(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 734 286**

(51) Int. CI.:

C07C 251/24 (2006.01)
C07C 251/26 (2006.01)
C07D 307/52 (2006.01)
C07D 333/22 (2006.01)
A61P 19/00 (2006.01)
A61P 17/00 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.08.2013 PCT/EP2013/067714**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **06.03.2014 WO14033122**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.08.2013 E 13756096 (7)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.04.2019 EP 2888228**

(54) Título: **Inhibidores de la interacción CD40-TRAF6**

(30) Prioridad:

27.08.2012 EP 12181862

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
05.12.2019

(73) Titular/es:

LUDWIG-MAXIMILIANS-UNIVERSITÄT MÜNCHEN (33.3%)
Geschwister-Scholl-Platz 1
80539 München, DE;
MAASTRICHT UNIVERSITY (33.3%) y
ACADEMISCH ZIEKENHUIS MAASTRICHT (33.3%)

(72) Inventor/es:

LUTGENS, ESTHER;
WEBER, CHRISTIAN y
NICOLAES, GERRY

(74) Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Inhibidores de la interacción CD40-TRAF6

La presente invención se refiere a compuestos que actúan como inhibidores selectivos de la interacción CD40-TRAF6, su uso como medicamentos y su uso en el tratamiento de enfermedades inflamatorias (crónicas). La presente descripción también se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden estos compuestos.

La aterosclerosis es una enfermedad inflamatoria crónica de las grandes arterias que progresa con la edad [1, 2]. La ateroesclerosis se caracteriza por la acumulación de células inmunes, lípidos y componentes calcificados en la pared arterial, la denominada placa aterosclerótica. La enfermedad permanece clínicamente silenciosa durante muchas décadas, pero cuando la placa aterosclerótica se rompe, se formará un trombo en la superficie de la placa que invadirá el lumen, lo que provoca un infarto (miocardio) o un accidente cerebrovascular, de acuerdo con el lecho vascular afectado [3]. Los inhibidores de la HMG-coA-reductasa (estatinas) reducen la carga de la enfermedad cardiovascular solo en un 25%, lo que subraya la necesidad urgente de blancos farmacéuticos adecuados para el desarrollo de nuevos fármacos. Una clase de blancos involucra los componentes del sistema inmunitario. Además de la reducción de lípidos, se ha demostrado que la modulación del sistema inmunitario es un poderoso mediador en el control de la aterogénesis [1, 2].

Los inventores han descubierto previamente que la díada CD40-CD40L, uno de los miembros de la familia del receptor de TNF de moléculas coestimuladoras, es crucial en la progresión de la aterosclerosis. La inhibición genética de CD40 (L) produjo una fuerte disminución de la aterosclerosis. Además, las placas ateroscleróticas contenían menos células inflamatorias y más colágeno [4]. Este fenotipo es el equivalente humano de una placa aterosclerótica que no es propensa a la ruptura de la placa. La reducción de la aterosclerosis y el fenotipo de la placa rica en colágeno, poco inflamatorio ocurrió incluso cuando se realizó el tratamiento con un anticuerpo anti-CD40L después de que se hubieran desarrollado las placas ateroscleróticas [5].

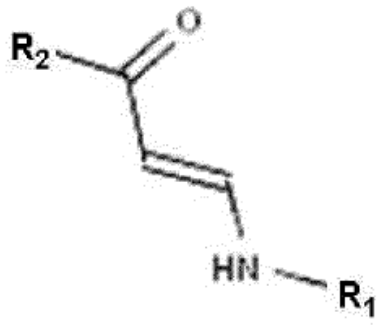
Aunque la inhibición de CD40 (L) es una terapia efectiva para reducir la carga de placa y para hacer que las placas sean menos propensas a la ruptura, el tratamiento de larga duración, que es necesario en la aterosclerosis, inducirá efectos secundarios tales como la aparición de eventos tromboembólicos o un aumento de vulnerabilidad a las infecciones debido a la supresión inmunitaria. Para evitar estos efectos secundarios, la investigación de los inventores se centró en aclarar la vía de señalización de CD40 que está involucrada en la aterosclerosis. CD40 no tiene señalización intrínseca, pero señaliza a través de factores asociados al receptor de TNF (TRAF), TRAF1, 2, 3, 5 o 6 [6]. Mediante la generación de ratones hiperlipidémicos modificados genéticamente que son deficientes en CD40, pero se les ha dado un transgén CD40 con un CD40-TRAF2/3/5 mutado (ratones CD40-T2/3/5), un CD40-TRAF6 mutado (ratones CD40-T6) o un transgén CD40 con las 2 mutaciones (ratones CD40-T2/3/5/6), los inventores pudieron aclaran qué interacción CD40-TRAF fue crucial en el desarrollo de la aterosclerosis. Encontraron que solo las interacciones CD40-TRAF6, pero no CD40-TRAF2/3/5 fueron cruciales para el desarrollo de la aterosclerosis [7]. En ausencia de interacciones CD40-TRAF6, solo se desarrollaron pequeñas placas ateroscleróticas y el influjo de células inmunitarias en la pared vascular había disminuido significativamente. Esto fue acompañado por un cambio fenotípico en los subtipos de monocitos. La ausencia de interacciones CD40-TRAF6 disminuyó la cantidad de monocitos de $Ly6^{alto}$ proinflamatorios, mientras que aumentó el número de monocitos antiinflamatorios $Ly6C^{bajo}$ que patrullan. El análisis en profundidad de la composición de las células inmunitarias en la sangre y los órganos linfoides no reveló efectos secundarios inmunosupresores [7]. Estos hallazgos hacen que la interacción CD40-TRAF6 sea un objetivo interesante para el desarrollo de agentes farmacológicos para tratar no solo la aterosclerosis, sino también otras enfermedades inflamatorias crónicas tales como la obesidad, enfermedad inflamatoria intestinal y artritis.

El documento WO 2009/143141 A1 divulga un procedimiento para tratar enfermedades mediadas por CD40, que incluye la administración a células que expresan CD40, un agente que inhibe la unión del factor 2 asociado con el receptor de TNF (TRAF2) a una porción citoplasmática de CD40, en donde dicho agente no inhibe la unión del ligando CD40 (CD40L) a CD40 de las células. Los agentes descritos son péptidos.

Por consiguiente, un objeto de la presente invención fue identificar compuestos que inhiben selectivamente la interacción CD40-TRAF6 y, por lo tanto, son útiles en el tratamiento de enfermedades inflamatorias (crónicas) como se define en la reivindicación 1.

El objeto de la presente invención se resuelve como se reivindica en las reivindicaciones.

El objeto de la presente invención se resuelve mediante un compuesto que tiene la fórmula



(I)

en la que

R_1 es un grupo arilo monocíclico sustituido o no sustituido; y

R_2 es un grupo arilo monocíclico sustituido o no sustituido o un grupo heteroarilo monocíclico sustituido o no sustituido;

o una de sus sales farmacéuticamente aceptables

para usar en el tratamiento de una enfermedad inflamatoria, seleccionada de aterosclerosis, obesidad, artritis reumatoide, sepsis y peritonitis,

en la que los sustituyentes de un grupo sustituido se seleccionan de modo independiente de halógenos y grupos alquilo C_1-C_3.

El término "sustituido", como se usa en la presente, significa que al menos un átomo de hidrógeno unido a un átomo miembro dentro de un grupo se reemplaza con un sustituyente. De acuerdo con la invención, los sustituyentes se seleccionan de modo independiente del grupo que consiste en halógenos (es decir, -Cl, -Br, -F y -I) y grupos alquilo C_1-C_3 (es decir, metilo, etilo, propilo). Los sustituyentes particularmente preferidos se seleccionan del grupo que consiste en -Cl, -Br y $-CH_3$ (metilo).

El término "sal farmacéuticamente aceptable", como se usa en la presente, significa las sales de compuestos de la invención que son seguras y efectivas para el uso en mamíferos y que poseen la actividad biológica deseada.

En una realización, R_2 se selecciona del grupo que consiste en un grupo fenilo sustituido o no sustituido, un grupo tiofenilo sustituido o no sustituido y un grupo furanilo sustituido o no sustituido. En una realización, R_2 se selecciona del grupo que consiste en un grupo fenilo no sustituido, un grupo tiofenilo no sustituido y un grupo furanilo sustituido o no sustituido.

