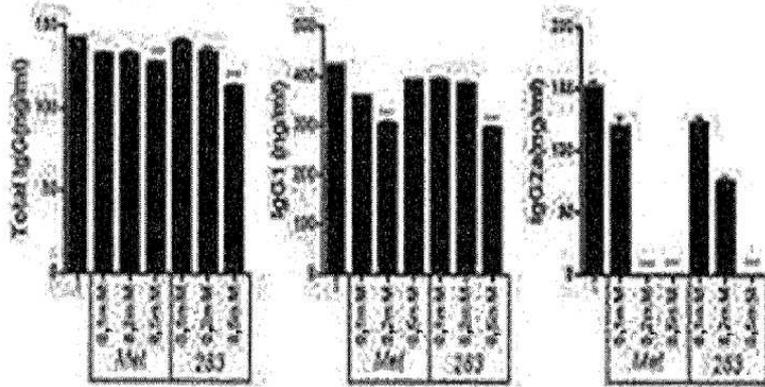
FIG. 19

a. Control de la citotoxicidad (ensayo MTT)

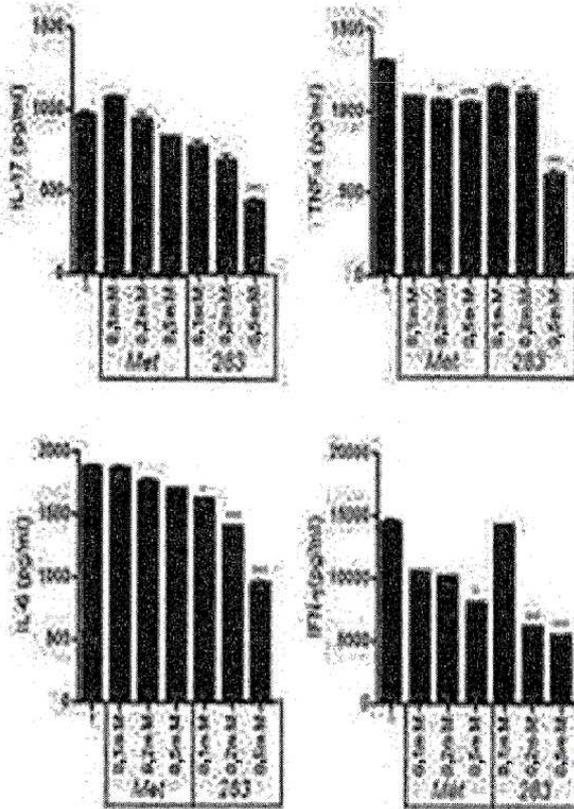


b. Control de la respuesta inmunitaria mediante producción de autoanticuerpos

Ratón inducido con lupus



