

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 716 276**

51 Int. Cl.:

A61K 31/5415 (2006.01)

A61K 31/546 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **01.08.2012 PCT/EP2012/065072**

87 Fecha y número de publicación internacional: **07.02.2013 WO13017637**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.08.2012 E 12741012 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.12.2018 EP 2739285**

54 Título: **Inhibición selectiva de proteasa MALT1 mediante derivados de fenotiazina**

30 Prioridad:

02.08.2011 EP 11006346

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
11.06.2019

73 Titular/es:

**HELMHOLTZ ZENTRUM MÜNCHEN DEUTSCHES
FORSCHUNGSZENTRUM FÜR GESUNDHEIT UND
UMWELT (GMBH) (100.0%)
Ingolstädter Landstrasse 1
85764 Neuherberg, DE**

72 Inventor/es:

**KRAPPMANN, DANIEL;
NAGEL, DANIEL;
SCHENDEL, DOLORES y
SPRANGER, STEFANI**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

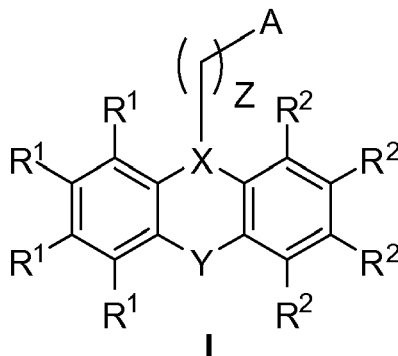
ES 2 716 276 T3

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

Inhibición selectiva de proteasa MALT1 mediante derivados de fenotiazina

La invención se refiere a un compuesto para su uso en el tratamiento de un cáncer, en el que el cáncer depende de la actividad proteolítica de la proteasa MALT1, y en el que el compuesto tiene la fórmula general (I)



en la que X es N; Y es S, O o CH₂-CH₂; ()_Z es una cadena de alquilo lineal o ramificada C₁-C₅; A es NR³R⁴ u OR⁵, o HET; R¹ y R² en cada aparición se seleccionan independientemente de -H, -CH₃, -OH, -OCH₃, -SCH₃, -F, -Cl, -CF₃, -NH₂ y -COOH; R³, R⁴ y R⁵ son H, o grupos alquilo lineales o ramificados C₁-C₅, y HET es un anillo heterocíclico de 5, 6 ó 7 miembros, en el que los átomos de anillo pueden ser C, O, N o S, el anillo puede ser saturado o aromático, y el anillo puede estar sustituido con H o grupos alquilo lineales o ramificados C₁-C₅; o una sal farmacéuticamente aceptable, enantiómero, diastereómero, mezcla racémica, forma cristalina, forma amorfa, forma no solvatada o solvato de dicho compuesto, en el que el cáncer que depende de la actividad proteolítica de la proteasa MALT1 es el subtipo de células B activadas de linfoma de células B grandes difuso o linfoma de MALT. Se da a conocer además en el presente documento que el compuesto de la invención puede usarse adicionalmente en el tratamiento de enfermedades inmunitarias dependientes de MALT1.

El alcance de la invención se define mediante las reivindicaciones. Cualquier referencia en la descripción a métodos de tratamiento se refiere a los compuestos, composiciones farmacéuticas y medicamentos de la presente invención para su uso en un método para el tratamiento del cuerpo humano (o animal) mediante terapia.

En esta memoria descriptiva, se mencionan varios documentos incluyendo solicitudes de patente y manuales de fabricante.

La proteína 1 de translocación de linfoma de tejido linfoide asociado a la mucosa (MALT1) es una cisteína proteasa funcional activada por estimulación de receptores de células T. MALT1 escinde rápidamente A20 (TNFAIP) tras arg439, lo que altera su función inhibidora de NF-κB (Coornaert *et al.* (2008), Nature Immun. 9: 263-271).

Tras la estimulación antigénica, MALT1 es un mediador clave de la señalización de NF-κB aguas arriba para controlar la activación, supervivencia y diferenciación de linfocitos.¹ Junto con CARMA1 (también conocida como CARD11) y BCL10, MALT1 ensambla el denominado complejo CBM que une los acontecimientos de señalización del receptor de antígeno proximal al complejo de IκB cinasa (IKK), el guardián de la ruta de NF-κB canónica.² Tras la costimulación de receptor de antígeno de células T (TCR)/CD28, MALT1 actúa como armazón proteico que recluta otras moléculas de señalización críticas como TRAF6, CASP8 y A20 al complejo CBM.¹ Además, modificaciones de ubiquitina covalentes en MALT1 catalizadas por la E3 ligasa TRAF6 facilitan la asociación de los dos complejos de proteína cinasa posteriores TAB2-TAK1 y NEMO-IKKα/β que en última instancia conduce a la activación de IKK.³

MALT1 contiene un dominio paracaspasa que presenta alta homología con caspasas de mamíferos y metacaspasas de plantas y hongos.⁴ Al igual que las metacaspasas, MALT1 escinde sustratos tras residuos de arginina, indicando que la actividad de escisión enzimática es bastante distinta de las caspasas que requieren en general un aspartato en la posición P1.⁵ Se induce actividad proteolítica de MALT1 tras la estimulación de TCR/CD28, lo que promueve la escisión de los sustratos BCL10, A20 y CYLD.⁶⁻⁸ La inhibición de la actividad proteasa de MALT1 por el tetrapéptido antagonista Z-VRPR-FMK que se designó originalmente como inhibidor de metacaspasas en plantas altera la activación de NF-κB óptima y la producción de IL-2 en células T.^{7,9} De manera similar, la mutación de la cisteína catalítica 464 hace que la MALT1 sea proteolíticamente inactiva y también altera la producción de IL-2 tras la complementación de células T deficientes en MALT1.⁹

La desregulación de la actividad de la proteasa MALT1 desempeña un papel crucial en el desarrollo de varias enfermedades, en particular cánceres que dependen de la actividad proteolítica de la proteasa MALT1 y enfermedades inmunitarias dependientes de MALT1. Se ha encontrado un papel promotor de tumores de MALT1 en un subconjunto de linfomas de células B grandes-difusos (DLBCL) y linfomas de tejido linfático asociado a la mucosa (MALT).¹⁰ Mediante la obtención del perfil de expresión génica, puede clasificarse DLBCL en distintas entidades y

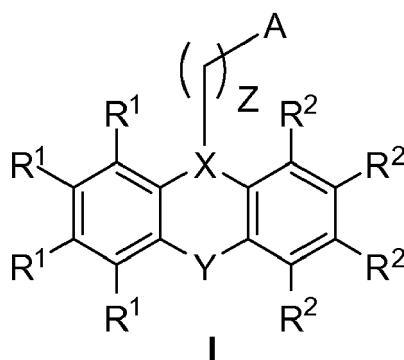
los subtipos más abundantes son el DLBCL 'de tipo células B activadas' (ABC-) y el DLBCL 'de tipo células B de centros germinales' (GCB-).¹¹⁻¹⁵ Basándose en la firma de expresión génica, el subtipo ABC-DLBCL se origina a partir de linfocitos B estimulados a través de su receptor de antígeno de células B (BCR). Con una tasa de supervivencia a los 5 años de ~30%, los pacientes con ABC-DLBCL tienen el peor pronóstico, lo que refleja el comportamiento clínico agresivo de las células ABC-DLBCL.¹⁶ El rasgo distintivo de células ABC-, pero no GCB-DLBCL, es la activación constitutiva de la ruta de señalización de NF-κB.^{11,17} La identificación de distintas aberraciones moleculares sugería que la señalización de NF-κB favorable a la supervivencia en ABC-DLBCL está provocada por desregulaciones en la señalización de BCR. Aunque algunos pacientes con ABC-DLBCL portan mutaciones de CARMA1 oncogénicas,¹⁸ la mayoría de las células de ABC-DLBCL se caracterizan por señalización de BCR activa crónica y a menudo se encuentran mutaciones en el regulador proximal de BCR CD79A y B.¹⁹ Congruente con un requisito de señalización de BCR, un examen de interferencia de ARN identificó CARMA1, BCL10 o MALT1 como reguladores críticos de la activación, supervivencia y crecimiento por NF-κB de ABC-DLBCL.¹⁰ Además, la inhibición de la actividad proteolítica de MALT1 mediante Z-VRPR-FMK inhibe la expresión génica dependiente de NF-κB y ejerce efectos tóxicos específicamente en células de ABC-DLBCL.^{20,21} Ferch *et al.* (2009), *J. Exp. Med.* 206: 2313-2320 mostraron que las células de linfoma de células B grande difuso (DLBCL) de tipo células B activadas (ABC) agresivo, pero no DLBCL de tipo células B de centros germinales (GCB), presentan complejos de CARD11-BCL10-MALT1 (CBM) ensamblados de manera constitutiva que procesan de manera continua y selectiva A20. La inhibición de MALT1 bloquea la escisión de A20 y BCL10, reduce la actividad de NFκB y disminuye la expresión de dianas de NF-κB BCLXL (BCL2L1), IL6 e IL10. La inhibición de la paracaspasa de MALT1 conduce a retardo del crecimiento y muerte de células de ABC-DLBCL. Ferch *et al.* (2009) concluyeron que la actividad de paracaspasa de MALT1 tiene un papel promotor del crecimiento, específicamente en células de ABC-DLBCL, y propusieron que la actividad proteasa de MALT1 es una posible diana para el tratamiento farmacológico de ABC-DLBCL.

El linfoma de MALT es un cáncer de los linfocitos de células B. Afecta habitualmente a personas mayores que tienen más de 60 años. La mayoría de los linfomas no Hodgkin (NHL) comienzan en los ganglios linfáticos, pero el linfoma de MALT comienza en un tipo de tejido linfático denominado tejido linfoide asociado a la mucosa (MALT). El estómago es el área más común para el desarrollo del linfoma de MALT, pero también puede comenzar en otros órganos tales como el pulmón, el tiroides, las glándulas salivales o el intestino. Debido a que el linfoma de MALT se desarrolla fuera de los ganglios linfáticos, se conoce también como linfoma extranodal. El linfoma de MALT gástrico está asociado frecuentemente (72-98%) con inflamación crónica como resultado de la presencia de *Helicobacter pylori* (Parsonnet J (1994). *N Engl J Med* 330 (18): 1267-71). El diagnóstico inicial se realiza mediante biopsia de lesiones sospechosas en esofagogastroduodenoscopia (EGD, endoscopia superior). También se realizan pruebas simultáneas para *H. pylori* para detectar la presencia de este microbio. En otros sitios, también se sospecha de la estimulación inmunitaria crónica en la patogenia (por ejemplo, asociación entre enfermedades autoinmunitarias crónicas tales como síndrome de Sjögren y tiroiditis de Hashimoto, y linfoma de MALT de las glándulas salivales y el tiroides). En linfoma de MALT, la translocación frecuente t(11;18)(q21;q21) crea una fusión entre el extremo C-terminal de MALT1 incluyendo el dominio de paracaspasa y el extremo N-terminal de IAP2.²² El dominio de paracaspasa de la proteína de fusión IAP2-MALT1 cataliza la escisión de NIK y potencia de ese modo la activación de NF-κB no canónica, lo que confiere resistencia a la apoptosis.²³

Tomados conjuntamente, agentes novedosos contra la paracaspasa de MALT1 podrían ser beneficiosos para el tratamiento de linfoma asociado con actividad de MALT1 desregulada y enfermedades inmunitarias dependientes de MALT1. En particular, la tasa de supervivencia global a los 5 años de sólo ~30% de los pacientes con ABC-DLBCL recalca la clara necesidad de opciones de tratamiento alternativas, en particular para este tipo de linfoma.¹⁶ Por tanto, un objeto de la presente invención es la provisión de agentes novedosos contra MALT1 que puedan usarse en el tratamiento de las enfermedades comentadas anteriormente.

El documento WO2007/054550 da a conocer derivados de quinazolina bicíclicos para el tratamiento de enfermedades cancerígenas. Sin embargo, los compuestos de la presente no son derivados de quinazolina y se basan en una estructura central tricíclica.

Por consiguiente, la invención se refiere en una primera realización a un compuesto para su uso en el tratamiento de un cáncer, en el que el cáncer depende de la actividad proteolítica de la proteasa MALT1, y en el que el compuesto tiene la fórmula general (I)



en la que X es N; Y es S, O CH₂-CH₂; ()_Z es una cadena de alquilo lineal o ramificada C₁-C₅; A es NR³R⁴ u OR⁵, o HET; R¹ y R² en cada caso se seleccionan independientemente de -H, -CH₃, -OH, -OCH₃, -SCH₃, -F, -Cl, -CF₃, -NH₂, y -COOH; R³, R⁴ y R⁵ son H, o grupos alquilo lineales o ramificados C₁-C₅, y HET es un anillo heterocíclico de 5, 6 ó 7 miembros, en el que los átomos de anillo pueden ser C, O, N o S, el anillo puede ser saturado o aromático, y el anillo puede estar sustituido con H o grupos alquilo lineales o ramificados C₁-C₅; o una sal farmacéuticamente aceptable, enantiómero, diastereómero, mezcla racémica, forma cristalina, forma amorfa, forma no solvatada o solvato de dicho compuesto, en el que el cáncer que depende de la actividad proteolítica de la proteasa MALT1 es el subtipo de células B activadas de linfoma de células B grandes difuso o linfoma de MALT.

El término "un cáncer que depende de la actividad proteolítica de la proteasa MALT1" tal como se usa en el presente documento define un cáncer que está parcial o predominantemente provocado por actividad (proteolítica) elevada no fisiológicamente de MALT1. La actividad enzimática de MALT-1 comprende una actividad cisteína proteasa (EC 3.4.22.- cisteína endopeptidasas). Tal como resulta evidente a partir de los ejemplos adjuntos, los inventores han encontrado que los compuestos de la invención inhiben específicamente la actividad de MALT1. Tal como se comentó anteriormente en el presente documento en detalle, la actividad de MALT1 es responsable de la activación de NF-κB óptima y la producción de IL-2 en células T estimuladas con receptor de antígeno. Esto indica que la actividad de MALT1 es esencial para la activación fisiológica de linfocitos. Por consiguiente, un cáncer que depende de la actividad proteolítica de la proteasa MALT1 es preferiblemente un linfoma que depende de la actividad proteolítica de la proteasa MALT1. Ejemplos preferidos de linfomas que dependen de la actividad proteolítica de la proteasa MALT1 son el subtipo de células B activadas (subtipo de ABC) del linfoma de células B grandes difuso y el linfoma de MALT que se comentan en más detalle a continuación en el presente documento.

La presente invención también abarca sales farmacéuticamente aceptables, enantiómeros, diastereómeros, mezclas racémicas, formas cristalinas, formas no cristalinas, formas amorfas, formas no solvatadas y solvatos del compuesto de fórmula general (I).

El término "sales farmacéuticamente aceptables" tal como se usa en el presente documento incluye sales del compuesto de fórmula general (I) que se preparan con ácidos o bases relativamente no tóxicos (es decir, farmacéuticamente aceptables), dependiendo de los sustituyentes particulares encontrados en los compuestos de la presente invención. Si, por ejemplo, los compuestos de la presente invención contienen funcionalidades ácidas, pueden obtenerse sales de adición de base poniendo en contacto la forma neutra de tales compuestos con una cantidad suficiente de la base deseada, o bien pura o bien en un disolvente inerte adecuado. Los ejemplos no limitativos de sales de adición de base farmacéuticamente aceptables incluyen sal de sodio, potasio, calcio, amonio, amino orgánico o magnesio, o una sal similar. Si los compuestos de la presente invención contienen funcionalidades básicas, pueden obtenerse sales de adición de ácido poniendo en contacto la forma neutra de tales compuestos con una cantidad suficiente del ácido deseado, o bien puro o bien en un disolvente inerte adecuado. Los ejemplos no limitativos de sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables incluyen las derivadas de ácidos inorgánicos como ácidos clorhídrico, bromhídrico, nítrico, carbónico, fosfórico, fosfórico parcialmente neutralizado, sulfúrico, sulfúrico parcialmente neutralizado, yodhídrico o fosforoso y similares, así como las sales derivadas de ácidos orgánicos relativamente no tóxicos como acético, propiónico, isobutírico, maleico, malónico, benzoico, succínico, subérico, fumárico, mandélico, ftálico, bencenosulfónico, p-tolilsulfónico, cítrico, tartárico, metanosulfónico, y similares. También se incluyen sales de aminoácidos tales como arginato y similares, y sales de ácidos orgánicos como ácidos glucurónico o galacturónico y similares. Determinados compuestos específicos de la presente invención pueden contener tanto funcionalidades básicas como ácidas que permiten que los compuestos se conviertan en o bien sales de adición de ácido o bien de base. Las formas neutras de los compuestos de la presente invención pueden regenerarse poniendo en contacto la sal con una base o ácido y aislando el compuesto original de la manera convencional. La forma original del compuesto difiere de las diversas formas de sal en determinadas propiedades físicas, tales como solubilidad en disolventes polares, pero por lo demás las sales son equivalentes a la forma original del compuesto para los fines de la presente invención.

Los compuestos de la presente invención pueden presentar átomos de carbono quirales o asimétricos (centros ópticos) y/o dobles enlaces. Los racematos, diastereómeros, isómeros geométricos e isómeros ópticos individuales

se abarcan por la presente invención. Los compuestos de la presente invención pueden existir en formas no solvatadas así como formas solvatadas, incluyendo formas hidratadas. En general, las formas solvatadas son equivalentes a las formas no solvatadas y también se abarcan por la presente invención. Los compuestos de la presente invención pueden existir además en múltiples formas cristalinas o amorfas.

5 Además de formas de sal, los compuestos de la presente invención pueden estar en forma de profármaco. Profármacos de los compuestos de la invención son los compuestos que experimentan fácilmente cambios químicos en condiciones fisiológicas para proporcionar los compuestos de la presente invención. Adicionalmente, los profármacos pueden convertirse en los compuestos de la presente invención mediante métodos químicos o bioquímicos en un entorno *ex vivo*. Por ejemplo, los profármacos pueden convertirse lentamente en los compuestos de la presente invención cuando, por ejemplo, se colocan en un depósito de parche transdérmico con un reactivo químico o enzima adecuado.

10 El compuesto de la invención descrita en el presente documento puede administrarse al sujeto a una dosis adecuada. El compuesto de la invención se administra preferiblemente a mamíferos tales como animales domésticos y mascotas. Ejemplos no limitativos de animales domésticos y mascotas son cerdos, vacas, búfalos, ovejas, cabras, conejos, caballos, asnos, pollos, patos, gatos, perros, cobayas o hámsteres. Lo más preferiblemente se administra a seres humanos. El modo de administración preferido depende de la forma del compuesto de la invención (que tiene la fórmula general (I)). Tal como se describió anteriormente en el presente documento, el compuesto que tiene la fórmula general (I) puede estar en forma de sales farmacéuticamente aceptables, enantiómeros, diastereómeros, mezclas racémicas, formas cristalinas, formas no cristalinas, formas amorfas, formas no solvatadas o solvatos. El compuesto de la invención puede administrarse por vía oral, por vía parenteral, tal como por vía subcutánea, por vía intravenosa, por vía intramuscular, por vía intraperitoneal, por vía intratecal, por vía transdérmica, por vía transmucosa, por vía subdural, por vía local o por vía tópica mediante iontoforesis, por vía sublingual, mediante pulverización de inhalación, aerosol o por vía rectal y similares en formulaciones unitarias de dosificación que comprenden además opcionalmente excipientes farmacéuticamente aceptables convencionales.

25 El compuesto de la invención para su uso según la presente invención puede formularse como una composición farmacéutica usando uno o más portadores o excipientes fisiológicos, véase, por ejemplo Ansel *et al.*, "Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems", 7ª edición, Lippincott Williams & Wilkins Publishers, 1999.