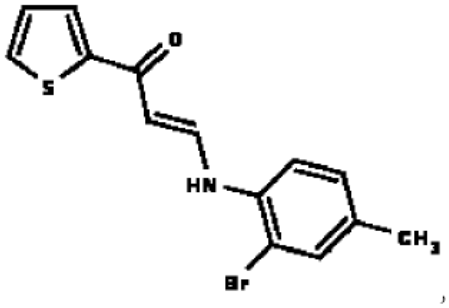
En una realización, R_1 en un grupo fenilo sustituido o no sustituido.

En una realización, dicho grupo fenilo sustituido es un grupo fenilo sustituido con uno o más sustituyentes seleccionados de modo independiente del grupo que consiste en halógenos (es decir, -Cl, -Br, -F e -I) y grupos alquilo C_1-C_3 (es decir, metilo, etilo, propilo). Preferiblemente, dichos sustituyentes se seleccionan del grupo que consiste en -Cl, -Br y -CH3 (metilo).

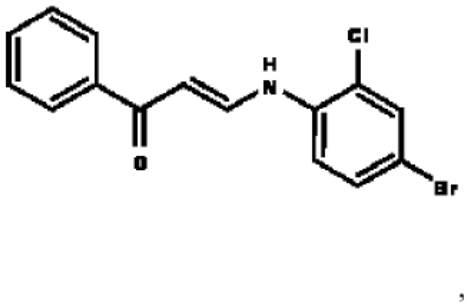
En una realización, R_1 Es un grupo fenilo mono o disustituido.

En una realización, dicho grupo fenilo está sustituido en la posición orto- y/o para. En una realización, dicho grupo fenilo está sustituido solo en la posición orto- y/o para (position orto o position para o position orto y para position), es decir, no está sustituido en la posición meta.

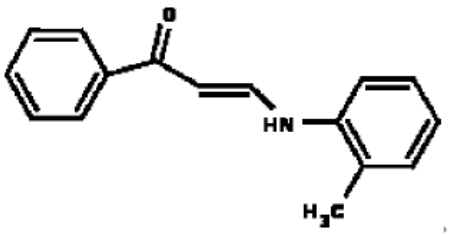
En una realización, dicho compuesto tiene una fórmula seleccionada del grupo que consiste en



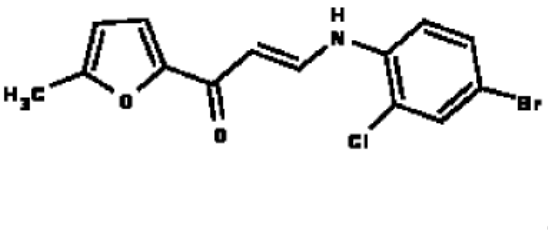
(II)



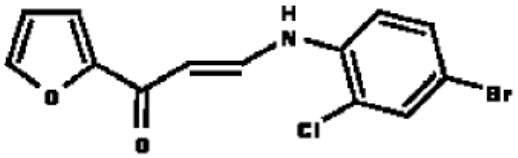
(III)



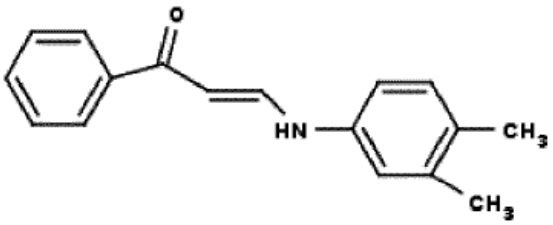
(IV)



(V)

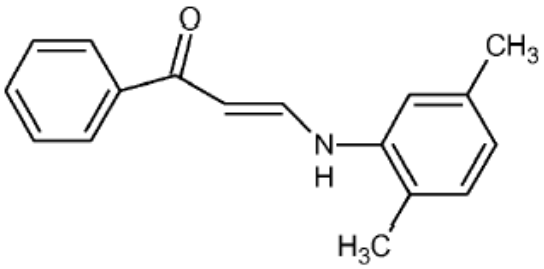


(VI)



(VII)

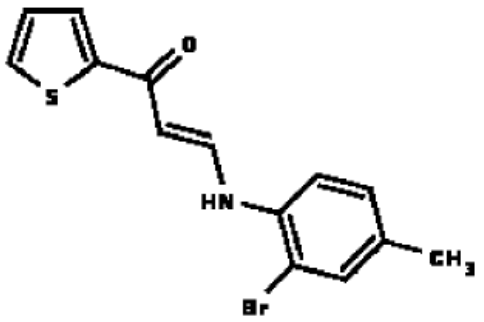
Y



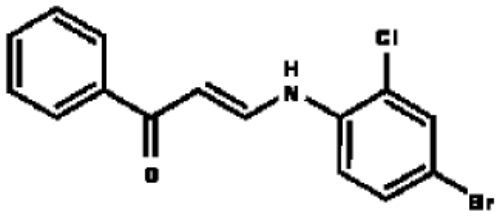
(VIII)

El compuesto definido anteriormente o una de sus sales farmacéuticamente aceptables se proporciona para su uso en el tratamiento de una enfermedad inflamatoria, en donde dicha enfermedad inflamatoria se selecciona de aterosclerosis, obesidad, artritis reumatoide, sepsis y peritonitis.

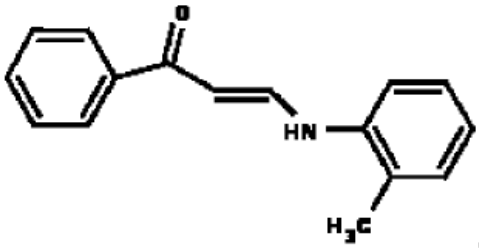
El objeto de la presente invención también es un compuesto que tiene una fórmula seleccionada del grupo que consiste en



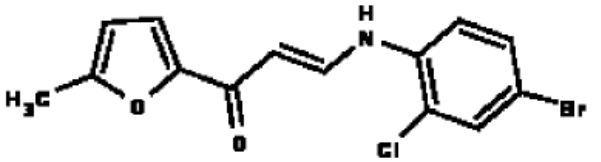
(II)



(III)

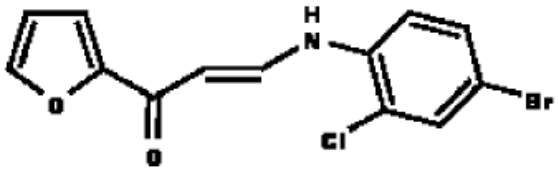


(IV)

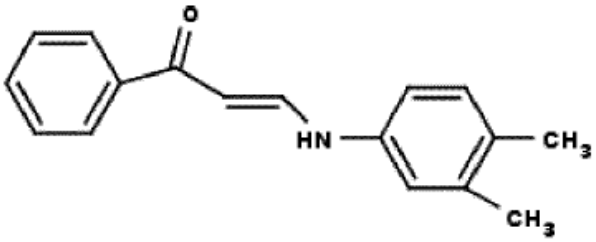


(V)

y

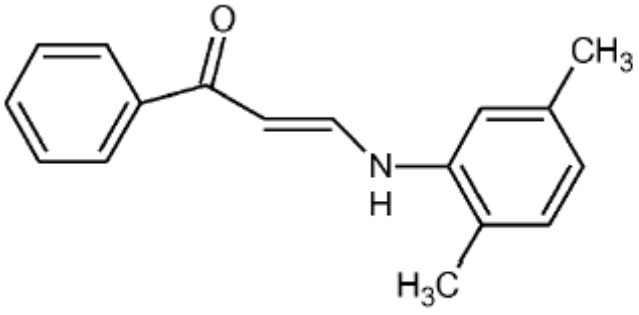


(VI)



(VII)

y



(VIII)

o una de sus sales farmacéuticamente aceptables para usar como un medicamento. El compuesto de la fórmula

(VII) es un compuesto de referencia con respecto al uso como un medicamento en general.

La presente divulgación también describe una composición farmacéutica que comprende un compuesto como se definió anteriormente o una de sus sales farmacéuticamente aceptables y al menos un portador, diluyente y/o excipiente farmacéuticamente aceptable.

Dicha composición farmacéutica puede comprender más de un compuesto como se definió anteriormente o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

La presente divulgación describe además un procedimiento de tratamiento de una enfermedad inflamatoria, dicho procedimiento comprende la administración de una cantidad efectiva de un compuesto como se definió anteriormente o de una sal farmacéuticamente aceptable del mismo o de una composición farmacéutica como se definió anteriormente a una persona que lo necesite.