c. Control de la formación de citocinas proinflamatorias



d. Control de genes proinflamatorios

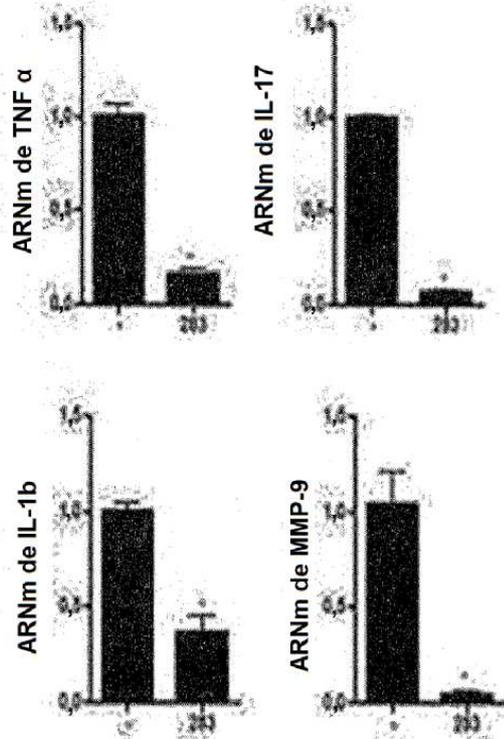


FIG. 20

Control simultáneo de la inhibición de Th17 / inducción de linfocitos

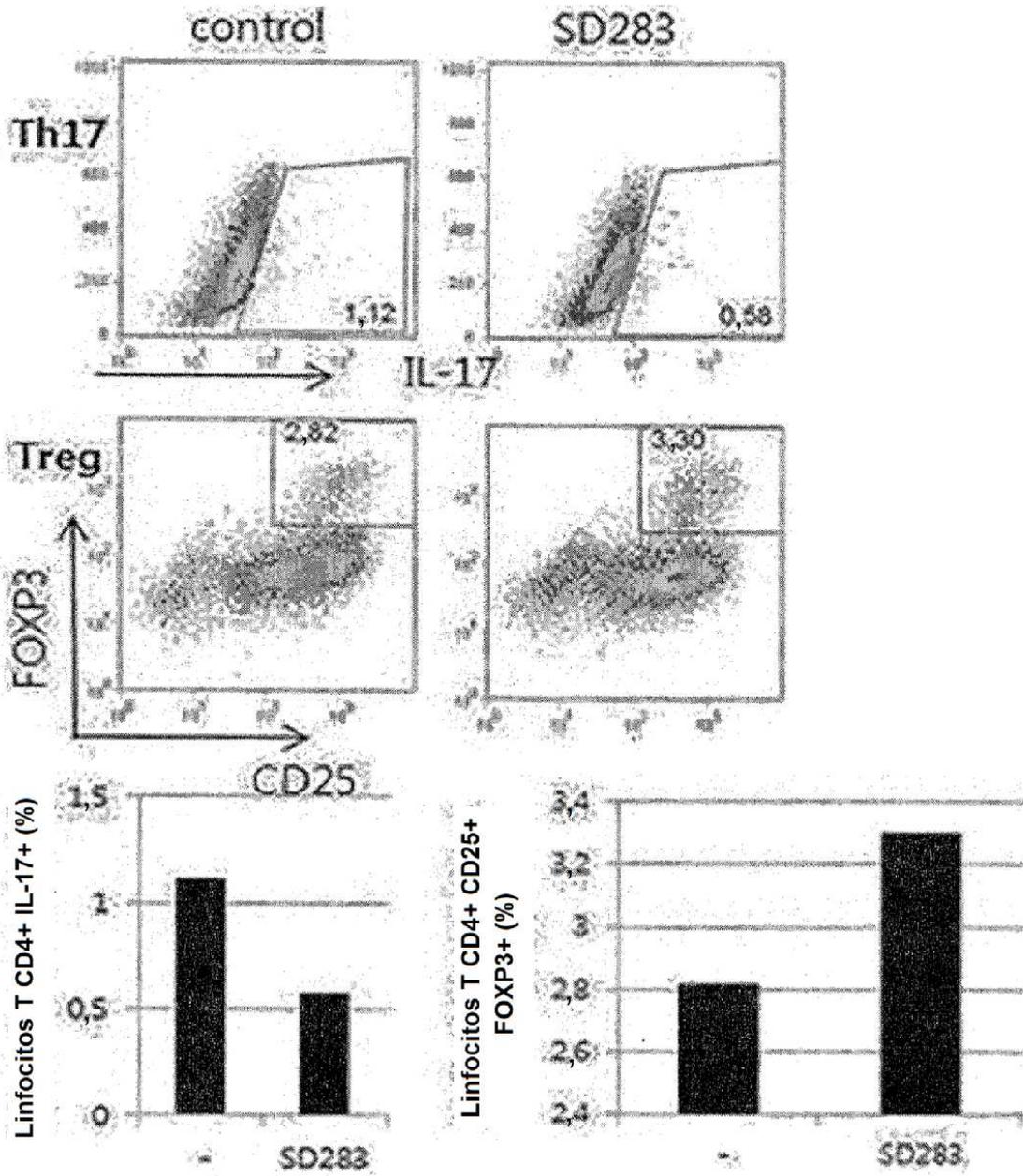
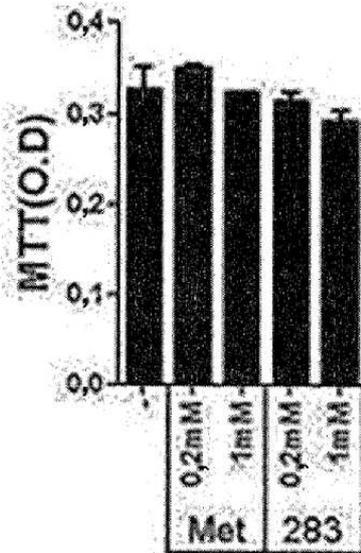