30 Para administración oral, la composición farmacéutica de la invención puede adoptar la forma de, por ejemplo, comprimidos o cápsulas preparados por medios convencionales con excipientes farmacéuticos aceptables tales como agentes de unión (por ejemplo, almidón de maíz pregelatinizado, polivinilpirrolidona, hidroxipropilmetilcelulosa), cargas (por ejemplo, lactosa, celulosa microcristalina, hidrogenofosfato de calcio), lubricantes (por ejemplo, estearato de magnesio, talco, sílice), disgregantes (por ejemplo, almidón de patata, glicolato sódico de almidón) o agentes humectantes (por ejemplo, laurilsulfato de sodio). La composición farmacéutica puede administrarse con un portador fisiológicamente aceptable a un paciente. En una realización específica, el término "farmacéuticamente aceptable" significa aprobado por una agencia reguladora u otra farmacopea generalmente reconocida para su uso en animales, y más particularmente en seres humanos. El término "portador" se refiere a un diluyente, adyuvante, excipiente o vehículo con el que se administra el agente terapéutico. Tales portadores farmacéuticos pueden ser líquidos estériles, tales como agua y aceites, incluyendo los de origen de petróleo, animal, vegetal o sintético, tales como aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo y similares. El agua es un portador preferido cuando la composición farmacéutica se administra por vía intravenosa. También pueden emplearse disoluciones salinas y disoluciones de glicerol y dextrosa acuosas como portadores líquidos, particularmente para disoluciones inyectables. Los excipientes farmacéuticos adecuados incluyen almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, caliza, gel de sílice, estearato de sodio, monoestearato de glicerol, talco, ión de sodio, leche en polvo desnatada, glicerol, propileno, glicol, agua, etanol y similares. La composición, si se desea, puede contener también cantidades minoritarias de agentes humectantes o emulsionantes, o agentes de tamponamiento del pH. Estas composiciones pueden estar en forma de pomadas, disoluciones, suspensiones, emulsión, comprimidos, píldoras, cápsulas, polvos, formulaciones de liberación sostenida y similares. Una forma preferida es una pomada. La composición puede formularse como un supositorio, con aglutinantes y portadores tradicionales tales como triglicéridos. La formulación oral puede incluir portadores convencionales tales como calidades farmacéuticas de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina sódica, celulosa, carbonato de magnesio, etc. Se describen ejemplos de portadores farmacéuticos adecuados en "Remington's Pharmaceutical Sciences" de E.W. Martin. Tales composiciones contendrán una cantidad terapéuticamente eficaz de los compuestos mencionados anteriormente, preferiblemente en forma purificada, junto con una cantidad adecuada de portador para proporcionar la forma para la administración apropiada al paciente. La formulación debe adecuarse al modo de administración.

60 Las preparaciones líquidas para administración oral pueden estar en forma de, por ejemplo, disoluciones, jarabes o suspensiones, o pueden presentarse como un producto seco para su constitución con agua u otro vehículo adecuado antes de su uso. Tal preparación líquida puede prepararse por medios convencionales con aditivos farmacéuticamente aceptables tales como agentes de suspensión (por ejemplo, sorbitol, jarabe, derivados de celulosa, grasas comestibles hidrogenadas), agentes emulsionantes (por ejemplo, lecitina, goma arábiga), vehículos no acuosos (por ejemplo, aceite de almendras, ésteres oleosos, alcohol etílico, aceites vegetales fraccionados),

conservantes (por ejemplo, p-hidroxycarbonatos de metilo o propilo, ácidos sóricos). Las preparaciones también pueden contener sales de tampón, agentes aromatizantes, colorantes y edulcorantes considerados apropiados. Pueden formularse adecuadamente preparaciones para administración oral para dar liberación controlada de la composición farmacéutica de la invención.

- 5 Para administración mediante inhalación, la composición farmacéutica de la invención se suministra convenientemente en forma de una presentación de pulverización de aerosol a partir de un nebulizador o envase presurizado, con el uso de un propelente adecuado (por ejemplo, diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano, dióxido de carbono u otro gas adecuado). En el caso de un aerosol presurizado, la unidad de dosificación puede determinarse proporcionando una válvula para suministrar una cantidad medida. Pueden formularse cápsulas y cartuchos de, por ejemplo, gelatina, para su uso en un inhalador o insuflador que contienen una mezcla en polvo de la composición farmacéutica de la invención y una base de polvo adecuada tal como lactosa o almidón.

- 15 La composición farmacéutica de la invención puede formularse para administración parenteral mediante inyección, por ejemplo, mediante inyección en bolo o infusión continua. El sitio de las inyecciones incluye intravenosa, intraperitoneal o subcutánea. Las formulaciones para inyección pueden presentarse en forma de dosificación unitaria (por ejemplo, en un vial, en un recipiente de múltiples dosis), y con un conservante añadido. La composición farmacéutica de la invención puede adoptar formas tales como suspensiones, disoluciones o emulsiones en vehículos oleosos o acuosos, y puede contener agentes de formulación tales como agentes de suspensión, estabilizantes o dispersantes. Alternativamente, el agente puede estar en forma de polvo para su constitución con un vehículo adecuado (por ejemplo, agua estéril libre de pirógenos) antes de su uso. Normalmente, composiciones para administración intravenosa son disoluciones en tampón acuoso isotónico estéril. Cuando es necesario, la composición puede incluir también un agente de solubilización y un anestésico local tal como lignocaína para aliviar el dolor en el sitio de la inyección. Generalmente, los componentes se suministran o bien por separado o bien mezclados entre sí en forma de dosificación unitaria, por ejemplo, como un polvo liofilizado seco o concentrado libre de agua en un recipiente herméticamente sellado tal como una ampolla o sobre que indica la cantidad de agente activo. Cuando la composición va a administrarse mediante infusión, puede dispensarse con una botella de infusión que contiene solución salina o agua de calidad farmacéutica estéril. Cuando la composición se administra mediante inyección, puede proporcionarse una ampolla de agua estéril para inyección o solución salina de modo que los componentes pueden mezclarse antes de la administración.

- 20 30 La composición farmacéutica de la invención, si se desea, también puede presentarse en un envase, o dispositivo dispensador que puede contener una o más formas de dosificación unitarias que contienen dicho agente. El envase puede comprender, por ejemplo, una lámina de metal o de plástico, tal como un envase de blíster. El envase o dispositivo dispensador puede ir acompañado de instrucciones para su administración.

- 35 La composición farmacéutica de la invención puede administrarse como único agente activo o puede administrarse en combinación con otros agentes.

- 40 Según la primera realización, se prefiere que X sea N. Además, se prefiere que Y sea S. ($)_z$ es preferiblemente una cadena de alquilo C_1-C_5 lineal, y más preferiblemente una cadena de alquilo C_1-C_3 lineal. R^1 es preferiblemente -H; y R^2 es preferiblemente -H o $-SCH_3$. Preferiblemente, las realizaciones preferidas pueden estar presentes independientemente entre sí. En una realización adicional preferida, están presentes las características de todas las realizaciones preferidas.

Por tanto, según una realización preferida, el compuesto para su uso según la invención tiene la fórmula (I) anterior, en la que en la fórmula (I) X es N; Y es S; ($)_z$ es una cadena de alquilo C_1-C_5 lineal, R^1 es -H; y R^2 es -H o $-SCH_3$.

- 45 Según una realización más preferida de la invención, el compuesto para su uso según la invención tiene la fórmula (I) anterior, en la que en la fórmula (I) A es HET y HET es un anillo carbocíclico de 5 miembros a 7 miembros que está opcionalmente interrumpido con NR^3 .

En este sentido, se prefiere que HET sea un anillo carbocíclico de 6 miembros. Incluso se prefiere más que HET sea un anillo carbocíclico de 6 miembros que está interrumpido con NR^3 , en el que R^3 es CH_3 .

Según una realización más preferida adicional de la invención, el compuesto para su uso según la invención tiene la fórmula (I) anterior, en la que en la fórmula (I) A es NR^3R^4 y R^3 es H o CH_3 y R^4 es $-CH_3$.

- 50 En este sentido, lo más preferido es que R^3 y R^4 sean $-CH_3$.

Según otra realización más preferida de la invención, el compuesto para su uso según la invención tiene la fórmula (I) anterior, en la que en la fórmula (I) A es NR^3R^4 , en la que R^3 es CH_3 , R^4 es $-CH_3$, $-C_2H_5$ o una cadena de alquilo lineal C_3-C_5 , cuya cadena de alquilo puede estar interrumpida por O, N o S y que forma un anillo saturado con un átomo de carbono de ($)_z$. En este sentido lo más preferido es que R^4 sea $-CH_3$.

- 55 Según una realización incluso más preferida de la invención, el compuesto para su uso según la invención tiene la fórmula (I) anterior, en la que el anillo saturado es un anillo carbocíclico de 5 miembros a 7 miembros que está

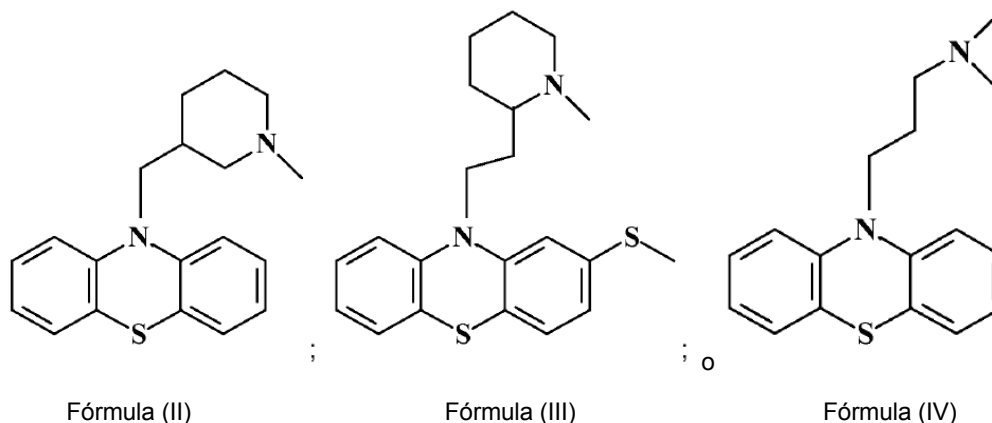
interrumpido con N.

En este sentido se prefiere que el anillo de alquileo de 5 miembros a 7 miembros que está opcionalmente interrumpido con N sea un anillo de alquileo de 6 miembros. También se prefiere que el anillo saturado sea un anillo carbocíclico saturado de 5 miembros a 7 miembros (no interrumpido con N) y más preferiblemente un anillo carbocíclico saturado de 6 miembros (no interrumpido con N).

Según una realización más preferida de la invención el compuesto para su uso según la invención tiene la fórmula (I) anterior, en la que en la fórmula (I) A es HET y HET es N-metilpiperidin-3-ilo.

Según una realización más preferida adicional de la invención el compuesto para su uso según la invención tiene la fórmula (I) anterior, en la que en la fórmula (I) (a) Z = 3 y A es NR³R⁴ y R³ y R⁴ son -CH₃; (b) Z = 1 y A es N-metilpiperidin-3-ilo; o (c) Z = 2 y A es N-metilpiperidin-2-ilo.

Según la realización más preferida de la invención, el compuesto para su uso según la invención es



El compuesto de fórmula (II) se conoce en la técnica como mepazina. La mepazina es una fenotiazina que se usó inicialmente como tranquilizante (Lord y Archibald (1957), *Can J Comp Med Vet Sci.*, 21(11): 391-394).

El compuesto de fórmula (III) se conoce en la técnica como tioridazina. La tioridazina también pertenece al grupo de fármacos de fenotiazina. La tioridazina se conoce en la técnica como fármaco antipsicótico y se usó ampliamente en el tratamiento de esquizofrenia y psicosis.

El compuesto de fórmula (IV) se conoce en la técnica como promazina. La promazina es un derivado de fenotiazina. La promazina se usa en la técnica como fármaco antipsicótico, por ejemplo, para tratar la esquizofrenia.

Los tres derivados de fenotiazina (PD) analizados en los ejemplos adjuntos se han usado en ensayos clínicos y como fármacos antipsicóticos y/o sedantes y se cree que esta actividad se basa principalmente en su capacidad para funcionar como antagonistas de receptores de dopamina D₂.³⁰ Se ha evaluado la mepazina como fármaco antipsicótico y tranquilizante con la marca comercial *Pacatal* a finales de la década de 1950 y principios de la década de 1960. Mientras que algunas investigaciones clínicas han atestiguado un efecto antipsicótico, otras no pudieron hacerlo.^{25,31} Se notificaron algunos efectos secundarios, incluyendo una reducción de los ataques de asma tras el tratamiento con mepazina, lo que indica una determinada actividad de inmunosupresión.³¹ Según lo que mejor conocen los inventores, no se han notificado observaciones con respecto a los posibles efectos beneficiosos sobre pacientes con cáncer. Ningún diseño de estudio ni tamaño de cohorte permite llegar a ninguna conclusión de que mepazina, tioridazina y promazina puedan inhibir específicamente MALT1. La tioridazina (nombre comercial *Mellaril*) está todavía disponible comercialmente, pero su prescripción se reserva al tratamiento de pacientes esquizofrénicos, que no responden a otros fármacos antipsicóticos. La tioridazina se considera también que es beneficiosa para otras aplicaciones médicas, ya que ejerce efectos tóxicos sobre diferentes líneas de células cancerosas.^{29,32} Sin embargo, los inventores no son conscientes de ninguna técnica anterior que muestre o indique que la tioridazina ejerce efectos tóxicos sobre una línea celular cancerosa que depende de la actividad proteolítica de MALT1. Además, se considera a la tioridazina como un fármaco candidato para el tratamiento de tuberculosis o malaria, pero el motivo de esta acción antimicrobiana y antiparasitaria se desconoce actualmente.^{33,34} La promazina (nombre comercial *Sparine*), que presentaba la toxicidad más débil sobre ABC-DLBCL dependiente de MALT1, se usa todavía para tratar el comportamiento inquieto.

Por tanto, los compuestos de fórmula (II), (III) y (IV) se usaban todos inicialmente en la técnica como fármaco antipsicótico. En los ejemplos adjuntos, se identificaron mepazina, tioridazina y promazina como tres inhibidores de molécula pequeña de MALT1. Según lo que mejor conocen los inventores, no se sabía que alguno de estos compuestos inhibiera la actividad de la proteasa MALT1. Los resultados ilustrados en los ejemplos de la invención muestran por primera vez que los compuestos de fórmula (II), (III) y (IV) pueden usarse para tratar un cáncer que

depende de la actividad proteolítica de la proteasa MALT1.

Según una realización preferida de la invención, el cáncer que depende de la actividad proteolítica de la proteasa MALT1 es el subtipo de células B activadas de linfoma de células B grandes difuso o linfoma de MALT.

5 Tal como se ha descrito anteriormente en el presente documento, el linfoma de células B grandes difuso (DLBCL) es un tipo de linfoma agresivo. Un subtipo principal de DLBCL que se ha identificado basándose en su actividad genética es el subtipo de células B de linfoma de células B grandes difuso (ABC-DLBCL). Tal como se ha descrito anteriormente en el presente documento, Ferch *et al.* (2009), J. Exp. Med. 2006: 2313-2320 mostraron que las células de linfoma de células B grandes difuso (DLBCL) de tipo células B activadas (ABC) agresivo ensamblaban de manera constitutiva complejos de CARD11-BCL10-MALT1 (CBM) que procesan de manera continua y selectiva A20. 10 Además, la inhibición de la paracaspasa de MALT1 conduce a muerte de células de ABC-DLBCL y retraso del crecimiento. Por tanto, los ejemplos a continuación en el presente documento que muestran que los derivados de fenotiazinas mepazina, tioridazina y promazina inhiben específicamente MALT1 indican por primera vez que puede tratarse ABC-DLBL usando el compuesto de la invención.

15 Tal como se ha descrito anteriormente en el presente documento, el linfoma de MALT es un cáncer de los linfocitos de células B. La mayoría de los NHL comienzan en los ganglios linfáticos, pero el linfoma de MALT comienza en el tejido linfoide asociado a la mucosa (MALT). Los linfomas de MALT comienzan habitualmente en zonas del cuerpo en donde ha habido una infección o cuando una persona tiene un estado autoinmunitario que afecta a esa zona. La mayoría de los casos de linfoma de MALT que afectan al estómago están vinculados a infección por una bacteria denominada *Helicobacter pylori*. En otros sitios, también se sospecha de la estimulación inmunitaria crónica en la patogenicidad (por ejemplo, asociación entre enfermedades autoinmunitarias crónicas tales como síndrome de Sjögren y tiroiditis de Hashimoto, y linfoma de MALT de las glándulas salivales y el tiroides). Se han identificado tres translocaciones asociadas con linfoma de MALT; concretamente t(11;18)(q21;q21), que da lugar a un gen de fusión *API2-MLT*, t(1;14)(p22;q32) que desregula BCL10, y t(14;18)(q32;q21), que desregula MALT1. Se cree que las tres translocaciones activan la misma ruta, es decir la ruta de API2-MALT. Por tanto, los ejemplos a continuación en el presente documento que muestran que los derivados de fenotiazina mepazina, tioridazina y promazina inhiben específicamente MALT1 indican por primera vez que el linfoma de MALT puede tratarse usando el compuesto de la invención. 25

30 Según la presente invención, se han identificado derivados de fenotiazina (PD) como la primera clase de inhibidores de molécula pequeña que inhiben eficaz y selectivamente la actividad proteolítica de la proteasa MALT1 celular y recombinante. Tal como puede deducirse de los ejemplos, se obtuvo la mejor actividad inhibidora con mepazina, tioridazina y promazina. Se muestra que los tres PD interfieren con la actividad de MALT1 inducible o constitutiva a partir de células T activadas o a partir de células de ABC-DLBCL, respectivamente. Además, estos PD provocan una activación de células T alterada así como una viabilidad reducida selectivamente del subtipo de ABC de células de DLBCL, procesos que se ha mostrado que dependen críticamente de la actividad de MALT1.^{9,20,21} Por tanto, los datos celulares evidencian adicionalmente la eficacia de PD como inhibidores de MALT1 farmacológicos. 35

40 Se sometieron a prueba inicialmente diferentes condiciones de ensayo y los efectos de inhibidores de proteasa de amplio espectro para caracterizar la actividad de escisión de MALT1 de longitud completa recombinante en más detalle. De manera interesante, la actividad proteolítica de MALT1 se asemeja a metacaspasas de *Arabidopsis thaliana* AtMC4 y 9,⁵ resaltando que la homología estructural entre los dominios de paracaspasa y metacaspasa provoca propiedades de unión y escisión del sustrato similares. Puesto que MALT1 es la única paracaspasa humana con propiedades muy distintas en comparación con otras caspasas humanas, inhibidores específicos tal como se definen según la presente invención son claramente candidatos prometedores para la inactivación selectiva de su actividad oncogénica. La selectividad es crítica, ya que la alteración de la ejecución de la apoptosis mediante la inhibición de caspasas distintas de MALT1 desencadenaría probablemente efectos adversos que podrían no tolerarse para la terapia de linfomas. De hecho, todos los PD sometidos a prueba presentan una alta preferencia por MALT1 y no actúan sobre la caspasa iniciadora CASP8 y la caspasa ejecutora CASP3. Además, puesto que CASP8 se asocia con MALT1 y se requiere para la señalización de NF-κB en células T,²⁷ la aparente falta de inhibición de CASP8 por PD también subraya el requisito de actividad proteolítica de MALT1 para desencadenar una activación de células T óptima. La fuerte inhibición de la actividad de MALT1 celular incluso tras una incubación con PD relativamente corta indica claramente que las sustancias afectan directamente a la proteasa MALT1. Además, se da a conocer en el presente documento que la acción inhibidora de los compuestos inhibidores de MALT1 de la invención sobre la activación de células T indica un posible uso médico como inmunosupresores leves, por ejemplo, en el tratamiento de alergia y asma. 45 50

55 Por consiguiente, también se da a conocer en el presente documento un compuesto para su uso en el tratamiento de enfermedades inmunitarias dependientes de MALT1. Según una realización preferida del mismo, la enfermedad inmunitaria dependiente de MALT1 es una inflamación alérgica. También se describe en el presente documento un método de tratamiento de un cáncer que depende de la actividad proteolítica de la proteasa MALT1 en un sujeto, que comprende administrar una cantidad farmacéuticamente eficaz de un compuesto de la invención al sujeto. En este sentido, el cáncer que depende de la actividad proteolítica de la proteasa MALT1 es preferiblemente el subtipo de células B activadas de linfoma de células B grandes difuso o linfoma de MALT. Además, el sujeto es preferiblemente un mamífero y más preferiblemente un ser humano. 60

Además, se describe en el presente documento un método de tratamiento de una enfermedad inmunitaria dependiente de MALT1 en un sujeto, que comprende administrar una cantidad farmacéuticamente eficaz de un compuesto de la invención al sujeto. En este sentido, la enfermedad inmunitaria dependiente de MALT1 es preferiblemente una inflamación alérgica. La enfermedad inmunitaria dependiente de MALT1 puede ser también una enfermedad dirigida por células T en la que las respuestas de células T se contrarrestan por los compuestos tal como en el ejemplo 5. En este sentido, enfermedades inmunitarias dependientes de MALT1 pueden ser hipersensibilidad del sistema inmunitario o una inflamación crónica tal como alergia (tal como se mencionó) o asma. Además, la enfermedad inmunitaria dependiente de MALT1 puede ser una enfermedad autoinmunitaria, que incluye pero no se limita a enfermedades tales como esclerosis múltiple, enfermedades inflamatorias del intestino (por ejemplo, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa), lupus eritematoso, psoriasis, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, artritis reumatoide o artritis psoriásica. Además, el sujeto es preferiblemente un mamífero y más preferiblemente un ser humano.