Dicha enfermedad inflamatoria de la divulgación mencionada en el párrafo anterior puede ser una enfermedad inflamatoria crónica, tal como aterosclerosis, enfermedad cardíaca isquémica, miocarditis, enfermedad inflamatoria intestinal, artritis reumatoide, esclerosis múltiple, encefalitis alérgica, psoriasis, enfermedad de la piel atópica, osteoporosis, sepsis, peritonitis, hepatitis, obesidad, inflamación del tejido adiposo asociada a la obesidad, diabetes, resistencia a la insulina y/o hepatosteatosis.

En una realización, el término "aterosclerosis" pretende incluir las etapas iniciales de la aterosclerosis (xantoma de la íntima y engrosamiento de la íntima patológico) y la aterosclerosis establecida (ateromas de la cápsula fibrosa, placas erosionadas y rotas). En una realización, dicho compuesto está destinado al uso para el tratamiento de la aterosclerosis temprana. En una realización, dicho compuesto está destinado al uso para el tratamiento de la aterosclerosis establecida.

Los inventores de la presente invención han desarrollado con éxito un conjunto único de compuestos que bloquean las interacciones CD40-TRAF6. A diferencia de, por ejemplo, los anticuerpos anti-CD40 antagonistas, estos compuestos se dirigen específicamente a la interacción CD40-TRAF6 proinflamatoria, de este modo se preserva la función de CD40-TRAF2/3/5 en la inmunidad.

Los compuestos reducen fuertemente la inflamación, sin causar efectos secundarios inmunosupresores. Este hallazgo es muy significativo, ya que la mayoría de los fármacos antiinflamatorios en el mercado tienen efectos secundarios inmunosupresores. Los compuestos de la presente invención pudieron bloquear el desarrollo de la enfermedad y la progresión en la aterosclerosis, obesidad, sepsis y peritonitis. El mecanismo subyacente en todas las enfermedades fue una reducción en el influjo de células inmunitarias, especialmente monocitos, así como una reducción en la activación de células inmunitarias (especialmente macrófagos).

A continuación, se hace referencia a las figuras, en las que

La **Figura 1** muestra el extremo C-terminal de TRAF6 en complejo con CD40 que permite la identificación de una región apta para convertirse en fármaco;

La **Figura 2A** muestra los resultados de un ensayo de cultivo celular que revelan la capacidad de seis ejemplos de compuestos para reducir la actividad de NFκB;

La **Figura 2B** muestra las estructuras de siete ejemplos de compuestos;

La **Figura 3** muestra las interacciones del compuesto 7805351 (fórmula II) dentro de la región apta para convertirse en fármaco, así como la estructura clave de los compuestos activos que comprenden un núcleo común y dos anillos variables;

La **Figura 4** muestra una comparación de los compuestos activos e inactivos con respecto a sus posiciones dentro de la región apta para convertirse en fármaco; y

La **Figura 5** muestra el efecto de uno de los ejemplos de compuestos en un modelo de ratón de peritonitis inducida por tioglicolato (= ejemplo representativo de todos los compuestos analizados in vivo).

Figura 6 Identificación y caracterización del compuesto.

(A) El canal VLS. La colección de 400.000 compuestos se filtró sobre la base de las propiedades de absorción, distribución, metabolismo, excreción y toxicidad (ADME/Tox) usando la regla de Lipinski de 5' que produjo 271.759 compuestos. El ajuste de la forma geométrica de las estructuras, para cada ligando, se calcularon todos los mínimos de energía local en el espacio de conformación se calcularon usando un enfoque basado en el conocimiento que produjo 1,36 x 10^7 confórmeros. Todos los multi-confórmeros 3D se sometieron al protocolo de acoplamiento rígido. Los 40.000 compuestos con mejor puntuación se sometieron al acoplamiento flexible. Posteriormente, los 800 compuestos principales se enviaron al ensayo in vitro basado en células.

(B) Compuesto 6877002.

(C) Sensogramas SPR de los compuestos 6877002 y 6860766 que se unen al dominio C de TRAF6 inmovilizado. Los datos representan tres experimentos independientes.

Figura 7 El tratamiento con el compuesto reduce la carga ateroesclerótica en ratones Apoe$^{-/-}$ mediante la limitación de la inflamación de la placa.

(**A**) El área total de la placa en el arco aórtico de los ratones Apoe$^{-/-}$ de 18 semanas de edad se reduce mediante el tratamiento con el compuesto (10 µmol/kg/día) durante 6 semanas (n = 15 para vehículo, n = 14 para 6877002, n = 12 para 6860766).

(**B**) Las placas ateroscleróticas se clasificaron como se describió anteriormente [3, 7], lo que señala las etapas tempranas de la enfermedad (xantoma intimal y engrosamiento intimal patológico) y las etapas avanzadas (ateroma de la capa fibrosa). El compuesto 6860766 incrementó la incidencia de lesiones iniciales (xantoma intimal (IX), engrosamiento intimal patológico (PIT)) ya que impidió el desarrollo de lesiones avanzadas (ateroma de la cápsula fibrosa (FCA)). (n = 56 para vehículo, n = 38 para 6877002, n = 36 para 6860766).

(**C**) Imágenes longitudinales representativas del arco aórtico y tronco braquiocefálico, teñidas con hematoxilina y eosina (HE). El tratamiento con el compuesto redujo el tamaño de la placa y evitó la progresión de las lesiones iniciales a lesiones más complejas y avanzadas. Barra de escala: 2 mm (imágenes superiores) 100 µm (imágenes inferiores).

(**D-F**) El tratamiento con el compuesto redujo el número de leucocitos (células CD45+) **(D),** macrófagos/monocitos (MAC3+)**(D),** células T (CD3) **(E)** y granulocitos (Ly6G+) **(F)**. Todos los valores representan la media de 6 SEM. *, P <0,05.

Figura 8 El tratamiento con el compuesto altera la Adhesión celular mieloide arterial y disminuye la expresión de quimioquinas y citoquinas. Microscopía intravital de la arteria carótida en ratones *Cx3cr1egfp*/*wtApoe*-/- alimentados con una dieta rica en grasas durante 6 semanas. Para visualizar los neutrófilos, se instiló un anticuerpo para Ly6G. Después de los registros iniciales, los leucocitos se tiñeron mediante la administración de rodamina 6G.

(A) La adhesión de los leucocitos al endotelio se redujo en los ratones *Apoe*-/- - tratados con 6877002 y tratados con 6860766. En particular, la adhesión de monocitos y granulocitos se alteró en los ratones tratados (n = 5-8 por grupo). La visualización de la adhesión de leucocitos a la arteria carótida de ratones *Cx3cr1egfp*/*wtApoe-l-*. En los ratones tratados con compuesto, se observan menos puntos de rodamina teñidos con 6G y, egpf y ly6G, lo que indica que se reduce la adhesión de leucocitos (tanto de los neutrófilos como de los monocitos) a la pared arterial.

(B) La expresión inducida por CD40 de los pares de quimioquinas *CCL2, CCR$_2$, CCL5, CCR5* en macrófagos derivados de la médula ósea fue alterada por los compuestos. La expresión de citoquinas inducida por CD40 se evita en macrófagos derivados de médula ósea tratados con el compuesto. *, *P* < 0.05; **, *P* < 0.01; ***, *P* < 0.001.

Figura 9. Superposición de estructura de rayos X de apoestructura y estructura compleja CD40-TRAF6 (gris oscuro y gris claro, respectivamente).

Figura 10. Región apta para convertirse en fármaco. Los residuos que crean la región se representan en cian de la siguiente manera: His376, Arg392, His394, Gln396, Ser408, Phe410, His412, Ile464, Arg466, Pro468, Gly470 y Val474.

Figura 11. Los 19 compuestos se caracterizan por dos sistemas de anillos (R_1 y R_2) con diferentes grupos de sustitución conectados por un núcleo común, que consiste en nitrógeno, un doble enlace y oxígeno.

Figura 12.

(A) Los ratones tratados con 6877002 y 6860766 sometidos a ligadura cecal y punción exhiben mayores tasas de supervivencia, lo que sugiere que los compuestos no indujeron inmunidad sistémica durante la sepsis polimicrobiana (n = 10 por grupo). *, p <0.05; **, p <0.01.

(B) Los compuestos 6877002 y 6860766 aumentaron la relación de monocitos Ly6C-/bajo/Ly6alto en el

lavado peritoneal de ratones sometidos a peritonitis inducida por tioglicolato.