FIG. 21

a. Control de la citotoxicidad (ensayo MTT)

SP humana



b. Control de la formación de citocinas proinflamatorias

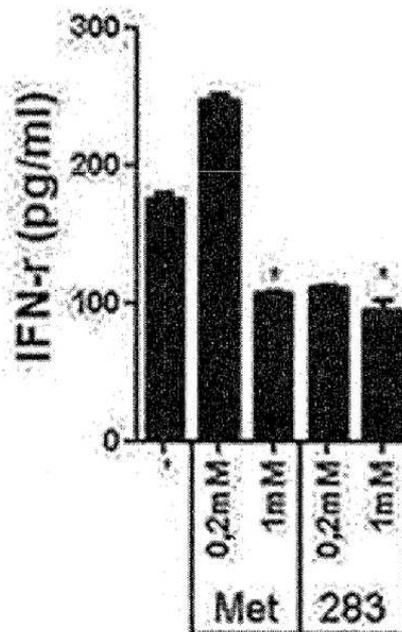
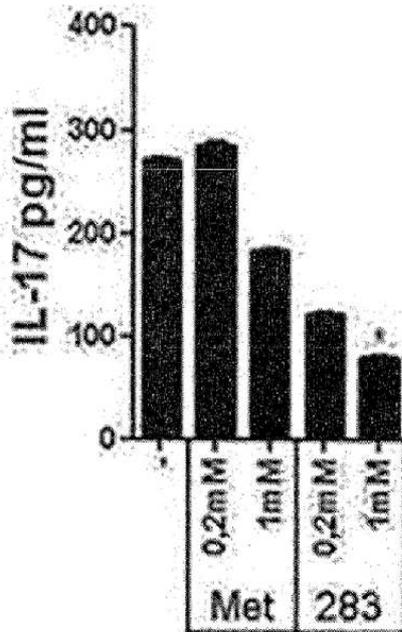
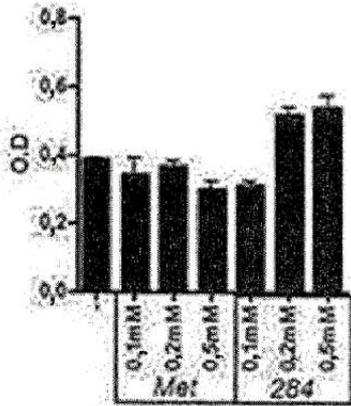


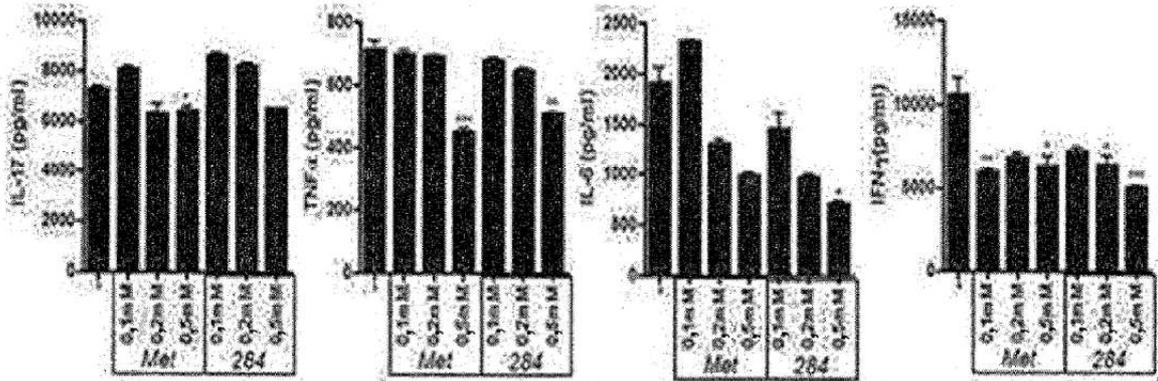
FIG. 22

a. Control de la citotoxicidad (ensayo MTT)