Las realizaciones preferidas descritas anteriormente en el presente documento también se aplican a los métodos de tratamiento descritos en el presente documento.

Las figuras muestran:

Figura 1: Establecimiento del ensayo de escisión de MALT1 *in vitro* para examen de alto rendimiento (HTS). (A) Esquema del ensayo de proteasa MALT1. La liberación del fluoróforo AMC mediante la acción proteolítica de GSTMALT1 contra el péptido fluorogénico Ac-LRSR-AMC que contiene el sitio de escisión de MALT1 derivado de BCL10 da como resultado un aumento de la fluorescencia. (B) Cinética de la reacción de escisión de MALT1. Se incubó GSTMALT1 recombinante purificada a partir de expresión bacteriana durante 1 h a 30°C con 50 μ M de Ac-LRSR-AMC y se determinó la actividad proteolítica midiendo el aumento de la fluorescencia de AMC. Mientras que la MALT1 inactiva catalítica C453A no podía escindir el sustrato, la inhibición con 1 nM del péptido inhibidor Z-VRPR-FMK condujo a una disminución de \sim 50% de la actividad de MALT1. (C) MALT1 se inhibe por Z-VRPR-FMK. Cantidades crecientes del péptido condujeron a una pérdida total de actividad de MALT1. Para la evaluación de los datos, la fluorescencia relativa del control sin tratar se fijó al 100% y se calcularon los valores de pocillos tratados con inhibidor por consiguiente. (D) El inhibidor de pan-caspasa Ac-DEVD-CHO no era significativamente activo sobre MALT1 incluso a 200 μ M. (E) Caracterización enzimática de la paracaspasa de MALT1 usando diferentes inhibidores de proteasa. La actividad de MALT1 disminuyó mediante concentraciones comunes de los inhibidores de cisteína proteasa antipaina (1 μ M) y quimostatina (100 μ M), pero no mediante altas concentraciones de E-64 (100 μ M) o una baja concentración de leupeptina (1 μ M). El inhibidor de aspartil-proteasa pepstatina A (100 μ M), el inhibidor de serina proteasa aprotinina (5 μ g/ml) y el inhibidor de serina/cisteína proteasa TLCK (1 μ M) no tenían efectos sobre la actividad de MALT1. Se comparó el perfil inhibidor con las metacaspasas de *Arabidopsis* AtMC4 y AtMC9 (véase la figura 9). Los gráficos muestran la media de al menos tres experimentos independientes y las barras de error indican la DE.

Figura 2: Derivados de fenotiazina identificados mediante HTS inhiben la actividad de MALT1. (A) Estructuras químicas de PD identificados como posibles inhibidores de MALT1. Compuesto A (mepazina; acetato de 10-[(1-metil-3-piperidinil)metil]-10H-fenotiazina), B (2-clorofenotiazina) y C ([2-(3-isobutoxi-10H-fenotiazin-10-il)etil]dimetilamina) que son derivados de fenotiazina (PD) y compuesto D, un PD estructural relacionado. (B) Mientras que el tratamiento con cantidades crecientes de PD desde 5 hasta 50 μ M condujeron a una disminución dependiente de la dosis de la actividad de GSTMALT1, la acción enzimática de CASP8 no se redujo significativamente. (C) Inhibición de la actividad de GSTMALT1 con 1, 5 y 20 μ M de fenotiazina de una manera dependiente de la dosis. Los gráficos (en B) muestran un experimento representativo de dos o la media de al menos tres experimentos independientes (en C) y las barras de error indican la DE.

Figura 3: Inhibición de MALT1 selectiva de mepazina, tioridazina y promazina. (A) Estructuras moleculares de los tres compuestos inhibidores. Los tres llevan una cadena lateral hidrófoba corta en el nitrógeno con una separación y composición atómica similar. (B) Curvas de respuesta a la dosis y valores de CI50 para mepazina, tioridazina y promazina. (C) La mepazina actúa como inhibidor de MALT1 no competitivo. Se determinó la cinética de Michaelis-Menten aumentando la concentración de sustrato de LRSR-AMC en ausencia o presencia de mepazina 1 μ M. La mepazina reduce la V_{MAX} pero no la K_M de MALT1. (D) La mepazina actúa como inhibidor de MALT1 reversible. Se trató GSTMALT1 acoplada a perlas de glutatión-Sepharose con mepazina (10, 20 ó 50 μ M) durante 30 min. Se sometió a ensayo la actividad de MALT1 tras lavar las perlas durante 0, 3 ó 6 veces antes de que comenzara la reacción de escisión. (E) PD son inhibidores de MALT1 selectivos y no pueden inhibir significativamente la actividad de CASP3 y 8 hasta concentraciones de 50 μ M. Los datos representan el promedio de al menos tres experimentos independientes y las barras de error indican la DE.

Figura 4: Mepazina y tioridazina mediaban en la inhibición de MALT1 conduciendo a activación de células T alterada en células T CD4⁺ de ratón primarias, PBMC humanas y células T Jurkat. (A) Células T Jurkat se dejaron sin tratar o se incubaron durante 3 h con 10 μ M de mepazina o tioridazina y se dejaron sin estimular o se estimularon durante 15, 30, 60, 90 y 120 minutos con anticuerpo anti-CD3/CD28. La adición de mepazina y tioridazina condujo a una fuerte disminución de la activación de la actividad de MALT1 celular. (B) El tratamiento de células T Jurkat con mepazina y tioridazina previno el estímulo y la escisión dependiente de MALT1 de RelB de una manera dependiente

de la dosis. Se trataron células T Jurkat con o bien disolvente o bien 2, 5, 10 ó 20 μM de mepazina o tioridazina durante 4 h y 1 h MG132 para estabilizar el fragmento de escisión de RelB (RelB Δ). Se estimularon las células con P/I durante 30 min. Se analizaron RelB y RelB Δ mediante inmunotransferencia de tipo Western. Las inmunotransferencias muestran uno representativo de al menos tres experimentos independientes. (C) Para analizar el impacto inhibitor del PD sobre la activación de células T, se midió la secreción de IL-2 de las células T Jurkat mediante ELISA tras la estimulación con P/I o anticuerpo anti-CD3/CD28 durante 20 h en presencia o ausencia de mepazina o tioridazina 5 y 10 μM . Ambos compuestos condujeron a niveles de IL-2 extracelulares disminuidos tras la activación de células T. (D) Impacto de los compuestos de PD sobre la activación de células T CD4⁺ murinas primarias. Se usó PCR cuantitativa para determinar los niveles de ARNm de IL-2 tras 3 h de pretratamiento con mepazina o tioridazina e inducción con anticuerpo anti-CD3/CD28 durante 4 h. Los niveles de ARNm de IL-2 estaban significativamente reducidos en células tratadas con compuestos en comparación con células de control tratadas con disolvente. En consecuencia, el tratamiento de las células con ambos compuestos y la posterior activación de células T con anticuerpos anti-CD3/CD28 durante 20 h dio como resultado niveles inferiores de IL-2 secretada. Los gráficos (en B-D) muestran la media de al menos tres experimentos independientes. La barras de error indican la DE. (E) PBMC humanas primarias de dos donantes se sometieron a 5 y 10 μM de mepazina y tioridazina durante 3 h antes de la inducción con anticuerpos anti-CD3/CD28 durante 20 h. En todos los donantes, los niveles de IL-2 extracelular se reducen de manera dependiente de la dosis en presencia de ambos compuestos.

Figura 5: El tratamiento con PD altera la actividad de MALT1 y una escisión de sustrato posterior en células de ABC-DLBCL. (A) Se analizó la actividad de MALT1 celular en DLBCL tras 4 h de incubación con mepazina y tioridazina. Se aisló MALT1 por medio de precipitación basada en anticuerpos y se determinó su actividad proteolítica en un lector de placas que detecta la emisión de fluorescencia de fluoróforos de AMC liberados. Ambos compuestos inhibían la actividad de la proteasa MALT1 a partir de células de ABCDLBCL de una manera dependiente de la dosis con variaciones dependiendo de la línea celular o PD. Los gráficos muestran la media de al menos tres experimentos independientes y las barras de error indican la DE. (B) El tratamiento de células de DLBCL con mepazina y tioridazina pudo prevenir la escisión dependiente de MALT1 constitutiva de BCL10 de una manera dependiente de la dosis. Se trataron las células con diferentes dosis de compuestos durante 20 h y se analizó la presencia de BCL10 y el producto de escisión BCL10 Δ 5 por medio de inmunotransferencia de tipo Western. Los datos son representativos de al menos tres experimentos independientes.

Figura 6: El tratamiento con mepazina altera la unión y expresión del gen diana de NF- κ B en células de ABC-DLBCL. (A) Se trataron células de ABC-DLBCL con 10 y 20 μM de mepazina durante 20 h y posteriormente se analizaron para determinar la unión a ADN de NF- κ B mediante EMSA. En las cuatro líneas celulares, la unión al gen diana de NF- κ B estaba alterada. El tratamiento con mepazina disminuyó en consecuencia los niveles de proteína de las dianas de NF- κ B antiapoptóticas BCL-XL y c-FLIP-L. Los datos son representativos de tres experimentos independientes. (B) Para determinar el efecto sobre la expresión del gen diana de NF- κ B, se trataron células de control de ABC- y GCB-DLBCL con mepazina durante 20 h y los niveles de las citocinas secretadas de manera constitutiva IL-6 e IL-10 se analizaron por medio de ELISA. El tratamiento de las células dio como resultado una disminución de ~50% de la secreción de IL-6 e IL-10 en líneas celulares de ABC. Para explicar las drásticas variaciones en la secreción de IL-6 e IL-10 celular en las líneas celulares individuales, las cantidades de IL se ilustran con dos escalas diferentes. Los gráficos muestran la media de al menos tres experimentos independientes y las barras de error indican la DE.

Figura 7: Los PD son tóxicos selectivamente para células de ABC-DLBCL. (A) a (D) Para someter a prueba el efecto de los PD sobre la viabilidad de las células de ABC-DLBCL, se trataron cuatro líneas celulares de ABC diferentes y las tres líneas celulares de GCB-DLBCL BJAB, Su-DHL-6 y Su-DHL-4 como células de control con las concentraciones indicadas de mepazina o tioridazina (tratamiento individual). Posteriormente se analizó la viabilidad de las células tras dos días con una prueba de citotoxicidad de MTT (A y C) o tras cuatro días mediante recuento celular (B y D). Ambos compuestos pudieron promover una disminución en la viabilidad celular en líneas celulares de ABC-DLBCL, sin afectar significativamente a las células de GCB-DLBCL. (E) Análisis de la apoptosis en líneas celulares de ABC-DLBCL tras el tratamiento con mepazina. Se trataron cinco líneas celulares de ABC-DLBCL y dos de GCB-DLBCL durante cinco días con mepazina 15 μM . Se identificaron células apoptóticas mediante análisis de FACS como células positivas para anexinaV-PE y negativas para 7-AAD. Mientras que la apoptosis no aumentó en líneas celulares de control de GCB-DLBCL, se detectó un incremento de la población de células apoptóticas que oscila entre el 10% y el 25% en todas las líneas celulares de ABC-DLBCL. Los datos (en B y D) son la media tres experimentos independientes. Los gráficos (en A, C y E) muestran la media de al menos tres experimentos independientes y las barras de error indican la DE.

Figura 8: Mepazina y tioridazina interfieren con el crecimiento e inducen apoptosis en la línea celular de ABC-DLBCL OCI-Ly10 *in vivo*. (A) Se llevó a cabo el trasplante de células OCI-Ly10 o Su-DHL-6 resuspendidas en matrigel (BD) en los costados de ratones NOD.Cg-Prkdc^{scid} Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ (NSG) el día 0. Se determinó el tamaño tumoral mediante medición con un calibre. La administración intraperitoneal de disolvente, mepazina (300 $\mu\text{g}/\text{d}$) o tioridazina (400 $\mu\text{g}/\text{d}$) en 3 ratones respectivos de cada grupo se inició 24 h tras el trasplante y se administraron de manera continua cada 24 h durante todo el periodo de tratamiento. Ambos PD alteran selectivamente el crecimiento de la línea celular de ABC-DLBCL OCI-Ly10. Se realizó análisis estadístico usando una prueba de anova de dos vías dando como resultado valores de p altamente significativos que son < 0,0001 desde el día 16 hasta 22. (B) Las

fenotiazinas potencian la apoptosis en células OCI-Ly10, pero no Su-DHL-6 *in vivo*. Se determinó la apoptosis sobre secciones tumorales mediante tinción con TUNEL tras 22 días de tratamiento. Las imágenes muestran la tinción de secciones tumorales representativas. (C) Mepazina y tioridazina inhiben la escisión de RelB en tumores de OCI-Ly10. Se detectaron la expresión de RelB y el producto de escisión dependiente de MALT1 RelB Δ en extractos de muestras de tumor de OCI-Ly10 mediante inmunotransferencia de tipo Western tras 22 días. La inmunotransferencia muestra resultados de ratones tratados con disolvente, mepazina o tioridazina, presentando tres muestras independientes para cada uno.

Figura 9: El perfil inhibitor de MALT1 implica una alta similitud con metacaspasas de *Arabidopsis*. Similar a AtMC4 y AtMC9, ni 100 μ M del inhibidor de aspartil proteasa pepstatina A ni el inhibidor de serina proteasa aprotinina (5 μ g/ml) pudieron inhibir la actividad proteolítica de MALT1. Quimostatina (100 μ M) y antipaina (1 μ M) pudieron inhibir fuertemente MALT1 y las metacaspasas, leupeptina (1 μ M) tuvo un efecto más fuerte sobre AtMC4/9 y aunque el inhibidor de cisteína proteasa E-64 no inhibe MALT1, tenía efectos leves sobre ambas metacaspasas. Aunque TLCK (1 μ M) tenía un ligero impacto sobre metacaspasas, la actividad de MALT1 no se vio afectada. Dosis altas (100 μ M) de inhibidores de caspasa de tetrapéptido DEVD no inhibieron MALT1 o AtMC4/9.

Figura 10: Parámetros para HTS de MALT1. En el examen primario, se sometieron a prueba ~18.000 moléculas pequeñas de la biblioteca de diversidad ChemBioNet con una concentración final de 10 μ M frente a 170 nM de GSTMALT1 en un formato de 384 pocillos. Los 300 aciertos resultantes con el mejor potencial inhibitor se validaron adicionalmente en ensayos secundarios usando diferentes dosis de desde 5 hasta 50 μ M. Los 15 aciertos secundarios se identificaron correspondiendo al -0,08% de la biblioteca original.

Figura 11: (A) Establecimiento del ensayo de CASP8 proteolítico. Se sometieron a prueba diferentes cantidades CASP8 recombinante activa (0,25, 0,5 y 1 μ g) con 50 μ M del sustrato de caspasa Ac-DEVD-AMC. Se determinó la actividad enzimática según el ensayo de GSTMALT1. Para analizar el impacto inhibitor de los PD sobre CASP8, se usaron 250 pg. Los datos son representativos de dos experimentos independientes. (B) La actividad de CASP8 contra Ac-DEVD-AMC en presencia de Ac-DEVD-CHO dio como resultado una disminución casi total de la actividad enzimática a una concentración de 50 pM. Los gráficos muestran la media de tres experimentos independientes. Las barras de error indican la DE.

Figura 12: (A) La promazina inhibe la actividad de MALT1 celular. La actividad de MALT1 constitutiva en ABC-DLBCL se reduce tras 4 h de tratamiento con promazina de las células. (B) y (C) La promazina altera la viabilidad de células de ABC-DLBCL. Coherente con los resultados obtenidos en el ensayo de escisión de MALT1 celular, la promazina tuvo los efectos más leves sobre la viabilidad de células de ABC-DLBCL. (D) y (E) La prometazina no activa sobre Malt1 no afecta a la viabilidad de ABC-DLBCL. Se trataron líneas celulares de ABC- y GCB-DLBCL durante 4 días con 10 y 20 μ M de prometazina, que no alteraba significativamente la viabilidad de ambos subgrupos de DLBCL. Los datos son la media de tres experimentos independientes. Las barras de error (en A, B y D) indican la DE.

Figura 13: Dilucidación de la relación de estructura-actividad (SAR) de derivados de fenotiazina y MALT1. Se muestran las estructuras químicas y el potencial inhibitor de MALT1 de diferentes fenotiazinas diseñadas mediante química médica. Estas estructuras químicas se encuentran dentro del ámbito de la fórmula general (I) mostrada anteriormente en el presente documento. Esto demuestra que compuestos según la fórmula general (I) son potentes inhibidores de MALT1.

Los ejemplos ilustran la invención.

Ejemplo 1 - Procedimientos experimentales

Cultivo celular y reactivos

Se cultivaron líneas celulares de DLBCL en medio RPMI 1640 (Invitrogen) complementado con FCS al 20% y 100 U/ml de penicilina/estreptomicina excepto la línea de ABC OCI-Ly10 que se cultivó en IMDM (Invitrogen) con plasma humano al 20%, penicilina/estreptomicina y β -mercaptoetanol 50 μ M. Se cultivaron células T Jurkat según las líneas celulares de DLBCL con FCS al 10%. El aislamiento de células mononucleares humanas (PBMC) a partir de sangre completa tratada con heparina (1000 U/ml) se realizó con Lymphoprep según el fabricante (Axis-shield). El aislamiento de células T CD4⁺ murinas se realizó con Dynabeads específicas de células T (Invitrogen). Se cultivaron células primarias en medios de Jurkat que contenían β -mercaptoetanol 50 μ M. La estimulación de células T Jurkat, PBMC humanas y células T CD4⁺ de ratón se inició o bien mediante la adición de 12-miristato-13-acetato de forbol (PMA; 200 ng/ml) y ionomicina (I; 300 ng/ml) (ambos de Calbiochem) o bien mediante anticuerpos frente a hCD3/hCD28 y mlgG1/mlgG2a (BD Biosciences). Z-VRPR-FMK (Alexis Biochemicals), acetato de mepazina (Chembridge), clorhidrato de promazina, clorhidrato de tioridazina, clorhidrato de prometazina (todos de Sigma Aldrich) y todos los demás PD sometidos a prueba (Chembridge o Sigma) se disolvieron en DMSO.

Ensayo de escisión de MALT1 recombinante y endógena

Se produjeron proteínas GSTMALT1 en bacterias de *E. coli* BL21 RIL competentes. Se indujo la producción de

5 proteínas a una DO_{600} de 0,8 con 50 μM de isopropil- α -D-tiogalactopiranosido (IPTG) durante 16 h a 18°C. Se recogieron las bacterias y se lisaron mediante sonicación en tampón de lisis (HEPES 50 mM, pH 7,5, glicerol al 20%, Triton X-100 al 0,1%, ditiotreitól 1 mM, NaCl 150 mM, MgCl_2 2 mM, incluyendo inhibidores de proteasa). Se purificó GSTMALT1 por medio de un sistema de cromatografía de líquidos AKTA™ usando columnas FastTrap de glutatión (GE Healthcare). Para el ensayo de escisión en microplacas de 384 pocillos, se usaron 200 ng de proteína y 50 μM del sustrato derivado de BCL-10 Ac-LRSR-AMC. Tras 30 min de incubación a 30°C, se midió la fluorescencia del AMC escindido durante 1 h usando un lector de microplacas Synergy 2 (Biotek). Se expresó la actividad proteasa en unidades de fluorescencia relativa, en donde los controles tratados con DMSO se fijaron al 100% y la fluorescencia de los pocillos tratados con compuesto se calculó apropiadamente. Se sometió a ensayo la escisión de CASP3 (BioVision) y CASP8 (Cayman Chemical) recombinantes humanas por consiguiente frente a Ac-DEVD-AMC como sustrato y 50 y 250 pg de proteína, respectivamente. Para la proteasa MALT1 endógena, se dejaron sin tratar DLBCL o células T Jurkat (5×10^6 células), se trataron con inhibidor (4 h y 3 h, respectivamente) o P/I y CD3/CD28 y se lisaron en tampón de lisis a 4°C. Para la inmunoprecipitación, se añadieron 4 μl de anticuerpo anti-MALT1 (H-300, Santa Cruz Biotechnology) a 400 μl del lisado aclarado. Tras la incubación de 16 h a 4°C, se añadieron 15 μl de perlas de proteína G-Sepharose lavadas con PBS (Roche) y se incubaron adicionalmente las muestras durante 1 h. Se lavaron las perlas 3 veces con PBS, se resuspendieron en 40 μl de tampón de ensayo de escisión (MES 50 mM, pH 6,8, NaCl 150 mM, sacarosa al 10% [p/vol], CHAPS al 0,1% [p/vol], citrato de amonio 1 M, ditiotreitól 10 mM) y se transfirieron a una placa de micropocillos de 384 pocillos. Se añadió el sustrato peptídico Ac-LRSR-AMC hasta una concentración final de 20 μM y se midió la actividad según el ensayo de GSTMALT1 recombinante. Todos los inhibidores usados se disolvieron en DMSO y se trataron las células de control con cantidades apropiadas del disolvente.