Figura 13. (A, B) El tratamiento con el compuesto a largo plazo (6 semanas) no afectó el peso corporal ni los niveles de colesterol en plasma en ratones Apoe-/-. **(C)** No se observaron diferencias en los linfocitos, granulocitos y monocitos de sangre periférica.

Figura 14. El inhibidor de la interacción CD40-TRAF6 mejora la desregulación metabólica e inflamación AT

Los ratones machos WT se alimentaron con una HFD durante un total de 12 semanas, reciben un inhibidor de la interacción CD40-TRAF6 (6877002) o una molécula de control a partir de la semana 6 de alimentación.

(A) Peso corporal de ratones tratados con inhibidor o control alimentados con HFD durante 12 semanas.

(B) Prueba de tolerancia a la insulina de ratones tratados con inhibidores o control alimentados HFD durante 12 semanas.

(C) Las células SVF del tejido adiposo gonadal de ratones tratados con control o inhibidor se analizaron mediante FACS. Se representan los leucocitos CD45+ y los macrófagos totales o macrófagos M1 (caracterizados como CD11b+F4/80+ y F4/80+CD11b+CD11c+ respectivamente).

(**D)** Imágenes representativas de H&E en el hígado de ratones tratados con control o inhibidor. * p <0,05, para comparación con ratones tratados con control. N = 7-8 ratones/grupo

La presente invención se describe ahora con más detalle por medio de los siguientes ejemplos, que pretenden ilustrar, pero no limitar la presente invención.

Ejemplos

Ejemplo 1

Análisis de ligando virtual

La deficiencia genética de las interacciones CD40-TRAF6 produce una fuerte disminución de la aterosclerosis y una disminución del influjo de monocitos en la pared arterial mediante el cambio de la relación entre los monocitos $Ly6C^{Alto}$ y $Ly6C^{bajo}$. Para desarrollar un agente terapéutico que bloquea las interacciones CD40-TRAF6, los inventores modelaron compuestos que se unen en la interfaz CD40-TRAF usando tres estructuras diferentes del dominio C-terminal de Traf6 en complejo con CD40 de la base de datos de proteínas pdb. Mediante la investigación manual de la proteína, se identificó una región apta para convertirse en fármaco y se usó como punto de partida para la detección virtual de ligandos. **(Figura 1).**

En la biblioteca de moléculas pequeñas de Chembridge (800.000 compuestos), los inventores primero realizaron un filtrado ADME/tox (absorción, distribución, metabolismo y excreción, así como toxicidad) para encontrar un fármaco candidato con el comportamiento farmacocinético y farmacodinámico deseado. Los compuestos también se seleccionaron de acuerdo con la regla de Lipinski de 5 para los fármacos activos por vía oral (1. No puede tener más de 5 donantes de enlaces de hidrógeno; 2. No puede tener más de 10 aceptores de enlaces de hidrógeno; 3. El peso molecular debe ser menor de 500 Dalton; 4. El coeficiente octanol-agua debe ser menor de 5 y 5. El número de enlaces giratorios debe ser menor de 10). Después de realizar análisis de los acoplamientos rígidos y flexibles, 800 compuestos tenían el potencial de bloquear la vía de CD40-TRAF6 en un sistema biológico.

Validación del análisis de ligando virtual

Los 800 compuestos obtenidos del análisis de ligando virtual también se probaron en un sistema de cultivo celular para determinar su potencial para bloquear la inflamación (inducida por CD40). Por lo tanto, se utilizó una línea celular de macrófagos que contiene una NFκB-luciferasa. Los macrófagos se estimularon con LPS o FGK45, un anticuerpo de agrupamiento para CD40, para inducir la activación de NFκB, un equivalente para la inflamación. De los 800 compuestos, 48 compuestos fueron capaces de reducir la actividad inflamatoria en más del 50%.

Sobre la base de su estructura, estos 48 compuestos se dividieron en subgrupos, y se desarrollaron y analizaron 150 nuevos compuestos. Esta prueba mostró que 6 compuestos bloquearon CD40 en forma dependiente de la dosis y/o la inflamación inducida por LPS con una IC50 que varía de 400-7000 nM (**Figura 2A**, los primeros seis compuestos y **Figura 2B**).

Estructura de los compuestos activos

Los compuestos activos tienen un núcleo lineal común y dos grupos (hetero-)arilo variables (R_1 y R_2) (**Figura 3** y **Figura 11**). El análisis de la prueba del ligando virtual y los experimentos de cultivo celular revelaron que las modificaciones del grupo R_1 que no causan el reordenamiento de Pro468 de TRAF6 bloquean con éxito la

inflamación (**Figura 4**). Más del 90% de los compuestos activos tienen sustituciones en la posición orto o para, mientras que todos los compuestos inactivos tienen sustituciones en la posición meta, lo que causa un impedimento estérico.

Toxicología *in vivo*

Los seis compuestos activos que demostraron bloquear eficazmente la actividad de NFκB en cultivo celular se analizaron en un ratón C57B16 para detectar cualquier efecto secundario adverso. El compuesto se inyectó diariamente a una concentración de 5 µM. Se investigó la cantidad de leucocitos, así como su distribución de subconjuntos. No se observaron efectos en el recuento total de leucocitos. Sin embargo, los inventores observaron un cambio de $Ly6C^{Alto}$ a la población de monocitos y $Ly6C^{bajo}$, como también fue válido para el modelo de ratón CD40-TRAF6, de este modo se confirma la actividad biológica del compuesto. No se observaron efectos en los subconjuntos de células B, células dendríticas o células T.

Modelo de inflamación

Los seis compuestos activos que demostraron bloquear eficientemente la actividad de NFκB en cultivos celulares se analizaron en un modelo de ratón de peritonitis inducida por tioglicolato. Los compuestos se inyectaron por vía intraperitoneal a una concentración de 5 µM, cada 8 horas. Después de 18 horas, los ratones se sacrificaron y el fluido peritoneal, la sangre y el bazo se analizaron para determinar el número de leucocitos, monocitos, macrófagos y distribución de subconjuntos de DC. El número total de leucocitos fue ligeramente elevado, pero, como se vio anteriormente en el modelo de ratón CD40-TRAF6 y en el estudio de toxicidad, la distribución del subconjunto de monocitos cambió hacia la población de $Ly6C^{bajo}$ antiinflamatoria.

(Figura 5).

Ejemplo 2

Análisis de ligando virtual (VLS)

La estructura cristalina de un complejo CD40-TRAF6 humano (PDBid = 1LB6) resuelta a una resolución de 1,80 Å, se usó como molde receptor. Antes de su uso en VLS, se eliminaron todas las moléculas de disolvente, iones y el fragmento de péptido CD40 co-cristalizado. Se añadieron átomos de hidrógeno y sus posiciones se optimizaron utilizando el paquete Twinset YASARA-WHATIF. La apoestructura TRAF6 (PDBid = 1LB4; resuelta a 2,40 Å) y la estructura del complejo CD40-TRAF6 se alinearon con el módulo de superposición 3D implementado en el paquete Twinset YASARA-WHATIF. Sobre la base de los análisis del alineamiento estructural 3D mencionada anteriormente, la conformación de la cadena lateral del residuo Arg466 presente en la estructura del complejo CD40-TRAF6 (1LB6) se cambió para representar el rotámero de energía más baja. El nuevo rotámero se recuperó de la biblioteca de rotámeros dependiente del esqueletol YASARA. Los programas ICM-PocketFinder y QSiteFinder se utilizaron para predecir una región para convertirse en fármaco en el molde TRAF6. La colección de moléculas pequeñas in silico de la base de datos Express Pick ChemBridge (http://www.chembridge.com), versión noviembre de 2009, se utilizó como punto de partida para el proceso de selección de ligandos. Esta biblioteca de compuestos disponibles comercialmente consiste en aproximadamente 400.000 compuestos. La colección de compuestos se filtró usando la 'regla de Lipinski de cinco', tal como se implementó en el programa de código abierto FAF-Drugs2 de ADME/Tox. Se rechazaron los compuestos con 1 violación de Lipinski o con grupos reactivos. El software de generación de confórmeros OpenEye OMEGA se utilizó para generar estructuras de multi-confórmeros 3D para cada una de las moléculas pequeñas y añadir átomos de hidrógeno y cargas parciales de Gasteiger. Se utilizó un protocolo jerárquico que combina procedimientos de acoplamiento rígidos y flexibles, como se describe en [8, 9]. El programa de acoplamiento de cuerpo rígido FRED se utilizó para acoplar la biblioteca de multi-confórmeros pre-generada en la estructura blanco. Después de la puntuación de todos los complejos de TRAF6-compuestos, los 40.000 compuestos principales se sometieron al acoplamiento flexible y la puntuación por el programa Surflex. Se realizó una búsqueda de similitud en la base de datos ChemBridge utilizando la herramienta de búsqueda en línea Hit2lead (http://www.hit2lead.com) para identificar compuestos con mejor actividad inhibitoria. Finalmente, se realizó un acoplamiento completamente flexible con el programa Fleksy. Todos los gráficos moleculares en el artículo asociado se produjeron con el paquete YASARA-WHATIF Twinset.