Células de ratón normales



b. Control de la formación de citocinas proinflamatorias



c. Control simultáneo de la inhibición de Th17 / inducción de linfocitos Treg

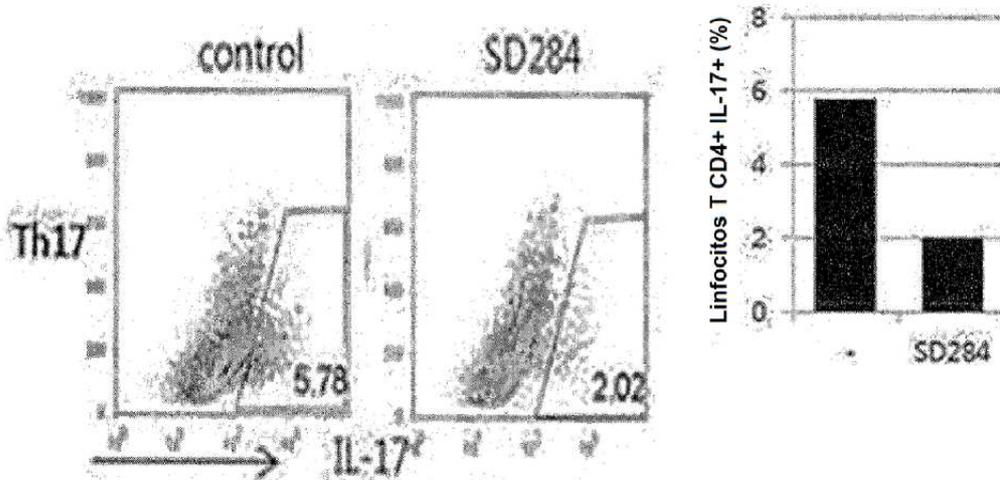
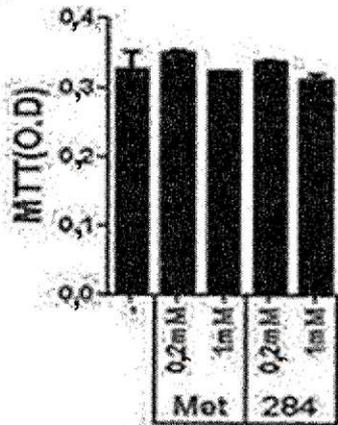


FIG. 23

a. Control de la citotoxicidad (ensayo MTT)



SP humana

b. Control de la formación de citocinas proinflamatorias

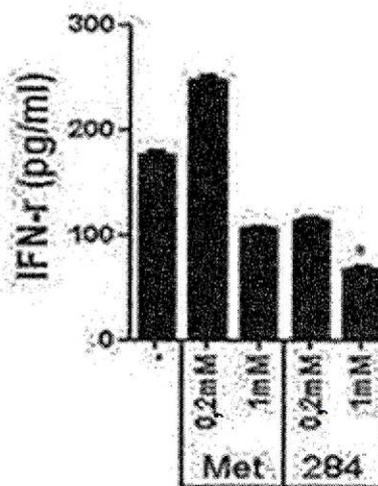
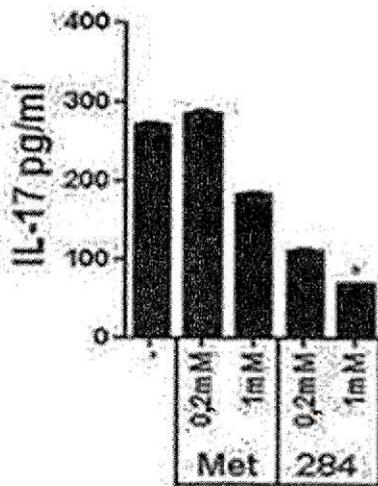


FIG. 24