Examen de alto rendimiento (HTS) para inhibidores de molécula pequeña de MALT1

Se usó el ensayo de escisión de MALT1 para examinar ~18000 moléculas pequeñas de la biblioteca ChemBioNet en el Instituto Leibniz de farmacología molecular (FMP) en Berlín.³⁵ El volumen de examen fue de 11 μl en una placa de ensayo sin unión de 384 pocillos (Corning) con GSTMALT1 170 nmol frente a una concentración final de 10 μM de compuestos. Se realizó el ensayo con 50 μM de sustrato de Ac-LRSR-AMC durante 20 min a 30°C. Como control negativo, se usó el mutante de MALT1 recombinante C453A, como control de inhibición del medio 1 nM del péptido Z-VRPR-FMK. Se confirmó la calidad del ensayo mediante determinación del factor Z convencional (~ 0,7). Para la validación de aciertos, los 300 compuestos con el mejor impacto inhibidor a partir del examen primario se sometieron a ensayo dos veces con 8 concentraciones diferentes de compuestos que oscilan entre 0,7 y 90,9 μM .

Cuantificación de ARN mediante RT-PCR en tiempo real

Se realizó la síntesis de ADNc con muestras de ARN libres de ADN (mini kit RNeasy, Qiagen) mediante transcripción inversa con hexámeros al azar y Superscript II (Invitrogen) según el protocolo del fabricante. Se realizó PCR en tiempo real usando la mezcla de PCR LC 480 SybrGreen (Roche) en un sistema LC 480 Lightcycler (Roche). Se logró la cuantificación del ARN de citocinas mediante normalización a un gen de mantenimiento de β -actina. Se calculó la razón de expresión relativa según Pfaffl 2001. Se usaron los siguientes cebadores: mL-2 directo 5'-GAGTGCCAATTTCGATGATGAG-3' (SEQ ID NO: 1); mL-2 inverso 5'-AGGGCTTGTTGAGATGATGC-3' (SEQ ID NO: 2); m β -actina directo 5'-CCTCTATGCCAACACAG TGC3' (SEQ ID NO: 3); m β -actina inverso 5'-GTACTCCTGCTTGCTGATCC-3' (SEQ ID NO: 4).³⁶

Ensayo de desplazamiento de movilidad electroforética (EMSA), inmunotransferencia de tipo Western y ELISA

Se realizaron extractos celulares completos, inmunotransferencia de tipo Western y EMSA tal como se describió previamente.⁹ Los anticuerpos usados fueron BCL-XL (Cell signaling), MALT1 (H300, B12), BCL10 (H197), c-FLIP (Alexis Biochemicals) y β -actina (I-19). Se visualizó la escisión de BCL10 tras 20 h de tratamiento de células de linfoma de células B grandes difuso con diferentes dosis de PD. Se realizaron ELISA de IL-2 humana y murina (BenderMed Systems) según el protocolo del fabricante tras el pretratamiento de células T Jurkat y las células humanas y de ratón primarias durante 3 h con mepazina y tioridazina y la posterior estimulación de receptores de células T durante 20 h. Se realizaron ELISA de IL-6 e IL-10 (Immunotools) tras 20 h de incubación con inhibidor en líneas celulares de DLBCL.

Ensayos de viabilidad, MTT y apoptosis

Se analizó la viabilidad de líneas celulares de DLBCL con un ensayo de recuento celular de células teñidas con azul tripano tras cuatro días y mediante la prueba de citotoxicidad de MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio) tras dos días de tratamiento con inhibidor dependiente de la dosis en comparación con células de control tratadas con DMSO. Se midió la reducción dependiente de células de MTT a formazán a $\lambda = 450 \text{ nm}$ con un espectrómetro de microplacas μQuant (Biotek). Se determinaron las tasas de apoptosis con tinción con PE-anexina V de células 7AAD⁻ (BD PJurkat harmingen) mediante análisis de FACS (LSRII, BD) tras cinco días de tratamiento con compuestos. Se analizaron los datos usando el software FlowJo (Treestar).

Ejemplo 2 – La paracaspasa de MALT1 presenta actividad proteolítica que es distinta de caspasas humanas

Para examinar compuestos de peso molecular pequeño que pueden inhibir la actividad de la proteasa MALT1, se purificó GSTMALT1 recombinante a partir de *E. coli* para establecer un ensayo de escisión de proteasas *in vitro* adecuado para examen de alto rendimiento (HTS). Se incubó GSTMALT1 durante 1 h a 30°C en presencia de 50 µM del sustrato de tetrapéptido Ac-LRSR-AMC, que se deriva del sitio de escisión de MALT1 en el extremo C-terminal de BCL10.⁷ Se determinó la actividad proteolítica midiendo el aumento de fluorescencia, que se emite tras la escisión y la liberación acompañante del fluoróforo AMC (figura 1A y B). Es evidente la escisión catalizada por MALT1 de Ac-LRSR-AMC a partir de un robusto aumento de la intensidad de fluorescencia a lo largo del tiempo. La mutación de la cisteína conservada (C453A) en el dominio de paracaspasa de MALT1 (isoforma B) suprimió completamente la actividad catalítica de MALT1 (figura 1A). Similar a metacaspasas específicas de arginina-lisina, la proteasa MALT1 tiene una alta preferencia por la escisión tras un residuo de arginina. Coherente con este Z-VRPR-FMK, que se diseñó inicialmente como un péptido antagonista de metacaspasa,²⁴ también bloqueó completamente la actividad de escisión de MALT1 a concentraciones nanomolares bajas, resaltando la alta similitud de la paracaspasa con metacaspasas vegetales (figura 1B y C). En cambio, el potente péptido inhibidor de caspasa Ac-DEVD-CHO, que bloqueó eficazmente la actividad de CASP8 incluso a concentraciones picomolares (figura 11), sólo redujo marginalmente la actividad de MALT1 incluso cuando se usó a una concentración de 200 µM (figura 1D).

La distinta especificidad de sustrato de las caspasas y MALT1 resalta el potencial de identificar inhibidores de molécula pequeña que interfieren con la señalización favorable a la supervivencia dependiente de MALT1^{20,21} sin alterar la maquinaria apoptótica dependiente de caspasas. Puesto que la paracaspasa de MALT1 es el único homólogo de mamífero de metacaspasas vegetales,⁴ se caracterizaron adicionalmente la actividad enzimática de MALT1 y las preferencias de sustrato. Se sometió a ensayo la escisión de MALT1 en presencia de inhibidores de proteasa (figura 1E) y se compararon los efectos con los perfiles inhibidores obtenidos para las metacaspasas vegetales AtMC4 y AtMC9 tal como se resume en la figura 9.⁵ Al igual que AtMC4 y AtMC9, ni el inhibidor de aspartil proteasa pepstatina A (100 µM) ni el inhibidor de serina proteasa aprotinina (5 µg/ml) inhibieron fuertemente la actividad de MALT1. Mientras que el inhibidor de serina/cisteína proteasa de amplio espectro quimostatina (100 µM) y antipain (1 µM) inhibieron MALT1 y AtMC4/9 en un grado similar, leupeptina (1 µM) actuaba más fuertemente sobre metacaspasas vegetales. De manera interesante, el inhibidor de cisteína proteasa E-64 (100 µM) que se mostró que tenía un efecto leve sobre AtMC4 pero no sobre AtMC9, no inhibe MALT1. En cambio, el inhibidor de serina/cisteína proteasa TLCK (1 µM) que inhibe fuertemente AtMC9 y mucho más débilmente AtMC4, afectaba sólo levemente a la actividad de MALT1. Tal como se esperaba, los inhibidores de caspasa de tetrapéptido no inhibieron la actividad de MALT1 o AtMC4/9. Tomados conjuntamente, la especificidad de sustrato y el perfil inhibidor indican una alta similitud entre la paracaspasa de MALT1 y las metacaspasas vegetales AtMC4/9.

Ejemplo 3 - Identificación de derivados de fenotiazina como inhibidores selectivos de la proteasa MALT1

Para identificar inhibidores de molécula pequeña para la proteasa MALT1, se examinaron aproximadamente 18.000 compuestos de la colección ChemBioNet usando un formato de ensayo tal como se representa en la figura 10. El examen primario se realizó midiendo el aumento de fluorescencia de AMC en un formato de 384 semipocillos a lo largo de un tiempo de ensayo de 20 min en presencia de 10 µM de cada compuesto. 300 aciertos primarios mostraron potencial inhibidor y se eligieron para la validación de aciertos secundaria que se realizó dos veces en el mismo formato con dosis crecientes que oscilan entre 0,7 y 90,9 µM de cada compuesto. La validación produjo 15 aciertos primarios correspondientes al -0,08% del examen primario.

Cuando se examinó la estructura de los 15 aciertos primarios, se observó que tres de los compuestos más eficaces y selectivos (figura 2A: compuesto A, B y C) son derivados de la fenotiazina tricíclica que contiene dos anillos de benceno externos unidos por un nitrógeno y un átomo de azufre en el anillo interno. También el núcleo heterocíclico encontrado en el inhibidor D presenta altas similitudes estructurales con la fenotiazina, al tiempo que el nitrógeno se reemplaza por carbono. Estos resultados iniciales sugirieron que determinados derivados de fenotiazina (PD) pueden actuar como inhibidores de MALT1. Para verificar la inhibición de MALT1 y para evaluar la especificidad, los cuatro PD identificados se sometieron a prueba para determinar la actividad de inhibición de MALT1 y CASP8. A 50 µM, las cuatro sustancias reducían la actividad de la proteasa MALT1 hasta menos del 10% de una manera dependiente de la dosis (figura 2B). En cambio, la actividad de CASP8 sólo se vio modestamente afectada a las concentraciones de inhibidor más altas de 50 µM, indicando que los cuatro PD actúan selectivamente sobre MALT1. El armazón de fenotiazina sin ninguna modificación se sometió a prueba también y se encontró que inhibe la actividad de MALT1 de una manera dependiente de la dosis (figura 2C). Notablemente, los resultados iniciales implicaban que sólo las modificaciones del compuesto A parecían mejorar significativamente el potencial inhibidor de la estructura principal de fenotiazina hacia MALT1. De manera interesante, el compuesto A corresponde al fármaco conocido mepazina (nombre comercial anterior *Pacatal*) que se había usado como tranquilizante.²⁵ Estos resultados sugerían que las fenotiazinas podrían ser candidatos prometedores como inhibidores de MALT1 selectivos.

Ejemplo 4 - Mepazina, tioridazina y promazina actúan como inhibidores potentes y selectivos de la paracaspasa de MALT1

Se obtuvieron mepazina así como otros 25 PD disponibles comercialmente para someter a prueba su potencial inhibidor. Mientras que la mayoría de los compuestos (12-26) no tenían o sólo tenían un potencial inhibidor muy débil (CI50 > 20 µM), 8 compuestos (4-11) inhibían la actividad de MALT1 con una CI50 de aproximadamente entre 5-

20 μM . Sólo tres PD tenían una CI_{50} por debajo de 5 μM . Por tanto, sólo un pequeño subconjunto de PD podía inhibir eficazmente MALT1. Los tres compuestos más potentes representan promazina, tioridazina y mepazina, este último inicialmente identificado en el examen (figura 3A). Para definir el potencial inhibitorio, se determinaron los valores de CI_{50} exactos para cada compuesto sobre GSTMALT1 de longitud completa (FL) recombinante y una proteína MALT1 truncada enzimáticamente activa que abarca los aminoácidos de los dominios de paracaspasa y de tipo Ig C-terminal (Ig3) desde 325 hasta 760 (figura 3B). La mepazina era la más eficaz en la inhibición de GSTMALT1 FL y GSTMALT1 325-760 con valores de CI_{50} de 0,83 y 0,42 μM , respectivamente. También la tioridazina y promazina mostraron una inhibición dependiente de la dosis de GSTMALT1 FL y GSTMALT1 325-760, pero los valores de CI_{50} eran aproximadamente 4 (GSTMALT1 FL) u 8 (GSTMALT1 325-760) veces inferiores en comparación con mepazina. En cambio, la prometazina, un fármaco que todavía se usa en el tratamiento de determinados trastornos psiquiátricos y altamente relacionados con los tres PD activos, no provocó ninguna inhibición de MALT1 significativa a concentraciones de hasta 20 μM . Estos resultados indican un alto grado de especificidad de la inhibición de MALT incluso dentro del grupo de PD.

Para someter a prueba el modo de acción, se determinó el efecto de la mepazina en la cinética de Michaelis-Menten basándose en el ensayo de escisión de MALT1 fluorogénico (figura 3C). GSTMALT1 FL presentaba una V_{MAX} de ~ 170 UFR/min y se calculó la constante de Michaelis-Menten (K_{M}) a ~ 48 μM , que está en el intervalo de lo que se ha determinado previamente (Hachmann *et al.*, 2012). La adición de mepazina a una concentración de alrededor de la CI_{50} (1 μM) disminuyó fuertemente la V_{MAX} hasta ~ 58 UFR/min mientras que la K_{M} de 48 μM no se alteró. La mepazina y otras fenotiazinas no contienen grupos reactivos. Sin embargo, para confirmar que la mepazina actúa como inhibidor reversible no covalente, se realizaron experimentos de eliminación por lavado usando GSTMALT1 unida a perlas de glutatión-Sepharose (figura 3D). De nuevo, la mepazina inhibió la actividad de escisión de MALT1, pero varios ciclos de lavado de las perlas de GSTMALT1 dieron como resultado una pérdida completa de la inhibición incluso a la concentración más alta del compuesto (50 μM). Por tanto, los efectos de la mepazina sobre la actividad enzimática de MALT1 revelaron un modo no competitivo y reversible de inhibición de MALT1 mediante fenotiazinas.

A continuación, se sometieron a ensayo los efectos de PD sobre las caspasas, que son estructuralmente los análogos más cercanos de MALT1 en mamíferos (Uren *et al.*, 2000). De manera importante, los tres PD no inhibieron significativamente la actividad de CASP3 o CASP8, incluso a concentraciones de hasta 50 μM (figura 3E), lo que refleja la selectividad de los compuestos como inhibidores de MALT1.

Ejemplo 5 – Las fenotiazinas inhiben la actividad de MALT1 e inducción de IL-2 en células T

En condiciones fisiológicas, se ha mostrado que la proteasa MALT1 contribuye a respuestas de células T. La mutación del residuo de cisteína catalítico en la cavidad activa de MALT1 impide la producción de IL-2 óptima en respuesta a la coestimulación con anticuerpos anti-CD3/CD28 (Duwel *et al.*, 2009). Por tanto, se determinaron los efectos de PD sobre la actividad de MALT1 y la producción de IL-2 en células T (figura 4). Se realizó un ensayo de escisión de MALT1 tras la inmunoprecipitación (IP) de la proteína a partir de células T Jurkat (figura 4A). Las células se dejaron sin tratar o se incubaron durante 3 h con 10 μM de mepazina o tioridazina y posteriormente se dejaron sin estimular o se estimularon con anticuerpos anti-CD3/CD28. La actividad de la proteasa MALT1 era casi indetectable en ausencia de estimulación y alcanzó un pico a los 30-60 min tras el tratamiento con CD3/CD28. La adición de o bien mepazina o bien tioridazina dio como resultado una fuerte reducción de la actividad de la proteasa MALT1 en células T Jurkat estimuladas en todos los puntos de tiempo (figura 4A). Para confirmar que ambas fenotiazinas inhibían la actividad de MALT1 dentro de las células, se monitorizó la escisión por MALT1 de RelB tras la estimulación de células T Jurkat (figura 4B). Pudo detectarse el producto de escisión de RelB Δ cuando se incubaron células T Jurkat con el inhibidor del proteosoma MG132 antes de la estimulación con P/I para impedir la degradación del truncamiento de RelB inestable (Hailfinger *et al.*, 2011). Tal como resulta evidente a partir de los niveles disminuidos de RelB Δ y una expresión aumentada paralela de RelB de longitud completa, la mepazina y tioridazina alteraron la escisión de RelB de una manera dependiente de la dosis (figura 4B). Similar a la situación con MALT1 recombinante, la mepazina era más eficaz en la inhibición de la actividad de escisión de MALT1 celular y redujo significativamente la aparición de RelB Δ entre 2-5 μM , mientras que la tioridazina era eficaz por encima de 5 μM . Para determinar los efectos de la inhibición de MALT1 por PD sobre la activación de células T, se midieron las cantidades de IL-2 secretadas mediante ELISA tras la estimulación con P/I o anticuerpos anti-CD3/CD28 de células T Jurkat en presencia o ausencia de mepazina o tioridazina. Ambos compuestos condujeron a una disminución de los niveles de IL-2 en los medios de células tratadas con PD tras la activación de células T (figura 4C). Para verificar que el potencial inhibitorio de PD es también detectable en células T primarias, se aislaron y purificaron células T Th1 positivas para CD4 murinas, y se midieron la inducción de ARNm de IL-2 mediante qPCR y los niveles de proteína mediante ELISA tras coligamiento con anticuerpos anti-CD3/CD28 en presencia o ausencia de 5 y 10 μM de mepazina o tioridazina (figura 4D). Ambos, inducción de ARNm de y expresión de proteínas, se redujeron de una manera dependiente de la dosis. Finalmente, se usaron PBMC humanas primarias de tres donantes para evaluar si la inhibición de la actividad de MALT1 también promueve una disminución de la producción de IL-2 en células T humanas primarias (figura 4E). Congruente con los resultados previos, el tratamiento con mepazina y tioridazina condujo a una disminución significativa de la secreción de IL-2 en PBMC de los tres donantes.

Ejemplo 6 – Las fenotiazinas inhiben la actividad de MALT1 y la inducción de genes diana de NF- κ B en células de

ABC DLBCL

Coincidiendo con una escisión constitutiva de los sustratos de MALT1 A20 y BCL10, se potenció la actividad de la proteasa MALT1 como un rasgo característico de todas las células de ABC-DLBCL tal como se mostró previamente.²⁶ Para determinar el efecto de las fenotiazinas sobre la actividad de MALT1 celular, se incubaron células de ABC-DLBCL durante 4 h con 5 ó 10 μ M de mepazina, tioridazina y promazina. Se realizó una IP con anticuerpo anti-MALT1 y se determinó la actividad de la proteasa MALT1 añadiendo el sustrato AC-LRSR-AMC a todos los precipitados. Los tres PD inhibieron la actividad de la proteasa MALT1 a partir de células de ABC-DLBCL de una manera dependiente de la dosis (figura 5A). Aun cuando la inhibición de la actividad de MALT1 celular varió dependiendo de las líneas celulares individuales y los compuestos, la mepazina tenía en general los efectos más fuertes y a 10 μ M condujo a una reducción de al menos el 75% de la actividad de MALT1 en todas las células de ABC-DLBCL. También la tioridazina inhibía la actividad de MALT1 en todas las líneas celulares de ABC-DLBCL. Sin embargo, mientras que tioridazina 10 μ M inhibió MALT1 en más del 80% en HBL1, U2932 y TMD8, sólo se observó una disminución de ~50% en OCI-Ly3 y OCI-Ly10. La promazina era el inhibidor más débil de la actividad de MALT1 celular.

A continuación, se ha evaluado si la inhibición de MALT1 mediante los dos compuestos más fuertes mepazina y tioridazina también prevendría la escisión celular del sustrato de MALT1 conocido BCL10 en células de ABC-DLBCL (figura 5B). MALT1 escinde los cinco aminoácidos más C-terminales de BCL10 dando como resultado un producto de escisión truncado (BCL10 Δ 5). Se trataron células de ABC-DLBCL durante 20 h con dosis crecientes de cada compuesto. De hecho, el tratamiento con mepazina o tioridazina impidió la detección de BCL10 Δ 5 de una manera dependiente de la dosis.