Análisis de expresión, purificación y unión del dominio C TRAF6

El dominio C de TRAF6 marcado con His (residuos 346-504) se expresó en *E. coli* utilizando el vector de expresión pET21d (Novagen). La proteína se purificó mediante cromatografía de afinidad, seguido de filtración en gel en un tampón de corrida (TRIS 25 µM, NaCl 200 µM y TCEP 0,5 µM). La unión directa entre el dominio C TRAF6 y los compuestos 6877002 y 6860766 (para la estructura química, ver Figura 6B y Figura 2B, respectivamente) se midió mediante SPR (Biacore T200, GE Healthcare). El dominio C de TRAF6 se inmovilizó en el chip sensor CM5 utilizando el procedimiento de acoplamiento de amina. Esto alcanzó una densidad de aproximadamente 12.000 y 7.500 RU. Los compuestos se disolvieron en tampón PBS con DMSO 5%. Todas las mediciones se llevaron a cabo a 25 ºC y con un caudal de flujo de 50 µl min^{-1} en tampón de corrida SPR (PBS, Tween20 0,05%, DMSO 5%, pH = 7,4). Los sensogramas se corrigieron mediante la sustracción del nivel inicial de la señal de SPR antes de la

inyección de los compuestos o el dominio C de TRAF6. Los datos se analizaron usando el software de evaluación BIA. Las constantes de disociación de equilibrio (Kd) se determinaron a partir de un modelo de afinidad de estado estable (se promediaron 3 corridas independientes) (**Figura 6C**).

Prueba *in vitro*

Las células RAW 264.7, transfectadas de forma estable con el plásmido 3x-κB-*luc*, se incubaron con las moléculas pequeñas durante 1 hora a las concentraciones indicadas. Posteriormente, las células se activaron utilizando lipopolisacáridos de *E. coli* (Sigma-Aldrich), un procedimiento para inducir rápidamente la expresión de CD40 en macrófagos. Después de 2 horas, las células se lisaron y el sustrato se añadió de acuerdo con el protocolo del fabricante (sistema de prueba Luc, Applied Biosystems). La emisión se midió a 450 nm utilizando el luminómetro Wallac Victor II.

Cultivo de macrófagos *in vitro*

Se aislaron células de médula ósea (BM) de ratones C57B16 y se cultivaron en RPMI suplementado con medio condicionado con L929 15% para generar macrófagos derivados de BM. Los macrófagos derivados de BM se activaron con el anticuerpo agonista CD40 FGK45 (25 ug/ml, Bioceros BV) durante 6 horas.

PCR cuantitativa

El ARN se aisló de macrófagos derivados de BM y se realizó la transcripción inversa utilizando un kit de síntesis de ADNc iScript (Bio-Rad). La (q)PCR cuantitativa se realizó con un kit de PCR SYBR Green (Applied Biosystems) en un sistema de PCR en tiempo real ViiA 7 (Applied Biosystems).

Animales

Los ratones macho C57B16 y *Apoe*-/- (fondo C57B16) se compraron a Charles River o se criaron en las instalaciones de animales locales (Maastricht University, Maastricht, Países Bajos; Amsterdam Medical Center, Ámsterdam, Países Bajos; y Ludwig Maximilians University, Munich, Alemania). *Cx3cr1egfp*/+*Apoe*-/- se criaron en el LMU.

Estudios de toxicidad

Para estudios de toxicidad in vitro, las células RAW264.7 se incubaron con las moléculas pequeñas como se describió anteriormente. La viabilidad celular se analizó utilizando el contador de células Casy de acuerdo con el protocolo del fabricante (Roche Applied Science). Para estudios de toxicidad in vivo, los ratones C57B16 machos recibieron una inyección intraperitoneal diaria de las moléculas pequeñas (10 mmol/kg) durante 7 días (ratones C57B16) o 6 semanas (ratones *apoE*-/-; estudio de aterosclerosis). En el momento del sacrificio, se determinaron los recuentos de sangre periférica absolutos utilizando un analizador de hematología Vet abc Plus + scil (Scil Animal Care Company B.V.). Para el análisis histológico, los órganos se fijaron en paraformaldehído (4%, durante la noche), se seccionaron a 4 µm y se tiñeron con hematoxilina y eosina.

Citometría de flujo

En el sacrificio, se obtuvo sangre del corazón en jeringas recubiertas con EDTA. Los eritrocitos se lisaron mediante incubación con un tampón hipotónico (8,4 g de NH_4Cl y 0,84 g de $NaHCO_3$ por litro de agua destilada). La unión de anticuerpos no específicos se evitó mediante la incubación previa con un anticuerpo bloqueador del receptor Fc (eBioscience). Los leucocitos se marcaron con CD3-FITC (eBioscience), B220-V500 (eBioscience), CD11b-PeCy7 (BD), Ly6G-PE (BD), y Ly6C-APC (Miltenyi Biotec). Las células se analizaron en un citómetro de flujo FACSCanto II (BD).

Peritonitis y ligación y punción cecal (CLP)

Para inducir la peritonitis en ratones C57B16, se inyectaron por vía intraperitoneal (IP) 3 ml de tioglicolato 4% (Sigma) en PBS. Los compuestos se administraron a las 0, 6, 12 y 15 horas después de la inducción de la peritonitis. En la eutanasia (18 horas después de la inducción de la peritonitis), se recolectó sangre y se aislaron las células peritoneales mediante lavado peritoneal. Los leucocitos se marcaron con anticuerpos y se analizaron por citometría de flujo, como se indicó anteriormente. La sepsis fue inducida por ligación y punción cecal. Los ratones se anestesiaron con una inyección IP de ketamina (125 mg/kg de peso corporal; Sanofi-Cefa GmbH Düsseldorf, Alemania) y xilazina (12.5 mg/kg de peso corporal; Phoenix Scientific). El abdomen se abrió por incisión en línea media longitudinal. Después de la identificación, el ciego se llenó con heces, se ligó 1 cm detrás de la punta, se perforó con una aguja de calibre 22, y seguido por el prensado de una pequeña cantidad de heces. La fascia, musculatura abdominal y piel se cerraron con suturas consecutivas. Los ratones simulados se sometieron al mismo procedimiento quirúrgico sin ligación y punción del ciego. Los ratones se trataron con los compuestos (10 µMl/kg) o con el vehículo, durante el CLP y 12 horas después del CLP mediante inyección IP.

Aterosclerosis

A los ratones *Apoe -/-* se les inyectó IP con los compuestos a 10 µmol/kg/día durante 6 semanas, comenzando a la edad de 12 semanas, y se alimentaron con una dieta chow normal durante todo el experimento. Posteriormente se sacrificaron y se perfundió el árbol arterial. El arco aórtico y sus puntos de ramificación principales se extirparon, se fijaron durante la noche y se incluyeron en parafina. Se analizaron secciones longitudinales del arco aórtico para determinar la extensión y la morfología de la placa. Para el análisis fenotípico, se realizó inmunohistoquímica (IHC) para CD3 (Dako), CD45 (BD), Mac-3 (BD) y α-SMA (Sigma-Aldrich). La tinción con rojo Sirio se realizó para detectar colágeno. Los análisis morfométricos se realizaron utilizando el software Las4.0 (Leica). Los niveles de colesterol plasmáticos se midieron enzimáticamente (Roche) y los órganos se analizaron mediante tinción con hematoxilina y eosina.

Microscopía intravital

La microscopía intravital de la arteria carótida se realizó en ratones *Cx3cr1egfp/+Apoe-/-* durante 6 semanas en una dieta con 0,15% de colesterol. Los ratones recibieron una inyección IP única del compuesto o vehículo. Se instiló un anticuerpo conjugado con PE a Ly6G (1A8, 1 µg) a través de un catéter de vena yugular 5 minutos antes del registro. Después de registrar la adhesión de neutrófilos y monocitos, se administró rodamina 6G para visualizar todos los leucocitos adherentes. La microscopía intravital se realizó con un microscopio Olympus BX51 equipado con un divisor de haz para permitir el registro de canal dual sincronizada de dos canales, una cámara Hamamatsu 9100-02 EMCCD y un objetivo de inmersión en solución salina 10x. El software celular Olympus se utilizó para la adquisición y análisis de imágenes.