La actividad de MALT1 contribuye a la activación de NF- κ B óptima y selecciona como diana la expresión génica en células de ABC-DLBCL.^{20,21} Por tanto, se determinó si la mepazina, que afectaba de la manera más fuerte a la actividad de MALT1, también altera la unión a ADN de NF- κ B constitutiva y posteriormente la expresión del gen diana de NF- κ B en células de ABC-DLBCL (figura 6). Para este fin, se trataron células de DLBCL con 10 y 20 μ M de mepazina durante 20 horas y se analizó la unión a ADN de NF- κ B mediante EMSA (figura 6A). Concentraciones crecientes de mepazina dieron como resultado unión a ADN diana de NF- κ B reducida en células de ABC-DLBCL. De manera congruente, el tratamiento con mepazina condujo a una disminución dependiente de la dosis de proteínas BCL-XL y FLIP-L antiapoptóticas. Para monitorizar adicionalmente los efectos de mepazina sobre otros genes dependientes de NF- κ B, se trataron células de ABC- o GCB-DLBCL con mepazina 10 μ M durante 20 h y se determinó la secreción de las citocinas IL-6 e IL-10 mediante ELISA (figura 6B). Mientras que las células de GCB-DLBCL expresan bajas cantidades de IL-6 e IL-10, las células de ABC-DLBCL secretan ambas citocinas aunque a magnitudes variables, lo que refleja el grado de heterogeneidad entre las diferentes líneas celulares. De manera importante, la mepazina disminuyó la expresión de IL-6 e IL-10 solubles en todas las células de ABC-, pero no GCB-DLBCL, demostrando su efecto directo sobre la expresión de gen diana de NF- κ B.

Ejemplo 7 – Toxicidad selectiva e inducción de apoptosis mediante fenotiazinas en células de ABC DLBCL

Puesto que los tres PD inhiben eficazmente la actividad de la proteasa MALT1 *in vitro* e *in vivo*, se sometió a prueba su efecto sobre la viabilidad de células de ABC-DLBCL (figura 7). Como control, se usaron las tres líneas celulares de GCB-DLBCL BJAB, Su-DHL-6 y Su-DHL-4, que se mostró previamente que eran independientes de la actividad proteolítica de MALT1 para su crecimiento y supervivencia.²⁰ Se midieron los efectos citotóxicos mediante ensayos de MTT tras dos días de incubación (tratamiento individual) usando concentraciones crecientes de mepazina, tioridazina y promazina (figura 7A, C y figura 12B). Todos los compuestos promovieron una disminución de la viabilidad celular medida mediante la reacción de MTT en las células de ABC-DLBCL HBL1, OCI-Ly3, U2932 y TMD8, sin afectar significativamente a las células de GCB-DLBCL. Además, se determinó la viabilidad celular mediante recuento celular tras 4 días de tratamiento (figura 7B, D y figura 12C). Congruente con el ensayo de MTT, los PD también disminuyeron el número global de células de ABC-DLBCL viables. De nuevo, la viabilidad reducida era mucho más pronunciada en células de ABC-DLBCL, mientras que las células de GCB-DLBCL estaban solo ligeramente alteradas incluso a la concentración más alta de los compuestos. Coherente con los resultados obtenidos en el ensayo de escisión de MALT1 celular (figura 11A), la promazina tenía en general los efectos más leves sobre la viabilidad de las células de ABC-DLBCL. Para validar adicionalmente que la disminución en la viabilidad de las células de ABC-DLBCL tras la administración de distintos PD está vinculada a la inhibición de MALT1, se trataron células de DLBCL con prometazina (figura 12E). A pesar de su estrecha relación estructural con la promazina, la prometazina no inhibía la actividad de la proteasa MALT1 a concentraciones de hasta 20 μ M (figura 12D). De hecho, la prometazina no inhibió significativamente la viabilidad de las células de ABC o GCB-DLBCL tras 4 días de tratamiento, proporcionando evidencias adicionales de que los efectos celulares de la mepazina, tioridazina y promazina son dependientes de la inhibición de MALT1.

Finalmente, se ha determinado si la mepazina como inhibidor de MALT1 más potente afecta a la viabilidad de las células de ABCDLBCL potenciando la apoptosis (figura 7D). Para este fin, se trataron células de DLBCL durante cinco días con 15 μ M de mepazina y se identificaron células apoptóticas mediante FACS como células positivas para anexinaV-PE y negativas para 7-AAD. La mepazina provocó una tasa apoptótica potenciada en todas las células de ABC-DLBCL, mientras que la apoptosis no aumentó en las dos células de control de GCB-DLBCL. Por tanto, los PD

son selectivamente tóxicos para células de ABC-DLBCL y la toxicidad se debe parcialmente a apoptosis potenciada en las células de linfoma afectadas, revelando un posible uso de mepazina y compuestos estructuralmente relacionados para la terapia de ABC-DLBCL.

Ejemplo 8 - Mepazina y tioridazina impiden el crecimiento de ABC-DLBCL *in vivo*

5 La larga historia de la fenotiazina, especialmente tioridazina, en el tratamiento de trastornos psiquiátricos así como el conocimiento detallado de su farmacología y toxicidad pudieron facilitar un uso fuera de lo indicado para el tratamiento de pacientes diagnosticados con ABC-DLBCL. Por tanto, se determinó si la mepazina y tioridazina podían también ejercer efectos sobre el crecimiento de linfomas *in vivo* en un modelo de tumor xenogénico de DLBCL murino. Para este fin, se inyectaron la línea de células de ABC-DLBCL OCI-Ly10 y la línea de células de GCB-DLBCL Su-DHL-6 como xenoinjertos subcutáneos en ratones NOD/scid IL-2Rg^{null} (NSG) (figura 8A). Ambas líneas de células tumorales se injertaron simultáneamente en costados opuestos de ratones individuales. Comenzando un día tras la inyección, se trataron los ratones mediante administración intraperitoneal de disolvente u o bien mepazina (12 mg/kg) o bien tioridazina (16 mg/kg). En ratones tratados de control, crecieron tumores masivos a partir de ambas líneas de células de DLBCL en el plazo tres semanas del trasplante. La administración diaria de mepazina o tioridazina alteró fuertemente la expansión de la línea de células de ABC-DLBCL OCI-Ly10. En cambio, ambos PD no pudieron ejercer en absoluto ningún efecto inhibitorio sobre la progresión de la línea de células de GCBDLBCL Su-DHL-6 en los mismos animales.

Para determinar que mepazina y tioridazina actuaban directamente sobre las células tumorales, se determinó la inducción de apoptosis en el tejido tumoral. Se extirparon los tumores trasplantados al final del periodo de tratamiento y se visualizaron células apoptóticas mediante tinción con TUNEL sobre secciones del tejido tumoral (figura 8B). Congruente con la toxicidad *in vivo* selectiva, el tratamiento con mepazina o tioridazina aumentó el número de células apoptóticas en la línea de células de ABC-DLBCL sometida a xenoinjerto OCI-Ly10, mientras que no se observó inducción de apoptosis en la línea de células de GCB-DLBCL Su-DHL-6. Además, se alteró la escisión constitutiva del sustrato de MALT1 RelB tras el tratamiento con mepazina y tioridazina en muestras de tumores de OCI-Ly10 sometidos a xenoinjerto, revelando que también en ratones los compuestos actuaban de hecho inhibiendo la actividad de MALT1 en las células tumorales (figura 8C). Por tanto, el modelo tumoral murino proporcionó evidencias de que la inhibición de MALT1 mediante fenotiazinas destruye selectivamente DLBCL dependiente de MALT1 *in vivo* e indica un posible beneficio terapéutico del uso de los compuestos conocidos en la terapia de ABC-DLBCL.

30 **Bibliografía**

1. Thome M. Multifunctional roles for MALT1 in T-cell activation. *Nature reviews Immunology*. 2008; 8(7):495-500. Publicado previamente el 26/06/2008 como DOI 10.1038/nri2338.
2. Scheidereit C. I κ B kinase complexes: gateways to NF- κ B activation and transcription. *Oncogene*. 2006; 25(51):6685-6705. Publicado previamente el 31/10/2006 como DOI 10.1038/sj.onc.1209934.
- 35 3. Oeckinghaus A, Wegener E, Welteke V, *et al.* Malt1 ubiquitination triggers NF- κ B signaling upon T-cell activation. *The EMBO journal*. 2007; 26(22):4634-4645. Publicado previamente el 20/10/2007 como DOI 10.1038/sj.emboj.7601897.
4. Uren AG, O'Rourke K, Aravind LA, *et al.* Identification of paracaspases and metacaspases: two ancient families of caspase-like proteins, one of which plays a key role in MALT lymphoma. *Molecular cell*. 2000; 6(4):961-967. Publicado previamente el 25/11/2000 como DOI.
- 40 5. Vercammen D, van de Cotte B, De Jaeger G, *et al.* Type II metacaspases Atmc4 and Atmc9 of *Arabidopsis thaliana* cleave substrates after arginine and lysine. *The Journal of biological chemistry*. 2004; 279(44):45329-45336. Publicado previamente el 25/08/2004 como DOI 10.1074/jbc.M406329200.
6. Coornaert B, Baens M, Heyninck K, *et al.* T cell antigen receptor stimulation induces MALT1 paracaspase-mediated cleavage of the NF- κ B inhibitor A20. *Nature immunology*. 2008; 9(3):263-271. Publicado previamente el 29/01/2008 como DOI 10.1038/ni1561.
- 45 7. Rebeaud F, Hailfinger S, Posevitz-Fejfar A, *et al.* The proteolytic activity of the paracaspase MALT1 is key in T cell activation. *Nature immunology*. 2008; 9(3):272-281. Publicado previamente el 12/02/2008 como DOI 10.1038/ni1568.
8. Staal J, Driege Y, Bekaert T, *et al.* T-cell receptor-induced JNK activation requires proteolytic inactivation of CYLD by MALT1. *The EMBO journal*. 2011; 30(9):1742-1752. Publicado previamente el 31/03/2011 como DOI 10.1038/emboj.2011.85.
- 50 9. Duwel M, Welteke V, Oeckinghaus A, *et al.* A20 negatively regulates T cell receptor signaling to NF- κ B by cleaving Malt1 ubiquitin chains. *Journal of immunology*. 2009; 182(12):7718-7728. Publicado previamente el 06/06/2009 como DOI 10.4049/jimmunol.0803313.

10. Ngo VN, Davis RE, Lamy L, *et al.* A loss-of-function RNA interference screen for molecular targets in cancer. *Nature*. 2006; 441(7089):106-110. Publicado previamente el 31/03/2006 como DOI 10.1038/nature04687.
- 5 11. Alizadeh AA, Eisen MB, Davis RE, *et al.* Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature*. 2000; 403(6769):503-511. Publicado previamente el 17/02/2000 como DOI 10.1038/35000501.
12. Rosenwald A, Staudt LM. Gene expression profiling of diffuse large B-cell lymphoma. *Leukemia & lymphoma*. 2003; 44 Suppl 3:S41-47. Publicado previamente el 19/06/2004 como DOI.
- 10 13. Rosenwald A, Wright G, Chan WC, *et al.* The use of molecular profiling to predict survival after chemotherapy for diffuse large-B-cell lymphoma. *The New England journal of medicine*. 2002; 346(25):1937-1947. Publicado previamente el 21/06/2002 como DOI 10.1056/NEJMoa012914.
14. Savage KJ, Monti S, Kutok JL, *et al.* The molecular signature of mediastinal large B-cell lymphoma differs from that of other diffuse large B-cell lymphomas and shares features with classical Hodgkin lymphoma. *Blood*. 2003; 102(12):3871-3879. Publicado previamente el 23/08/2003 como DOI 10.1182/blood-2003-06-1841.
- 15 15. Wright G, Tan B, Rosenwald A, Hurt EH, Wiestner A, Staudt LM. A gene expression-based method to diagnose clinically distinct subgroups of diffuse large B cell lymphoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2003; 100(17):9991-9996. Publicado previamente el 06/08/2003 como DOI 10.1073/pnas.1732008100.
16. Staudt LM, Dave S. The biology of human lymphoid malignancies revealed by gene expression profiling. *Advances in immunology*. 2005; 87:163-208. Publicado previamente el 17/08/2005 como DOI 10.1016/S0065-2776(05)87005-1.
- 20 17. Davis RE, Brown KD, Siebenlist U, Staudt LM. Constitutive nuclear factor kappaB activity is required for survival of activated B cell-like diffuse large B cell lymphoma cells. *The Journal of experimental medicine*. 2001; 194(12):1861-1874. Publicado previamente el 19/12/2001 como DOI.
- 25 18. Lenz G, Davis RE, Ngo VN, *et al.* Oncogenic CARD11 mutations in human diffuse large B cell lymphoma. *Science*. 2008; 319(5870):1676-1679. Publicado previamente el 08/03/2008 como DOI 10.1126/science.1153629.
19. Davis RE, Ngo VN, Lenz G, *et al.* Chronic active B-cell-receptor signalling in diffuse large B-cell lymphoma. *Nature*. 2010; 463(7277):88-92. Publicado previamente el 08/01/2010 como DOI 10.1038/nature08638.
- 30 20. Ferch U, Kloo B, Gewies A, *et al.* Inhibition of MALT1 protease activity is selectively toxic for activated B cell-like diffuse large B cell lymphoma cells. *The Journal of experimental medicine*. 2009; 206(11):2313-2320. Publicado previamente el 21/10/2009 como DOI 10.1084/jem.20091167.
21. Hailfinger S, Lenz G, Ngo V, *et al.* Essential role of MALT1 protease activity in activated B cell-like diffuse large B-cell lymphoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2009; 106(47):19946-19951. Publicado previamente el 10/11/2009 como DOI 10.1073/pnas.0907511106.
- 35 22. Isaacson PG, Du MQ. MALT lymphoma: from morphology to molecules. *Nature reviews Cancer*. 2004; 4(8):644-653. Publicado previamente el 03/08/2004 como DOI 10.1038/nrc1409.
23. Rosebeck S, Madden L, Jin X, *et al.* Cleavage of NIK by the API2-MALT1 fusion oncoprotein leads to noncanonical NF-kappaB activation. *Science*. 2011; 331(6016):468-472. Publicado previamente el 29/01/2011 como DOI 10.1126/science. 1198946.
- 40 24. Vercaammen D, Belenghi B, van de Cotte B, *et al.* Serpin1 of *Arabidopsis thaliana* is a suicide inhibitor for metacaspase 9. *Journal of molecular biology*. 2006; 364(4):625-636. Publicado previamente el 10/10/2006 como DOI 10.1016/j.jmb.2006.09.010.
25. Whittier JR, Klein DF, Levine G, Weiss D. Mepazine (pacatal): clinical trial with placebo control and psychological study. *Psychopharmacologia*. 1960; 1:280-287. Publicado previamente el 23/06/1960 como DOI.
- 45 26. Kloo B, Nagel D, Pfeifer M, *et al.* Critical role of PI3K signaling for NF-kappaB-dependent survival in a subset of activated B-cell-like diffuse large B-cell lymphoma cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2011; 108(1):272-277. Publicado previamente el 22/12/2010 como DOI 10.1073/pnas.1008969108.
27. Su H, Bidere N, Zheng L, *et al.* Requirement for caspase-8 in NF-kappaB activation by antigen receptor. *Science*. 2005; 307(5714):1465-1468. Publicado previamente el 05/03/2005 como DOI 10.1126/science.1104765.
- 50 28. Choi JH, Yang YR, Lee SK, *et al.* Potential inhibition of PDK1/Akt signaling by phenothiazines suppresses cancer cell proliferation and survival. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2008; 1138:393-403. Publicado

previamente el 08/10/2008 como DOI 10.1196/annals.1414.041.

29. Rho SB, Kim BR, Kang S. A gene signature-based approach identifies thioridazine as an inhibitor of phosphatidylinositol-3'-kinase (PI3K)/AKT pathway in ovarian cancer cells. *Gynecologic oncology*. 2011; 120(1):121-127. Publicado previamente el 03/11/2010 como DOI 10.1016/j.ygyno.2010.10.003.
- 5 30. Seeman P, Lee T, Chau-Wong M, Wong K. Antipsychotic drug doses and neuroleptic/dopamine receptors. *Nature*. 1976; 261(5562):717-719. Publicado previamente el 24/06/1976 como DOI.
31. Sarwer-Foner GJ, Koranyi EK. The clinical investigation of paxal in open psychiatric settings. *Canadian Medical Association journal*. 1957; 77(5):450-459. Publicado previamente el 01/09/1957 como DOI.
- 10 32. Zhelev Z, Ohba H, Bakalova R, *et al*. Phenothiazines suppress proliferation and induce apoptosis in cultured leukemic cells without any influence on the viability of normal lymphocytes. *Phenothiazines and leukemia. Cancer chemotherapy and pharmacology*. 2004; 53(3):267-275. Publicado previamente el 10/12/2003 como DOI 10.1007/s00280-003-0738-1.
- 15 33. van Soolingen D, Hernandez-Pando R, Orozco H, *et al*. The antipsychotic thioridazine shows promising therapeutic activity in a mouse model of multidrug-resistant tuberculosis. *PloS one*. 2010; 5(9). Publicado previamente el 17/09/2010 como DOI 10.1371/journal.pone.0012640.
34. Weisman JL, Liou AP, Shelat AA, Cohen FE, Guy RK, DeRisi JL. Searching for new antimalarial therapeutics amongst known drugs. *Chemical biology & drug design*. 2006; 67(6):409-416. Publicado previamente el 03/08/2006 como DOI 10.1111/j.1747-0285.2006.00391.x.
- 20 35. Lisurek M, Rupp B, Wichard J, *et al*. Design of chemical libraries with potentially bioactive molecules applying a maximum common substructure concept. *Molecular diversity*. 2010; 14(2):401-408. Publicado previamente el 18/08/2009 como DOI 10.1007/s11030-009-9187-z.
36. Yin M, Zhang L, Sun XM, Mao LF, Pan J. Lack of apoE causes alteration of cytokines expression in young mice liver. *Molecular biology reports*. 2010; 37(4):2049-2054. Publicado previamente el 01/08/2009 como DOI 10.1007/s11033-009-9660-x.

25 **Lista de secuencias**

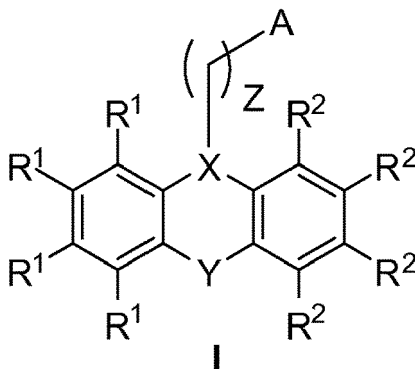
- <110> Helmholtz Zentrum München
- <120> Inhibición selectiva de la proteasa MALT1 mediante derivados de fenotiazina
- 30 <130> T1973 PCT
- <150> Documento EP 11 00 6346.8
- <151> 02-08-2011
- 35 <160> 4
- <170> PatentIn versión 3.4
- <210> 1
- 40 <211> 21
- <212> ADN
- <213> secuencia artificial
- <220>
- 45 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador directo mL-2"
- <400> 1
- gagtgccaat tcgatgatga g 21
- 50 <210> 2
- <211> 20
- <212> ADN
- <213> secuencia artificial
- 55 <220>
- <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador inverso mL-2"
- <400> 2

ES 2 716 276 T3

	agggctgtt gagatgatgc	20
5	<210> 3 <211> 20 <212> ADN <213> secuencia artificial	
10	<220> <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador directo mbeta-actina"	
	<400> 3 cctctatgcc aacacagtgc	20
15	<210> 4 <211> 20 <212> ADN <213> secuencia artificial	
20	<220> <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador inverso mbeta-actina"	
	<400> 4 gtactcctgc ttgctgatcc	20

REIVINDICACIONES

1. Compuesto para su uso en el tratamiento de (i) un cáncer, en el que el cáncer depende de la actividad proteolítica de la proteasa MALT1, en el que el compuesto tiene la fórmula general (I)



- 5 en la que
 X es N;
 Y es S, O o CH₂-CH₂;
 ()_Z es una cadena de alquilo lineal o ramificada C₁-C₅;
 A es NR³R⁴ u OR⁵, o HET
- 10 R¹ y R² en cada caso se seleccionan independientemente de -H, -CH₃, -OH, -OCH₃, -SCH₃, -F, -Cl, -CF₃, -NH₂ y -COOH;
 R³, R⁴ y R⁵ son H, o grupos alquilo lineales o ramificados C₁-C₅, y
 HET es un anillo heterocíclico de 5, 6 o 7 miembros, en el que los átomos de anillo pueden ser C, O, N o S, el anillo puede ser saturado o aromático, y el anillo puede estar sustituido con H o grupos alquilo lineales o ramificados C₁-C₅; o
- 15 el compuesto es una sal farmacéuticamente aceptable, enantiómero, diastereómero, mezcla racémica, forma cristalina, forma amorfa, forma no solvatada o solvato de fórmula general (I), en el que el cáncer que depende de la actividad proteolítica de la proteasa MALT1 es el subtipo de células B activadas de linfoma de células B grandes difuso o linfoma de MALT (tejido linfático asociado a la mucosa).
- 20 2. Compuesto para su uso según la reivindicación 1, en el que en la fórmula (I)
 X es N;
 Y es S;
 ()_Z es una cadena de alquilo C₁-C₅ lineal;
 R¹ es -H; y
- 25 R² es -H o -SCH₃.
3. Compuesto para su uso según la reivindicación 1 o 2, en el que A es HET y HET es un anillo carbocíclico de 5 miembros a 7 miembros que está interrumpido con NR⁶.
4. Compuesto para su uso según la reivindicación 1 o 2, en el que A es NR³R⁴ y R³ es H o CH₃ y R⁴ es -CH₃.
5. Compuesto para su uso según la reivindicación 1 o 2, en el que A es NR³R⁴, en el que R³ es CH₃, R⁴ es -CH₃, -C₂H₅ o una cadena de alquilo lineal C₃-C₅ cuya cadena de alquilo puede estar interrumpida por O, N o S y que forma un anillo saturado con un átomo de carbono de ()_Z.
- 30 6. Compuesto para su uso según la reivindicación 5, en el que el anillo saturado es un anillo carbocíclico de 5 miembros a 7 miembros que está interrumpido con N.
- 35 7. Compuesto para su uso según la reivindicación 1 o 2, en el que A es HET y HET es N-metilpiperidin-2-ilo o N-metilpiperidin-3-ilo.

8. Compuesto para su uso según la reivindicación 1 o 2, en el que

(a) Z = 3, A es NR³R⁴ y R³ y R⁴ son -CH₃;

(b) Z = 1 y A es N-metilpiperidin-3-ilo; o

(c) Z = 2 y A es N-metilpiperidin-2-ilo.

5 9. Compuesto para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que el compuesto es

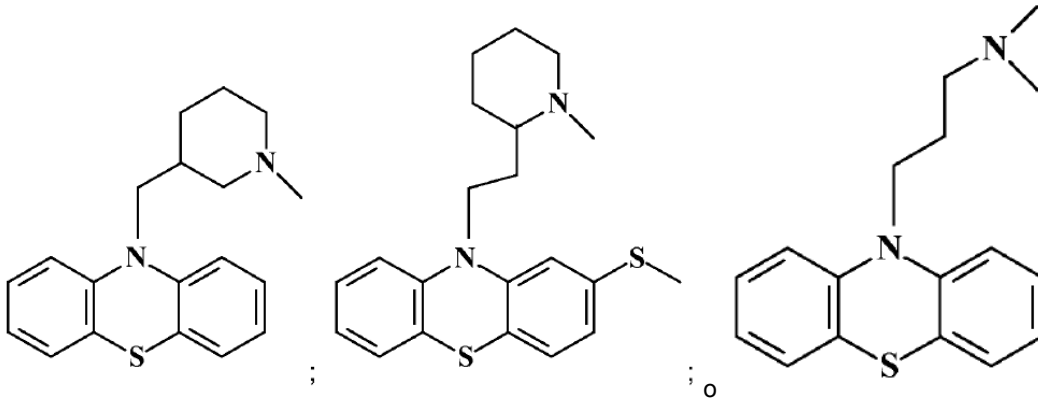
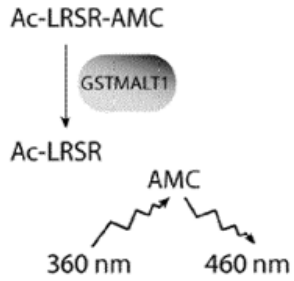
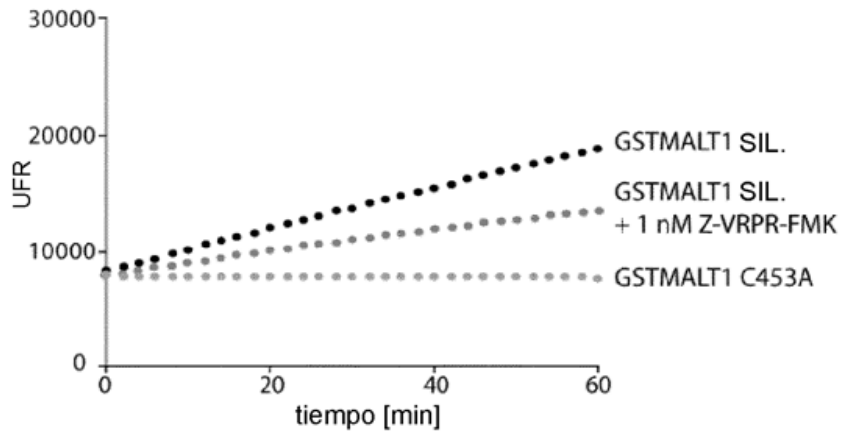


Figura 1

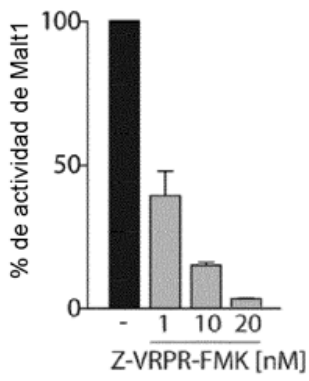
A



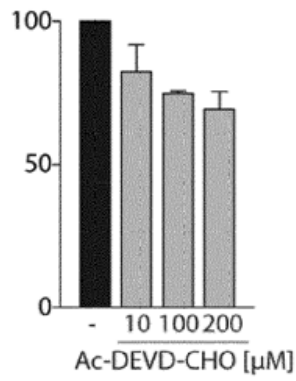
B



C



D



E

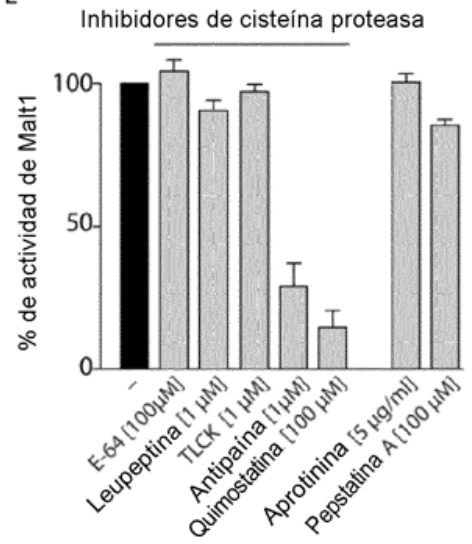
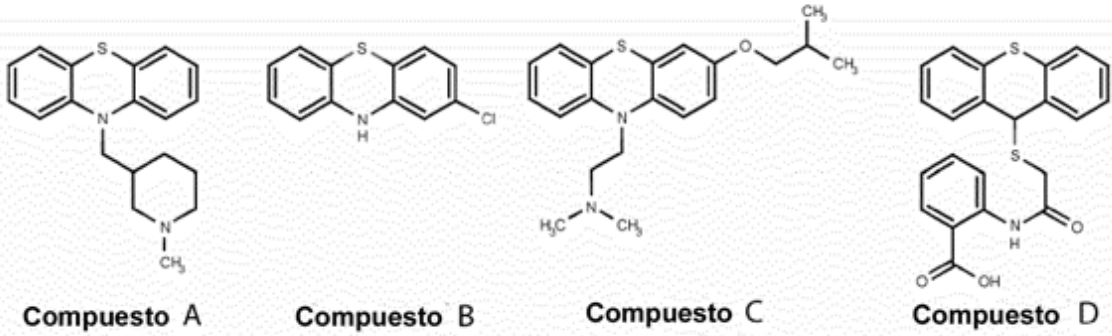
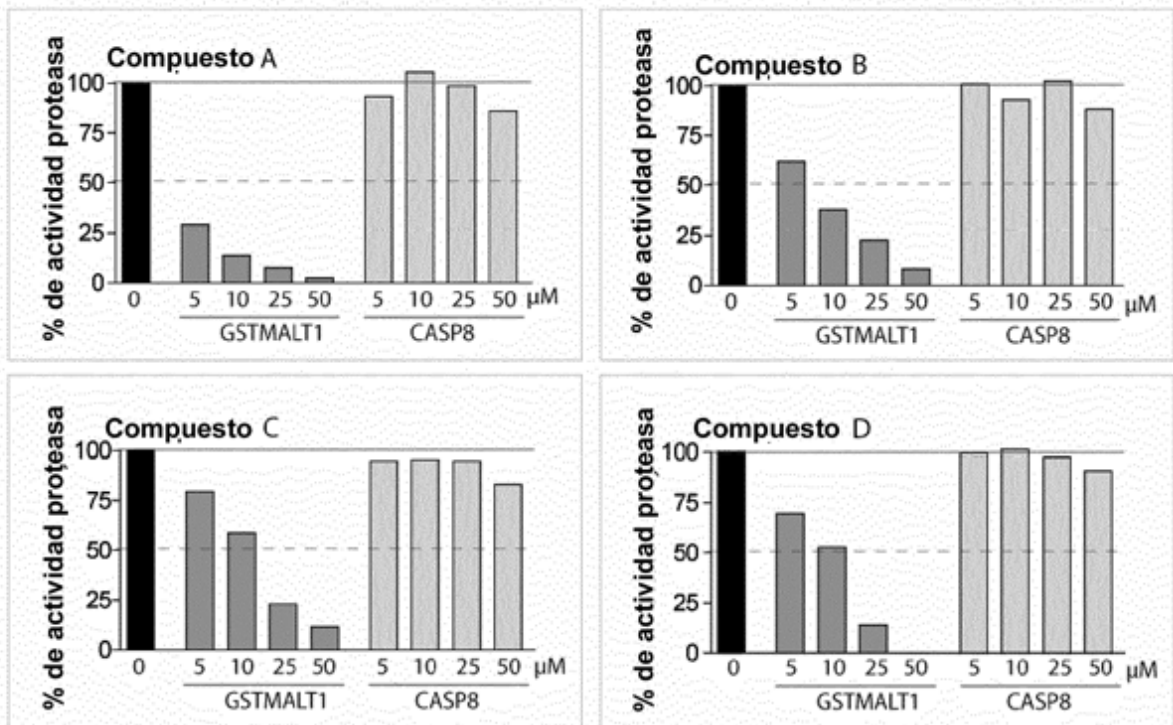


Figura 2

A



B



C

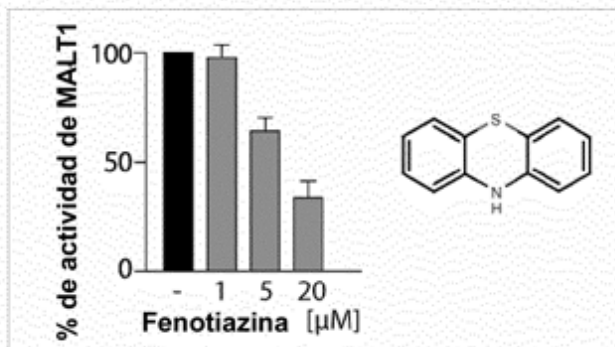
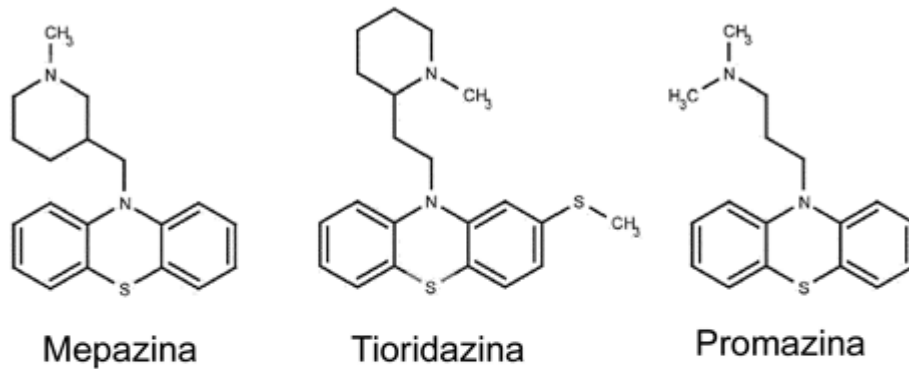
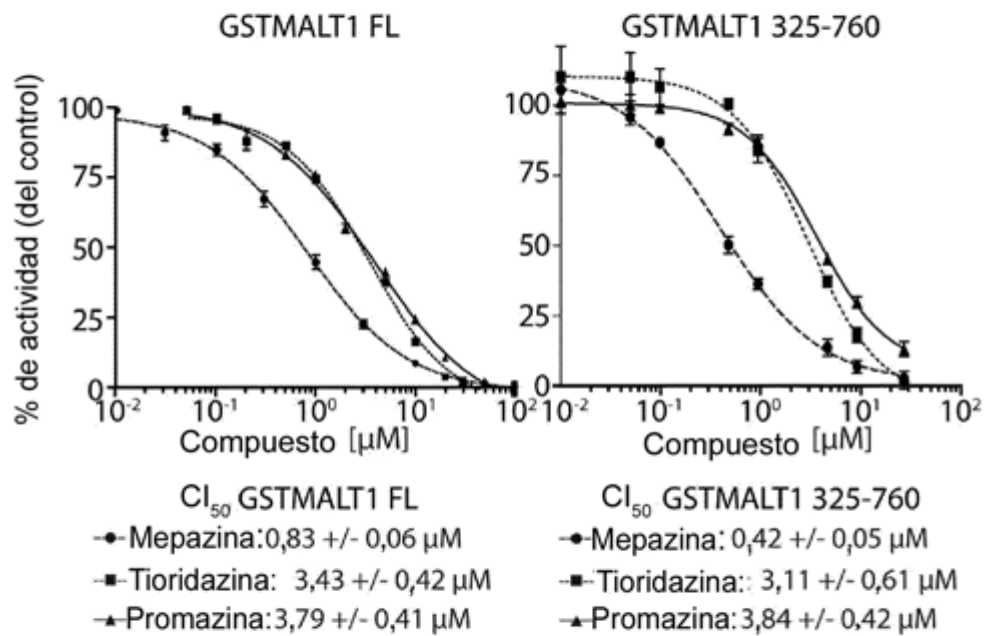


Figura 3

A



B



C

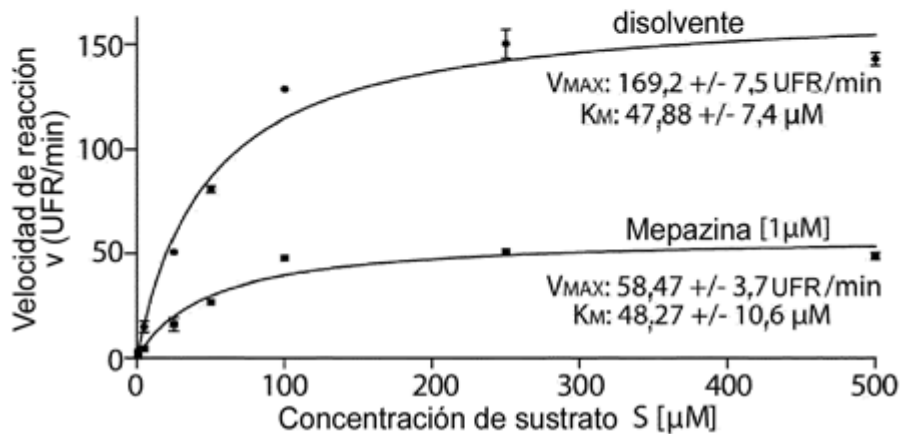
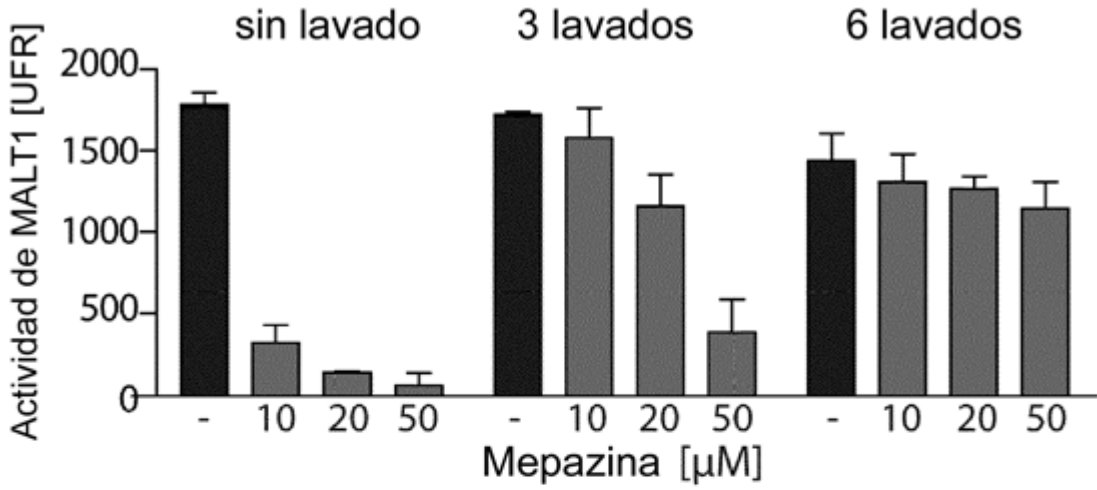