Análisis estadístico

Los datos se presentan como media ± SEM. Los datos se analizaron usando una prueba t de Student no apareada, una prueba t de Student corregida por Bonferoni o un ANOVA como se indica, usando el software GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, Inc.). Los valores de $p < 0,05$ se consideraron significativos.

Ejemplo 3

Los procedimientos mencionados en este ejemplo se llevaron a cabo como se describe en el Ejemplo 2.

Identificación de inhibidores de molécula pequeña

Para identificar las moléculas similares a los fármacos que inhiben la interacción CD40-TRAF6, se utilizó un enfoque de detección de ligandos virtuales (VLS) basado en la estructura in silico. La interacción entre CD40 y TRAF6 se analizó usando la apoestructura TRAF6 humana (PDB ID: 1LB4) y la estructura del complejo CD40-TRAF6 (PDB ID: 1LB6). Estos análisis revelaron cambios conformacionales en el surco de unión al péptido TRAF6 después de la unión de CD40. En este proceso, Arg466, que se encuentra en el surco de unión al péptido CD40, parece ser el más afectado (**Figura 9**). Por lo tanto, se exploraron varias orientaciones de esta cadena lateral para identificar una región apta para convertirse en fármaco potencial de medicamentos en el sitio de interacción CD40-TRAF6 (**Figura 10**). Se utilizó un enfoque de análisis de etapas múltiples en la colección de compuestos ChemBridge para identificar los inhibidores de esta región (**Figura 6A**). Esta cascada de detección, que consiste en acoplamiento rígido y flexible, así como el análisis in vitro, redujo el número de compuestos de 400.000 a 800 utilizando enfoques computacionales. Los 800 compuestos con mejor puntuación en el acoplamiento flexible se analizaron in vitro, utilizando un ensayo del gen indicador NFκB basado en células. Esto produjo la identificación de 51 compuestos que redujeron la activación de NFκB en una línea celular de monocitos/macrófagos leucémicos de ratón (RAW 264.7) en al menos un 50% a 10 µM.

Los 6 compuestos que redujeron más efectivamente la activación de NFκB en la prueba in vitro se usaron como una consulta para una búsqueda de similitud en la base de datos ChemBridge, que produjo 150 análogos. La prueba in vitro de estos compuestos reveló seis compuestos bioactivos adicionales con actividad celular igual o mejorada en comparación con el mejor compuesto inicial 6877002 (**Figura 2B**). El compuesto 6877002 y estos 6 análogos bioactivos identificados (**Figura 2B**) mostraron una inhibición dependiente de la dosis de la activación de NFκB en células RAW **(Figura 2A).**

Ejemplo 4

Todos los procedimientos mencionados en este ejemplo se llevaron a cabo como se describe en el Ejemplo 2.

Las moléculas pequeñas se unen directamente a TRAF6

Para dilucidar la relación de actividad de estructura (SAR) de los análogos del compuesto 6877002, se construyó un modelo de interacción del compuesto TRAF6 tridimensional usando un acoplamiento completamente flexible de todos los impactos bioactivos que contienen el armazón molecular del compuesto 6877002. Todos estos compuestos poseen dos sistemas anulares (R_1 y R_2; **Figura 11**) con diferentes sustituyentes y están conectados por el mismo ligador. Aparentemente, la unión de esta clase de compuestos a TRAF6 se estabiliza mediante 2 enlaces de hidrógeno con los residuos Asn467 y Cys390 y las interacciones de apilamiento π-π del anillo R_2 con Arg466 y His376 (**Figura 3**). La actividad celular de estos compuestos se parece correlacionar con la presencia de

sustituyentes en la posición orto o para y la ausencia de un sustituyente en la posición meta. Los sustituyentes en la posición meta parecen chocar con Pro468 (**Figura 4**). El compuesto 6877002 y el compuesto 6860766 son los compuestos sustituidos orto y meta más activos y más solubles, respectivamente. Estos dos compuestos se seleccionaron para estudios adicionales.

Se realizaron experimentos de resonancia de plasmón superficial (SPR) con los dos compuestos para confirmar su unión directa a TRAF6. Las constantes de disociación en equilibrio (Kd) al dominio C TRAF6 son 97 μM y 42 μM para los compuestos 6877002 y 6860766, respectivamente (**Figura 6C**). Esto se correlaciona bien con las actividades observadas en los tres ensayos celulares descriptos anteriormente.

Ejemplo 5

Todos los procedimientos mencionados en este ejemplo se llevaron a cabo como se describe en el Ejemplo 2.

El tratamiento con el compuesto no produce inmunosupresión

Los dos compuestos seleccionados no mostraron citotoxicidad in vitro, según se evaluó mediante ensayos de viabilidad. Los análisis hematológicos e histopatológicos de 13 órganos vitales no revelaron efectos secundarios tóxicos o inmunosupresores en ratones tratados a corto plazo (1 semana) y a largo plazo (6 semanas). Se considera que la inhibición de CD40 mediada por anticuerpos a largo plazo compromete la inmunidad sistémica. Para evaluar si nuestros compuestos inducen inmunosupresión sistémica, se indujo sepsis polimicrobiana en ratones C57B16 mediante ligación y punción cecal. Los ratones se trataron posteriormente con el compuesto 6877002 o 6860766 (10 μmMol/kg a t = 0 h y t = 12 h). Las tasas de supervivencia aumentaron en 150% (6877002) y en un 200% (6860766) (**Figura 12A**), lo que indica que el tratamiento no comprometió la inmunidad sistémica. En otro experimento, los ratones C57B16 se sometieron a peritonitis inducida por tioglicolato para determinar los efectos de los compuestos sobre la respuesta inflamatoria aguda in vivo. El tratamiento con los dos compuestos indujo un perfil de monocitos peritoneales antiinflamatorios con un aumento de la relación de monocitos Ly6C-/bajo/ Ly6Calto (**Figura 12B**). Los resultados combinados indican que los compuestos 6877002 y 6860766 pueden reducir la inflamación sin comprometer la inmunidad sistémica.

Ejemplo 6

Todos los procedimientos mencionados en este ejemplo se llevaron a cabo como se describe en el Ejemplo 2.

El tratamiento con el compuesto reduce la aterosclerosis

Para analizar los efectos de estos compuestos en la aterosclerosis, los ratones *Apoe*-/- se trataron con compuestos 6877002 o 6860766 a 10 μmol/kg/día durante 6 semanas, a partir de la edad de 12 semanas. Esto no afectó el peso corporal ni los niveles de colesterol en plasma (**Figura 13 A y B**). Además, no se detectaron diferencias en los recuentos de leucocitos en sangre periférica ni en la distribución de células inmunitarias entre los ratones tratados con el compuesto y los tratados con el vehículo (**Figura 13C**), lo que indica que el tratamiento a largo plazo con los compuestos 6877002 y 6860766 no causó toxicidad de los leucocitos in vivo. 56 lesiones ateroscleróticas en el arco aórtico de los ratones tratados con control (n = 15, *media* 3,73 placas/aorta), 38 lesiones de ratones tratados con 6877002 (n = 14, media 2,71 placas/aorta) y 36 lesiones de ratones tratados con 6860766 (n = 12, media 3 placas/aorta) se analizaron por histología. El tratamiento con el compuesto redujo el área total de la placa aterosclerótica por arco aórtico en un 47,1% (6877002) y un 66,8% (6860766) en comparación con los ratones tratados con vehículo (**Figura 7A y C**). Las aortas de ratones tratados contenían lesiones ateroscleróticas menos avanzadas (ateromas de cápsula fibrosa), en comparación con los controles (**Figura 7B**). En consecuencia, aumentó la frecuencia de lesiones ateroscleróticas iniciales (xantoma intimal y engrosamiento intimal patológico) (**Figura 7B**), lo que indica que se inhibió la progresión de la aterosclerosis. El tratamiento con el compuesto redujo el número de leucocitos por placa en 43.1% (6877002) y 52.6% (6860766) **(Figura 7D).** El análisis de subconjuntos de leucocitos reveló que el contenido de monocitos/macrófagos (Mac3 +) (**Figura 7F**), así como de granulocitos (Ly6G +) (**Figura 7G**) y de células T (CD3+) (**Figura 7E**) había disminuido significativamente con el tratamiento con los compuestos inhibidores de CD40-TRAF6. Para ambos compuestos, no se observaron diferencias en el número de células apoptóticas (TUNEL+), células de músculo liso (αSMA+) y contenido de colágeno (Sirius Red+). El tratamiento con cualquiera de los dos compuestos previene la progresión de la aterosclerosis en ratones e induce un fenotipo favorable de placa aterosclerótica que es bajo en inflamación.