Figura 3 - continuación

D



E

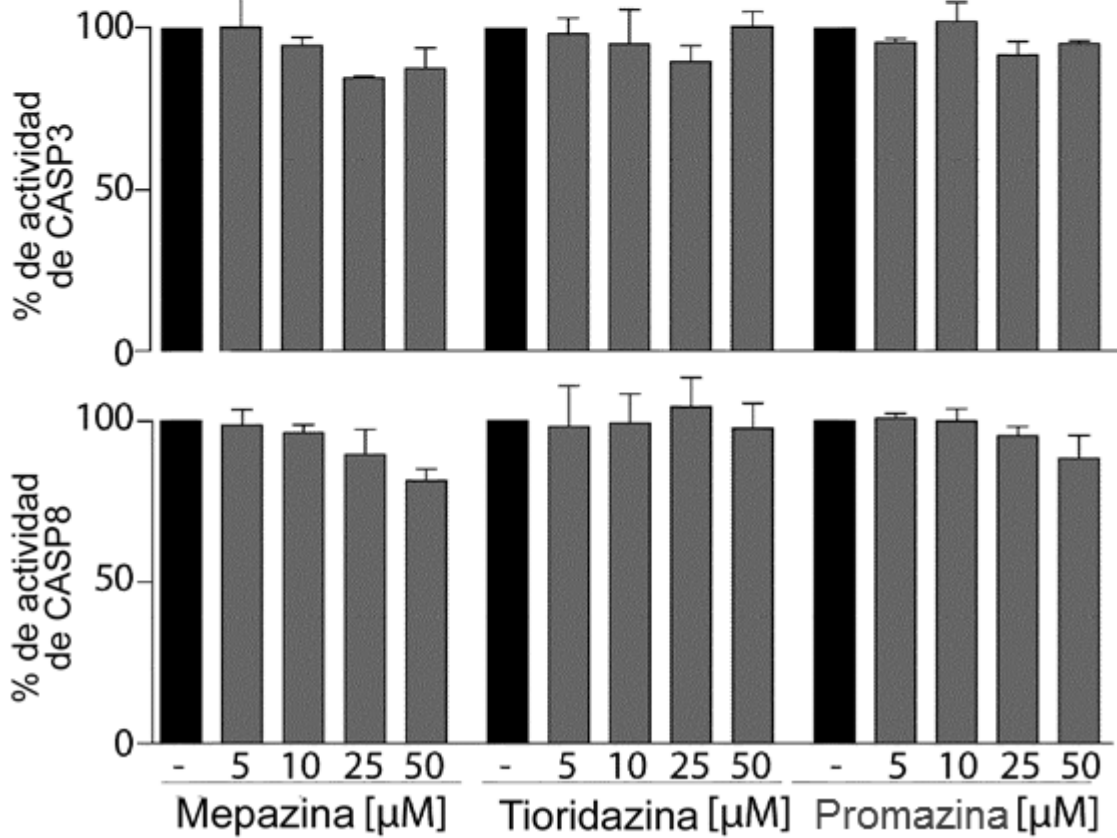


Figura 4

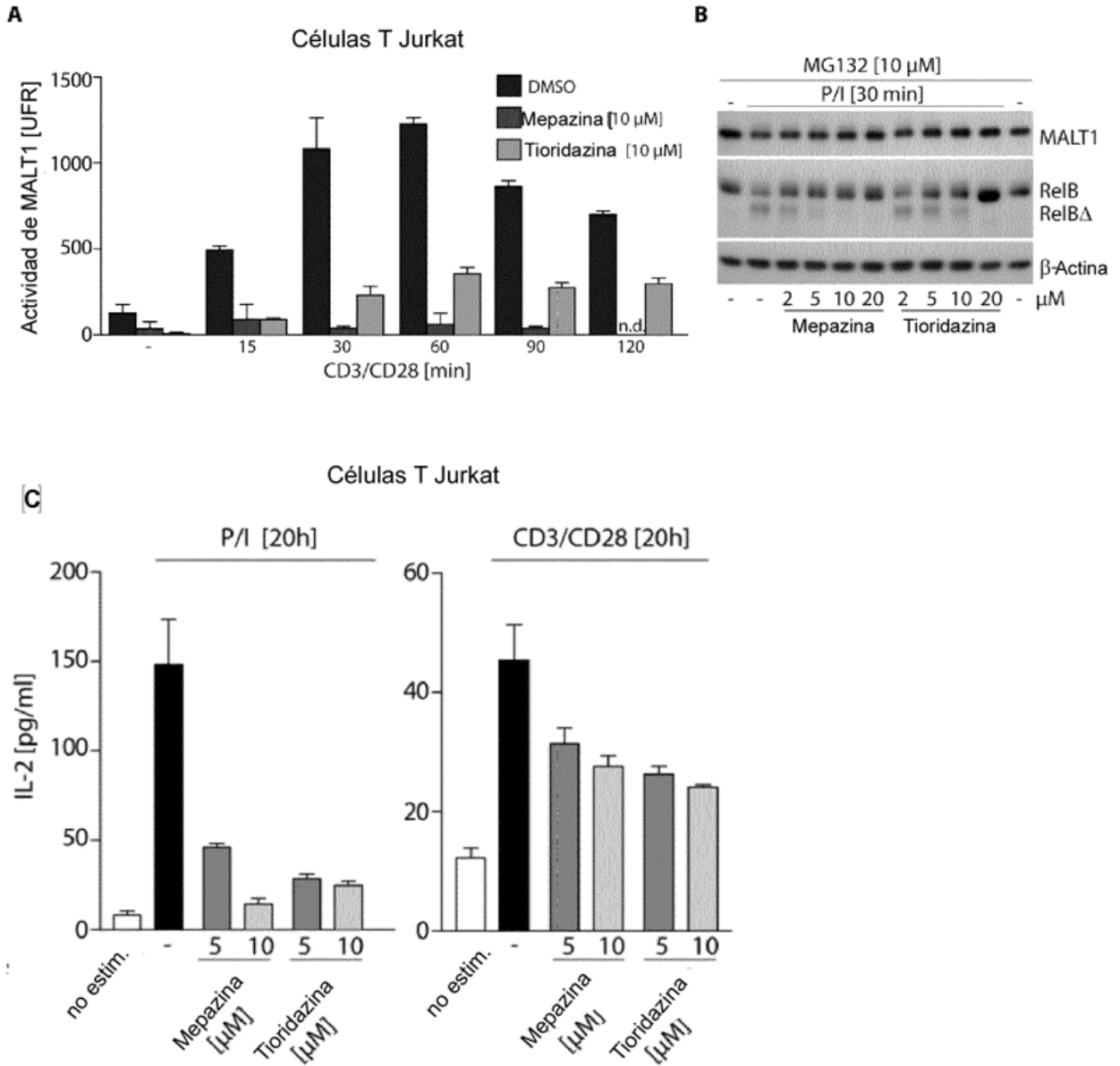


Figura 4 - continuación

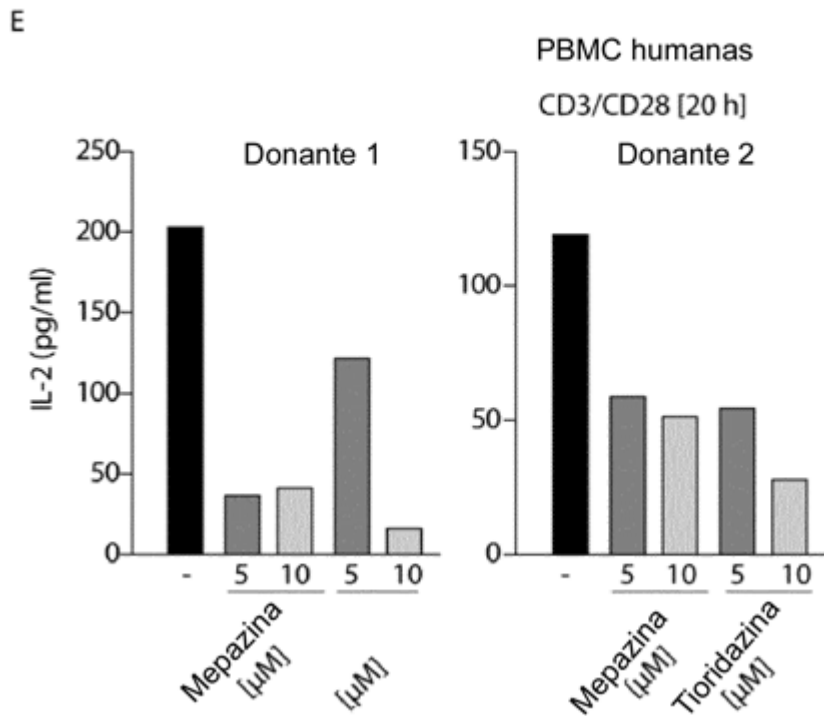
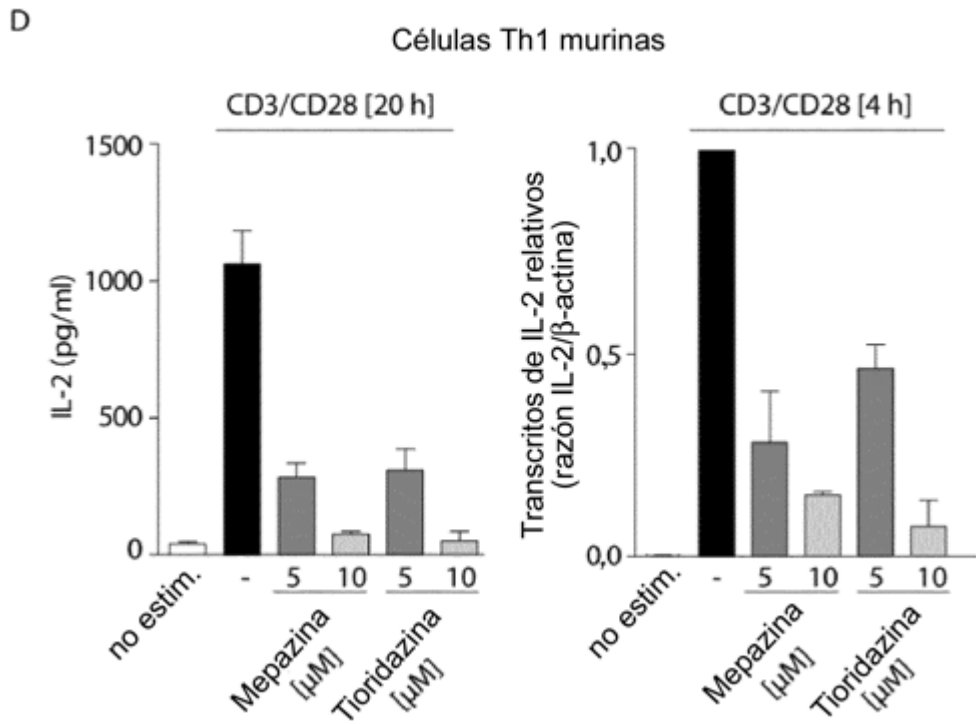
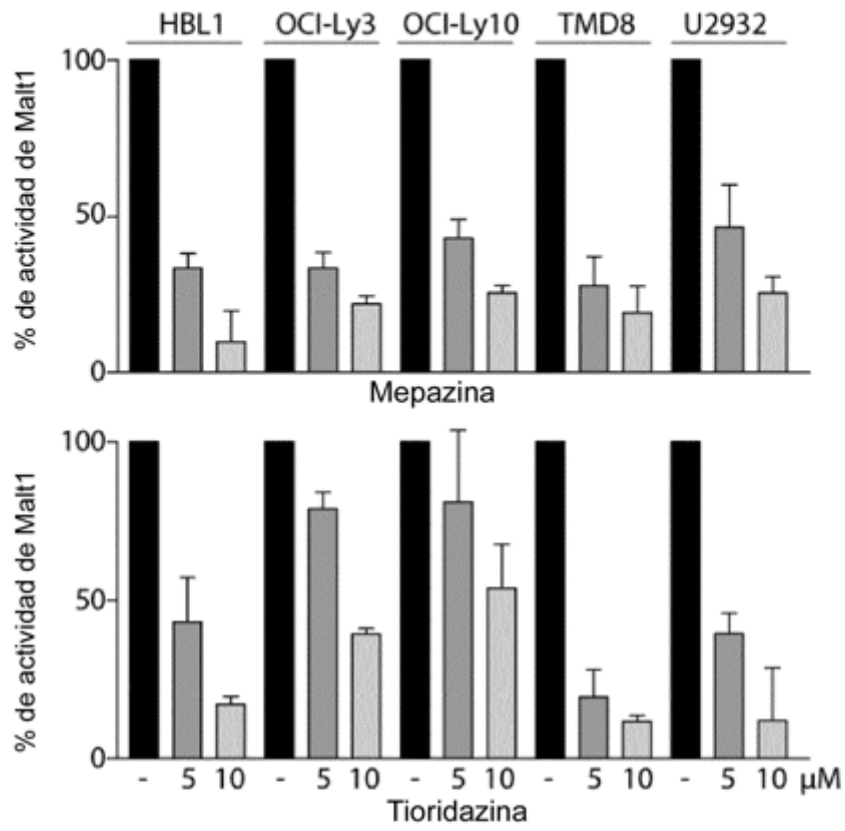


Figura 5
A



B

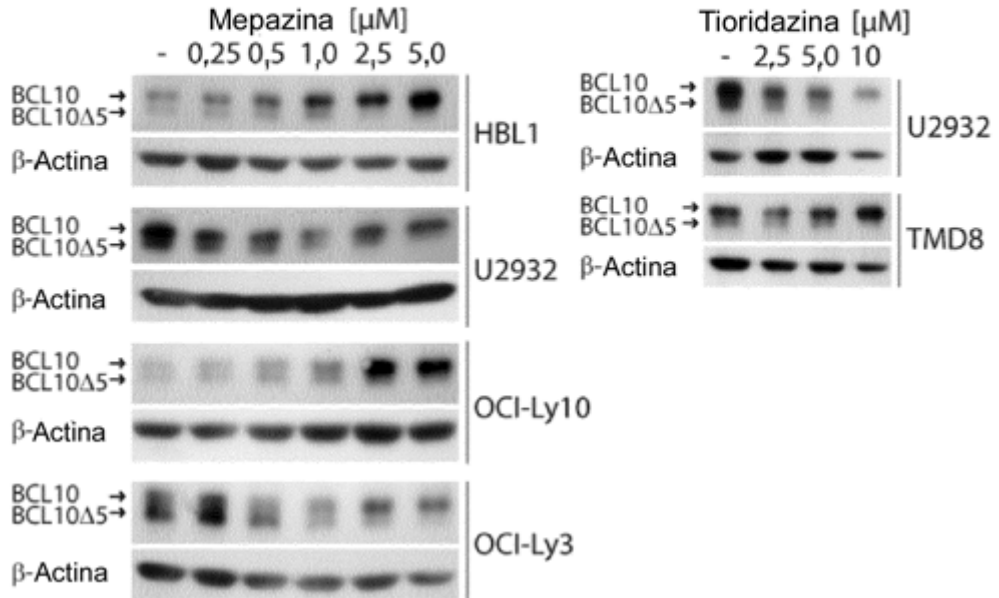
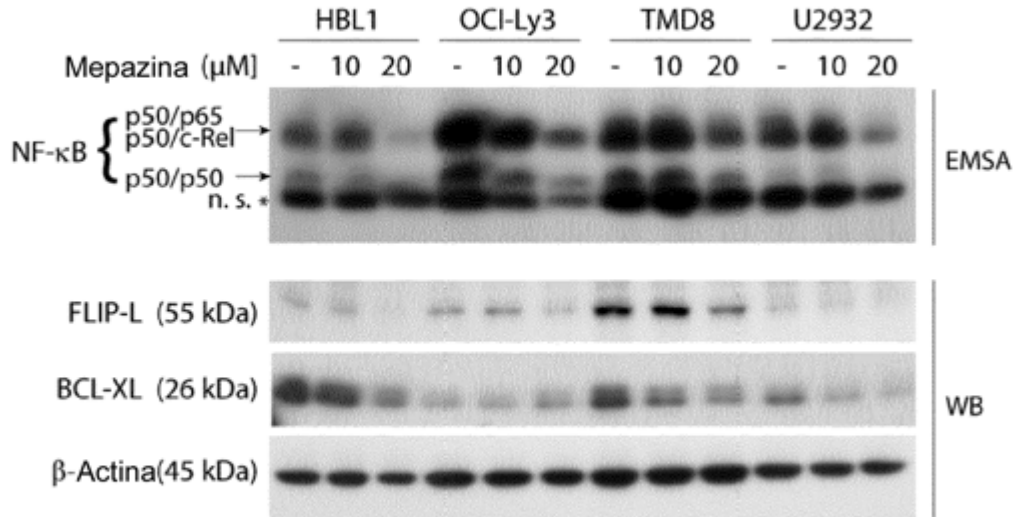


Figura 6

A



B

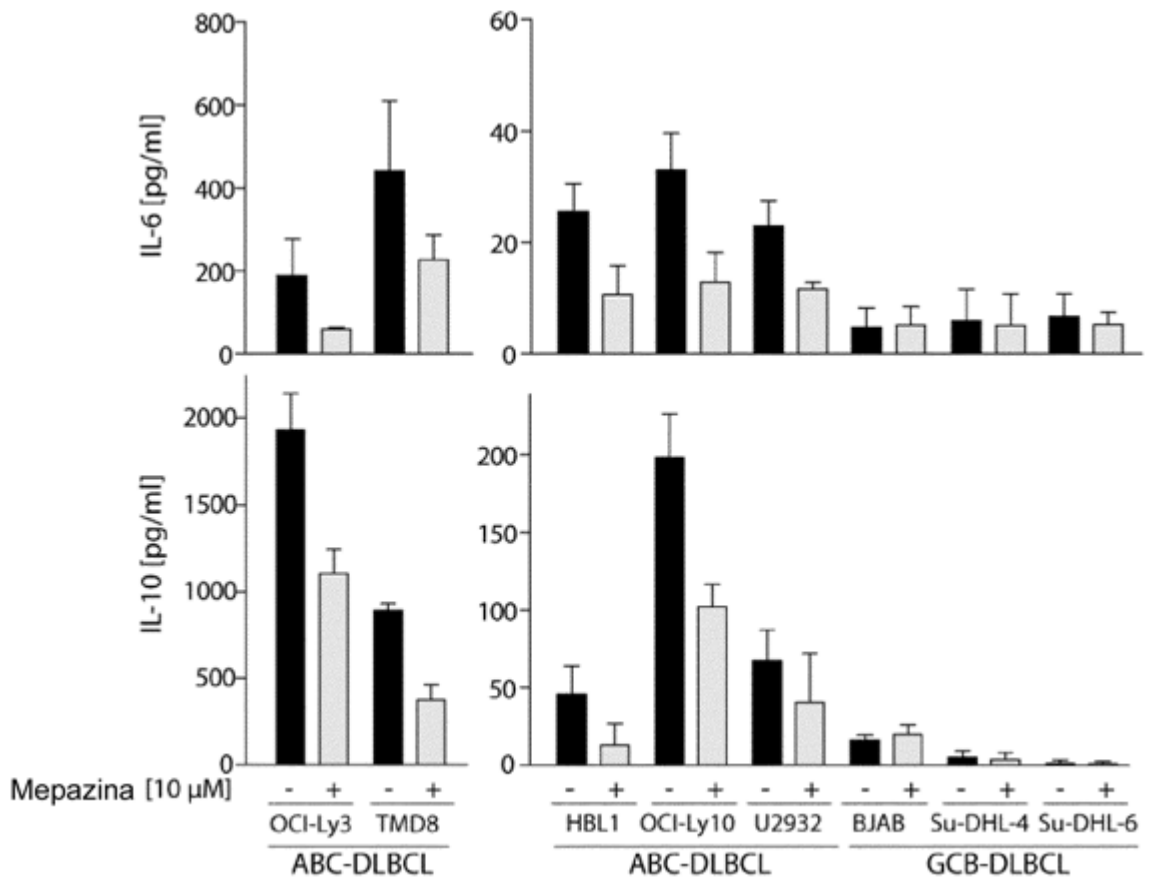


Figura 7

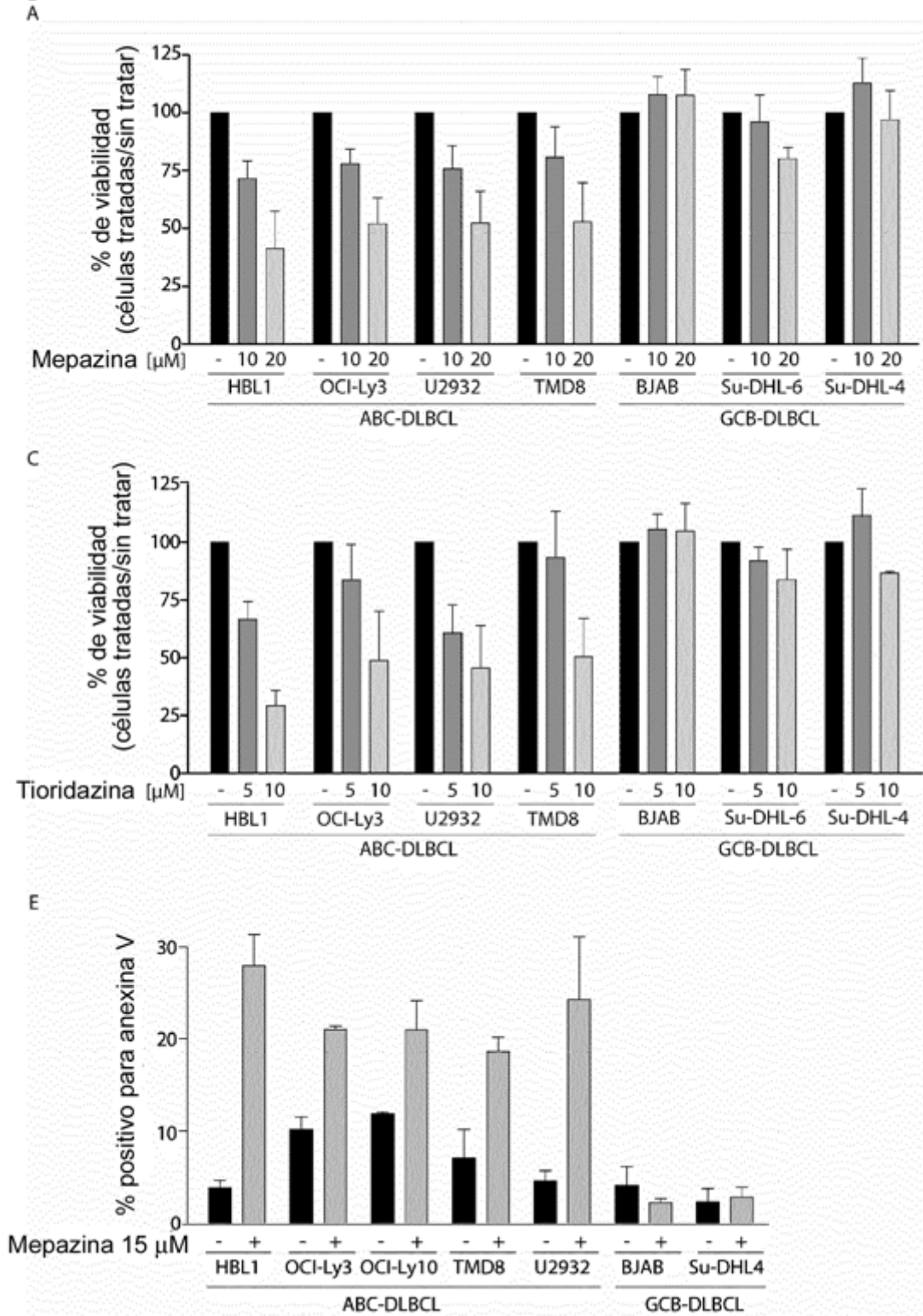
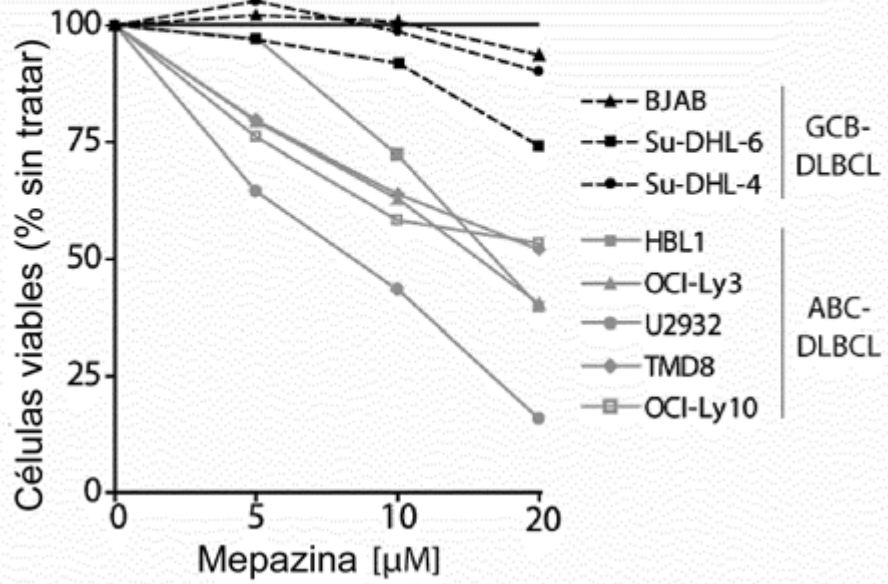


Figura 7 - continuación

B



D

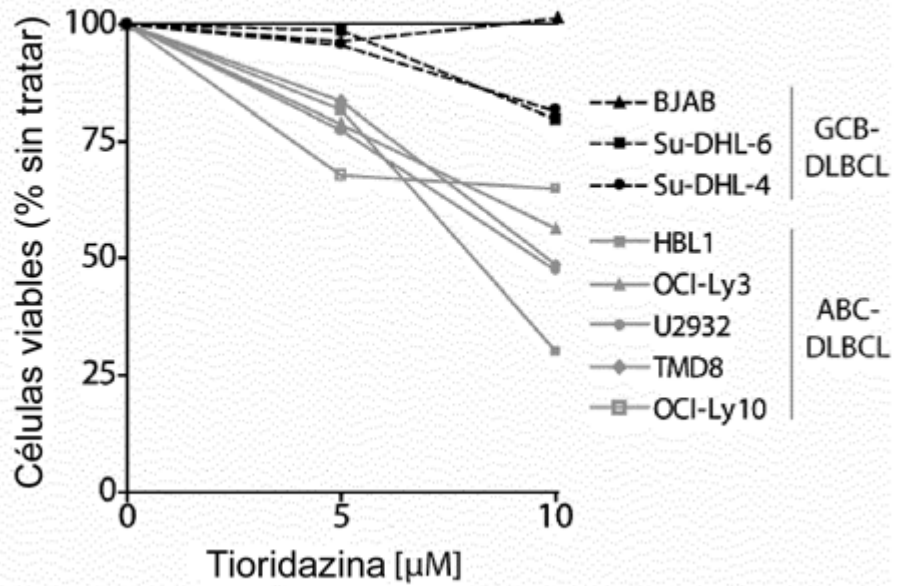
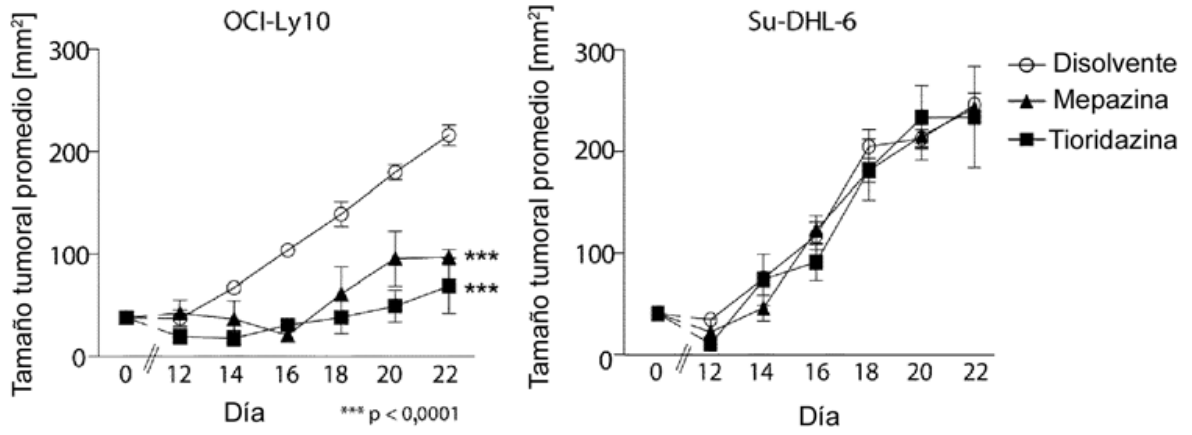
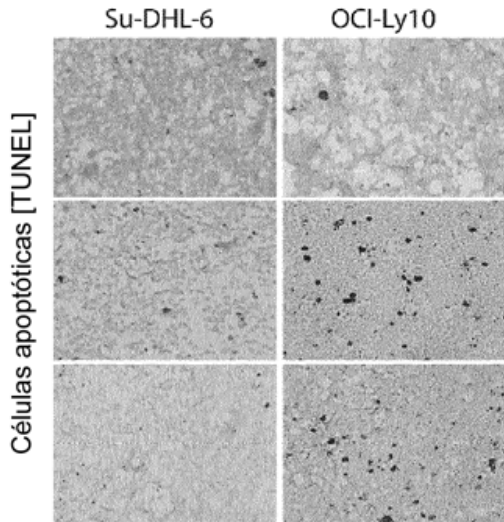


Figura 8

A



B



C

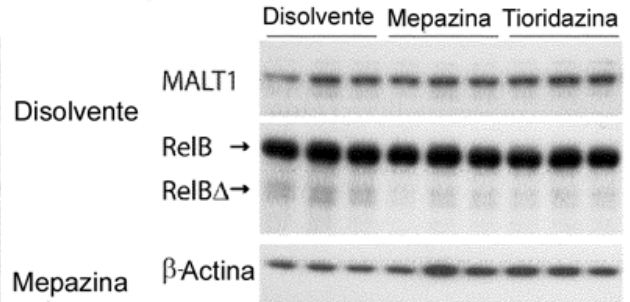


Figura 9

	Malt1	Atmc4[*]	Atmc9[*]	
Pepstatina [100 μ M]	83 %	66 %	69 %	Aspartil proteasas
Aprotinina [5 μ g/ml]	100 %	114 %	113 %	
TLCK [1 μ M]	97 %	79 %	0 %	Cisteína proteasas Serina proteasas
Quimostatina [100 μ M]	10 %	14 %	10 %	
Leupeptina [1 μ M]	91 %	12 %	5 %	
Antipaína [1 μ M]	30 %	6 %	1 %	
E-64 [100 μ M]	105 %	44 %	93 %	
Ac-DEVD-CHO [100 μ M]	75 %	n.d.	n.d.	
t-DEVD-cmk [100 μ M]	n.d.	94 %	94 %	

*Vercammen *et al.* 2004

Figura 10

	Examen primario	Validación de examen primario
Compuestos	~ 18.000	~ 300
Concentración de comp.	10 μ M	0,7- 90,9 μ M
Conc. de GSTMalt1	170 nM	170 nM
Volumen de ensayo	11 μ l	11 μ l
Tiempo de ensayo	20 min	20 min
Conc. de sustrato	50 μ M	50 μ M
Microplacas	NBS de 384 semipocillos	NBS de 384 semipocillos
Aciertos	~ 300	15
% de aciertos de la biblioteca	1,67 %	0,08 %

Figura 11

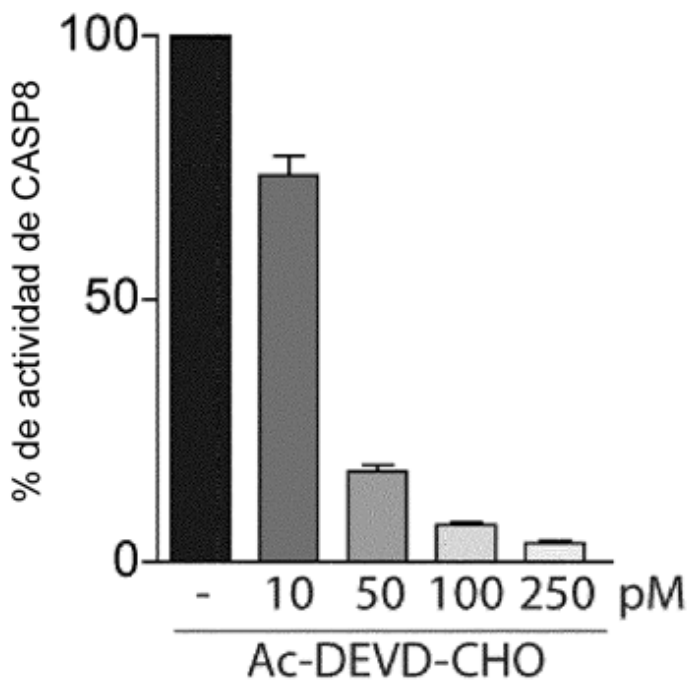
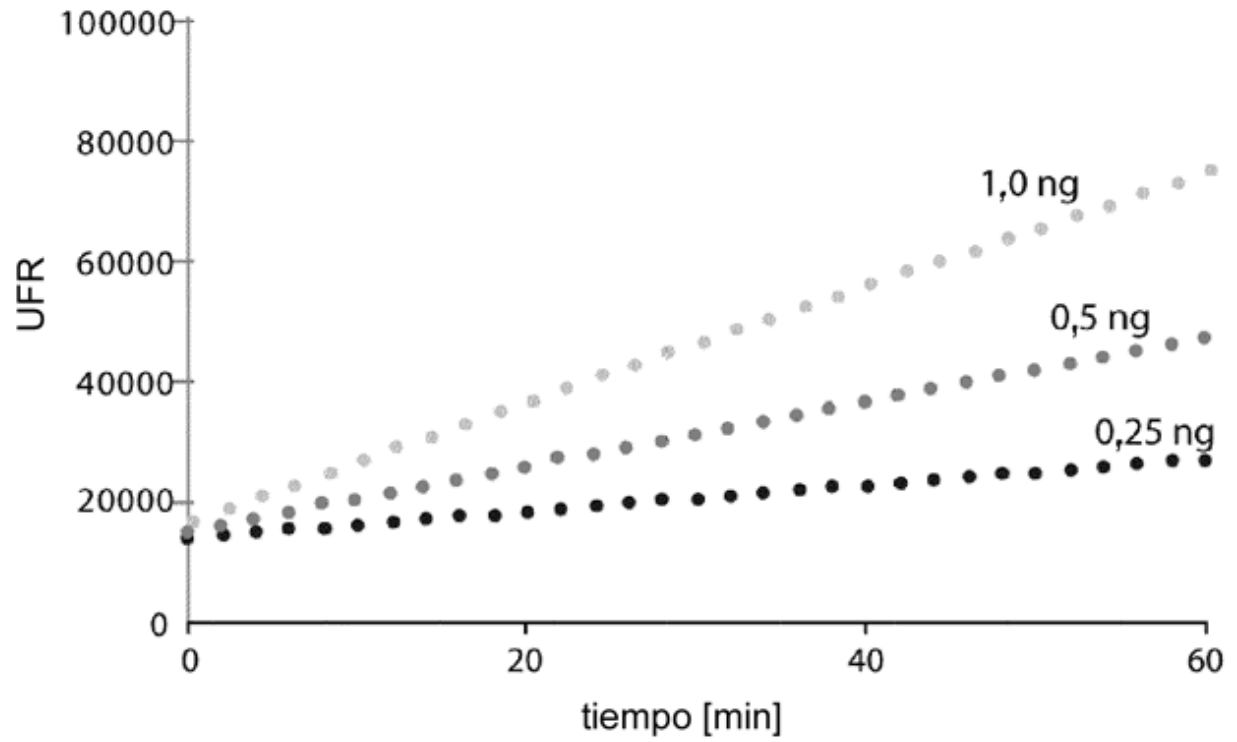


Figura 12

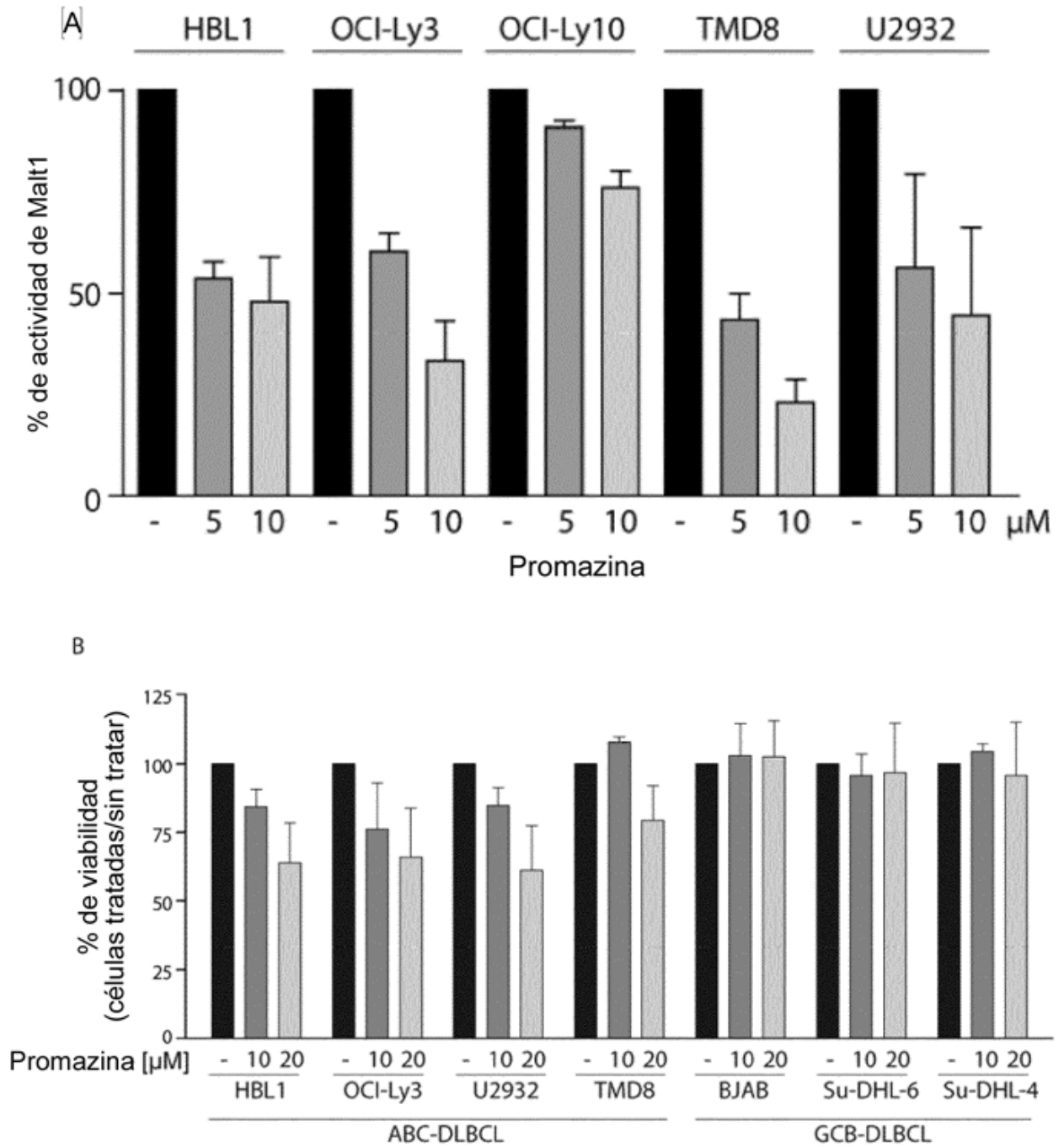
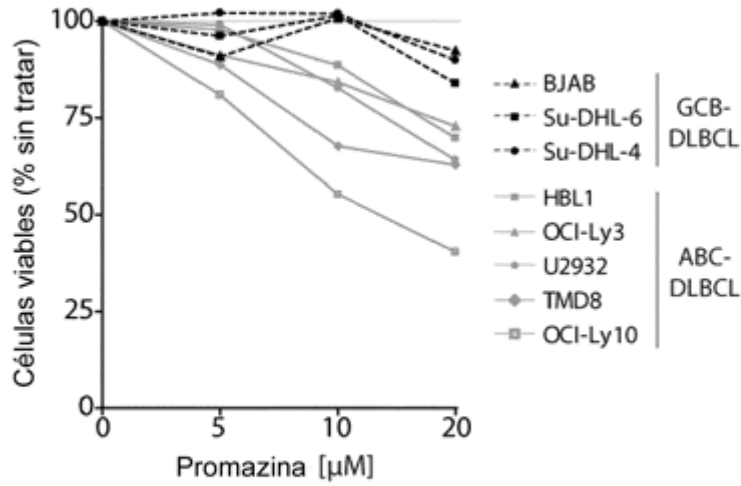
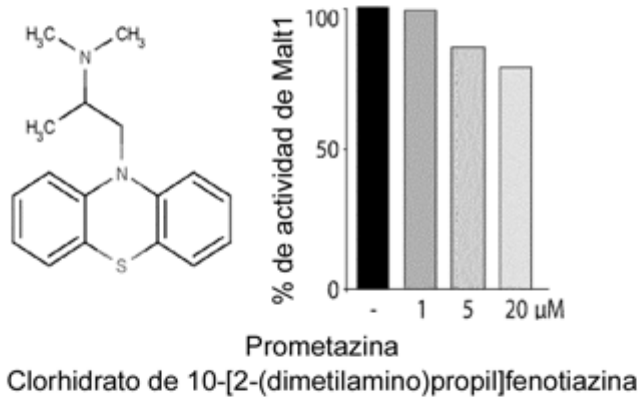


Figura 12 - continuación

C



D



E

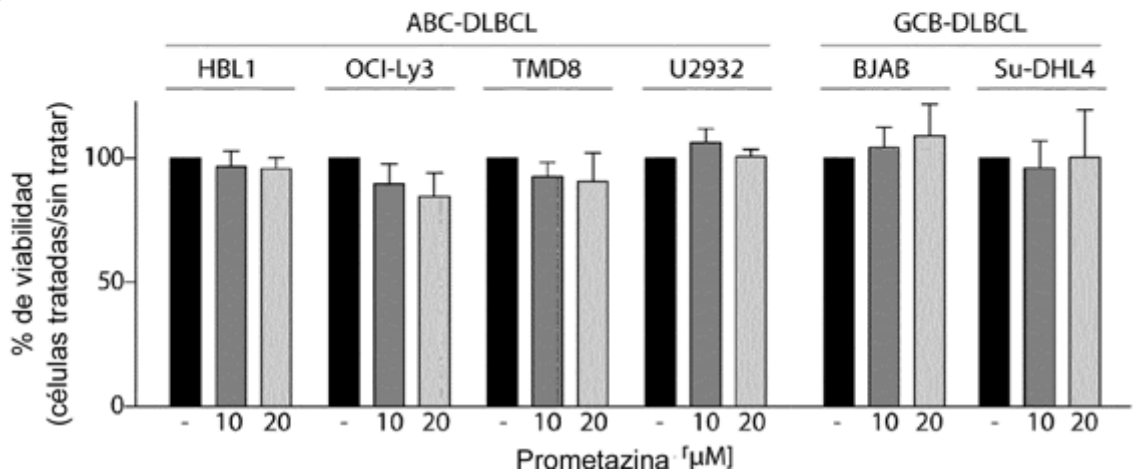


Figura 13