Ejemplo 7

Todos los procedimientos mencionados en este ejemplo se llevaron a cabo como se describe en el Ejemplo 2.

El tratamiento con el compuesto altera el reclutamiento de leucocitos en la pared arterial

Para dilucidar si la disminución del número de leucocitos en la placa en ratones tratados con el compuesto resultó de alteraciones en el reclutamiento de leucocitos en el endotelio, se realizaron experimentos de adhesión in vivo. La microscopia intravital demostró que los compuestos redujeron el reclutamiento de leucocitos, especialmente monocitos y granulocitos, a la pared arterial de los ratones *Apoe*-/- (**Figura 8A**). Los compuestos 6877002 y

6860766 redujeron la adhesión de monocitos en 40.1% y 51.2% respectivamente (**Figura 8A**), y la adhesión de neutrófilos en 40.2% y 51.2% respectivamente (**Figura 8A**).

Las quimioquinas desempeñan un papel fundamental en el reclutamiento de leucocitos. Por lo tanto, se analizó si los compuestos afectan la expresión de quimioquinas. Los compuestos también inhibieron la expresión de los pares de quimioquinas CCL2-CCR_2 y CCL5-CCR5 en macrófagos derivados de la médula ósea tras la activación de la señalización de CD40 (**Figura 8B**). Se sabe que ambos pares de quimioquinas promueven la acumulación de células mieloides dentro de la pared arterial durante la aterogénesis.

Ejemplo 8

Todos los procedimientos mencionados en este ejemplo se llevaron a cabo como se describe en el Ejemplo 2.

El tratamiento con el compuesto mejora el fenotipo inflamatorio de macrófagos

Después de la adhesión al endotelio activado, los leucocitos contribuyen de manera crítica a la inflamación en curso mediante la secreción de citoquinas y especies reactivas de oxígeno. Por lo tanto, se analizó si el tratamiento con el compuesto afectaba la expresión de mediadores inflamatorios en macrófagos derivados de la médula ósea, porque estos representan la mayoría de los leucocitos en placas ateroscleróticas. La expresión inducida por CD40 de TNFα, IL1β, IL6, IL10 e IL12 disminuyó significativamente tanto en macrófagos tratados con 6877002 como en 6860766 (**Figura 8B**). El tratamiento con los compuestos también redujo la expresión de iNOS en 67.7% y 80.6% para 6877002 y 6860766 respectivamente. Estos datos demuestran que el tratamiento con el compuesto atenúa la propensión inflamatoria de los macrófagos.

Ejemplo 9

Animales

Los ratones C57B16 (Janvier, Saint Berthevin Cedex, Francia) se alimentaron con una dieta rica en grasas durante 12 semanas, reciben el compuesto 6877002 o el control (10 µmol/kg/día) durante 6 semanas i.p.

Todos los ratones se mantuvieron bajo un ciclo de luz-oscuridad de 12 horas y se les permitió el acceso libre a alimentos y agua. La ingesta de alimentos y el peso corporal se midieron semanalmente. Después del período experimental, los animales se sometieron a eutanasia, se recolectó sangre y los órganos se diseccionaron o almacenaron a -80 ºC para un análisis adicional.

Mediciones bioquímicas y prueba de tolerancia a glucosa/insulina

Se realizó una prueba de tolerancia a la insulina (ITT) y se midieron los niveles de insulina en ayunas. Para la ITT, se inyectaron 5 h de ratones en ayunas i.p. con insulina (0,75-2 mU/g, Actrapid, Novonordisk, Bagsvaerd, Dinamarca o Huminsulin, Lilly, Bad Homburg, Alemania). Los niveles de glucosa se midieron a partir de sangre completa con un glucómetro (Roche Diagnostics, Basel, Suiza) o un dispositivo medidor de glucosa (Accu-Chek, Roche, Mannheim, Alemania). Los niveles de insulina en ayunas se midieron en plasma mediante un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (Mercodia, Uppsala, Suecia y Chrystal Chem Inc., IL, USA). Los niveles de colesterol se midieron utilizando un ensayo colorimétrico (CHOD-PAP, Roche, Mannheim, Alemania) y triglicéridos mediante un ensayo enzimático (Wako, Neuss, Alemania). Alternativamente, los niveles de triglicéridos y colesterol se controlaron usando el sistema Accutrend Plus (Roche, Mannheim, Alemania), mientras que el contenido de triglicéridos en el hígado se evaluó con un kit de cuantificación de triglicéridos (Abcam, Cambridge, Reino Unido).

Análisis citométrico de flujo

Las células de estroma-vasculares (SVC) se aislaron de AT (tejido adiposo) subcutáneo o gonadal utilizando colagenasa (Sigma-Aldrich, Zwijndrecht, Países Bajos o Invitrogen, Darmstadt, Alemania). Las muestras se incubaron a 37 ºC con agitación hasta la digestión completa, se pasaron a través de un filtro de células (Falcon, distribuido por BD biosciences, Breda, Países Bajos), se lavaron y se centrifugaron para obtener el sedimento de SVC final. Los bazos se lavaron después de la lisis de eritrocitos. El bloqueo de Fc (anticuerpo CD16/32) se realizó antes de la marcación celular. FACS para CD3, CD4, CD8, CD25, FoxP3, Ly6G, Ly6C, MHCII, B220, CD11c, CD11b, F4/80, CD206, CD44, CD45, CD62L, CD31 y CD19 se realizó en SVC. Todos los anticuerpos se adquirieron de e-Biosciences (San Diego, CA, USA), BD Pharmingen (distribuido por BD Biosciences), Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Alemania) o BioLegend (Fell, Alemania). Los análisis se realizaron en un FACS Canto II (BD, Heidelberg, Alemania), usando el software FACSDiva 6.1.3.

PCR de tiempo real

El ARN total se extrajo utilizando Trizol (Invitrogen). El ADNc se sintetizó usando el kit de síntesis de ADNc de i-Script (BIO-RAD). Los PCR se realizaron con un instrumento y software Bio-Rad en condiciones estándar. Las cantidades relativas de los diferentes ARNm se cuantificaron utilizando el procedimiento del segundo derivado máximo. En otros experimentos, los niveles de expresión relativos de cada gen se cuantificaron mediante el uso de

SsoFast EvaGreen Supermix (BioRad). Los resultados se expresaron en relación con el grupo de control (ratones tratados con vehículo).

Análisis estadístico

Los resultados se indican como medios 6 SEM. Los datos se analizaron mediante una prueba T de Student o una prueba U de Mann-Whitney. Los resultados de la ITT y del aumento de peso corporal se analizaron mediante un ANOVA de 2 vías. La significancia se ajustó en P <0.05.

Ejemplo 10

Todos los procedimientos mencionados en este ejemplo se llevaron a cabo como se describe en el Ejemplo 9.

La inhibición farmacológica de la vía CD40-TRAF6 mejoró las complicaciones metabólicas relacionadas a la obesidad

Los ratones C57B16 se alimentaron con una HFD durante 6 semanas, y posteriormente recibieron el compuesto inhibidor de molécula pequeña 6877002 (para la fórmula estructural ver **Figura 6B**), durante otras 6 semanas. Después de este corto período de tratamiento, los ratones tratados con 6877002 no mostraron un cambio en el peso, pero ya mostraron una sensibilidad a la insulina mejorada en comparación con los ratones tratados con vehículo (**Figura 14A, B**). Además, la inflamación gonAT (tejido adiposo gonadal) fue menos grave después del tratamiento con 6877002, con una reducción notable de macrófagos y especialmente de macrófagos CD11b+F4/80+CD11c+ (M1) (**Figura 14C**). Curiosamente, el tratamiento con el compuesto inhibidor de CD40-TRAF6 redujo la esteatosis hepática (**Figura 14D**). Por lo tanto, los compuestos de acuerdo con la presente invención son efectivos en el tratamiento de la obesidad, especialmente para mejorar las complicaciones metabólicas como la resistencia a la insulina y la esteatosis, y para reducir la entrada de macrófagos y células T en el tejido adiposo.

REFERENCIAS

[1] Weber C, Noels H. Atherosclerosis: current pathogenesis and therapeutic options. Nat Med 2011; 17: 1410-1422.

[2] Hansson GK, Hermansson A. The immune system in atherosclerosis. Nat Immunol. 2011;12: 204-212.

[3] Virmani R, Kolodgie FD, Burke AP, Farb A, Schwartz SM. Lessons from sudden coronary death: a comprehensive morphological classification scheme for atherosclerotic lesions. ArteriosclThrombVasc. Biol. 2000; 20:1262-1275.

[4] Lutgens E, Gorelik L, Daemen MJ, de Muinck ED, Grewal IS, Koteliansky VE, Flavell RA. Requirement for CD154 in the progression of atherosclerosis. Nat Med. 1999;5:1313-1316.

[5] Lutgens E, Cleutjens KB, Heeneman S, Koteliansky VE, Burkly LC, Daemen MJ. Both early and delayed anti- CD40L antibody treatment induces a stable plaque phenotype. ProcNatlAcadSci U S A. 2000;97:7464-7469.

[6] Engel D, Seijkens T, Poggi M, Sanati M, Thevissen L, Beckers L, Wijnands E, Lievens D, Lutgens E. The immunobiology of CD154-CD40-TRAF interactions in atherosclerosis. SeminImmunol. 2009;21:308-312.

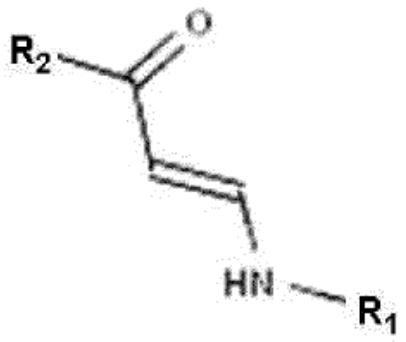
[7] Lutgens E, Lievens D, Beckers L, Wijnands E, Soehnlein O, Zernecke A, Seijkens T, Engel D, Cleutjens J, Keller AM, Naik SH, Boon L, Oufella HA, Mallat Z, Ahonen CL, Noelle RJ, de Winther MP, Daemen MJ, Biessen EA, Weber C. Deficient CD40-TRAF6 signaling in leukocytes prevents atherosclerosis by skewing the immune response toward an antiinflammatory profile. J Exp Med 2010;207:391-404.

[8] M. McGann, FRED pose prediction and virtual screening accuracy. J. Chem. Inf. Model, 51, 578-596 (2011).

[9] A.N. Jain, Surflex: fully automatic flexible molecular docking using a molecular similarity-based search engine. J. Med. Chem., 46, 499-511 (2003).

REIVINDICACIONES

1. Compuesto que tiene la fórmula



(I)

en el que

R_1 es un grupo arilo monocíclico sustituido o no sustituido; y

R_2 es un grupo arilo monocíclico sustituido o no sustituido o un grupo heteroarilo monocíclico sustituido o no sustituido;

o una de sus sales farmacéuticamente aceptables

para uso en el tratamiento de una enfermedad inflamatoria, seleccionada de aterosclerosis, obesidad, artritis reumatoide, sepsis y peritonitis,

en la que los sustituyentes de un grupo sustituido se seleccionan de modo independiente de halógenos y grupos alquilo C_1-C_3.

2. Compuesto para usar de acuerdo con la reivindicación 1, en el que R_2 se selecciona del grupo que consiste en un grupo fenilo sustituido o no sustituido, un grupo tiofenilo sustituido o no sustituido y un grupo furanilo sustituido o no sustituido.

3. Compuesto para usar de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que R_1 es un grupo fenilo sustituido o no sustituido.

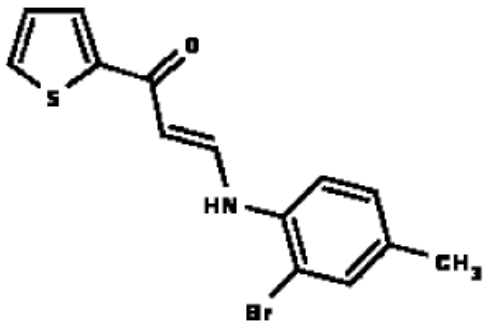
4. Compuesto para usar de acuerdo con la reivindicación 3, en el que dicho grupo fenilo sustituido es un grupo fenilo sustituido con uno o más sustituyentes seleccionados de modo independiente del grupo que consiste en halógenos y grupos alquilo C_1-C_3.

5. Compuesto para usar de acuerdo con la reivindicación 4, en el que dichos sustituyentes se seleccionan del grupo que consiste en -Cl, -Br y $–CH_3$.

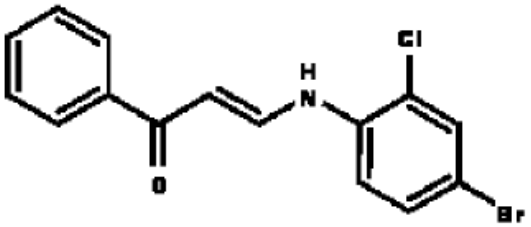
6. Compuesto para usar de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5, en el que R_1 es un grupo fenilo mono- o disustituido.

7. Compuesto para usar de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 3 a 6, en el que dicho grupo fenilo está sustituido en la posición orto- y/o para.

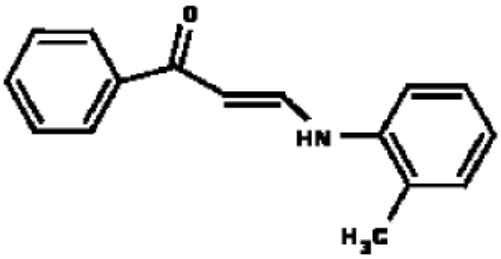
8. Compuesto para usar de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho compuesto tiene una fórmula seleccionada del grupo que consiste en



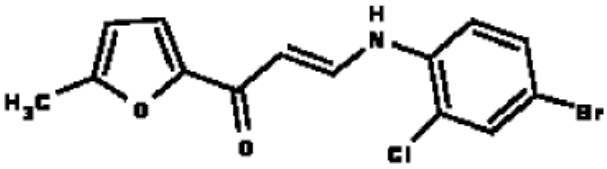
(II)



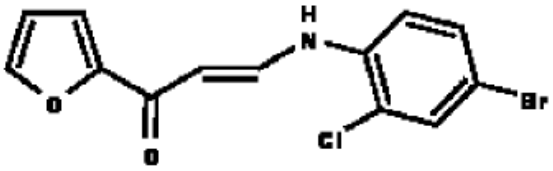
(III)



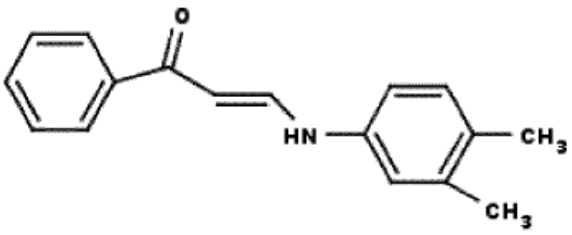
(IV)



(V)

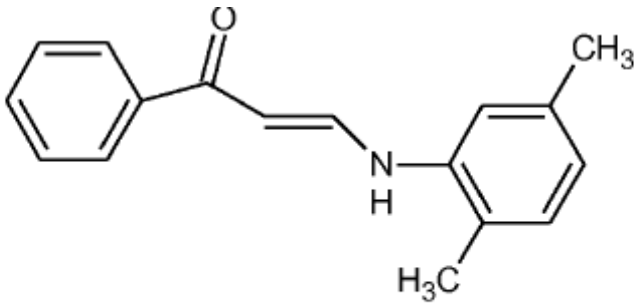


(VI)



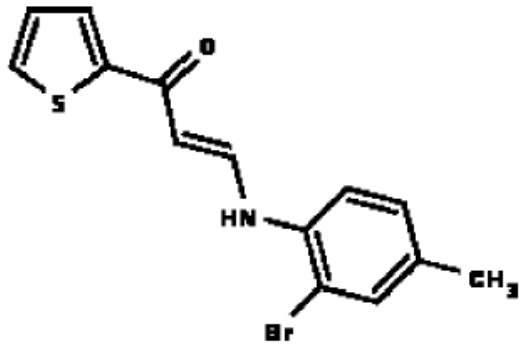
(VII)

y

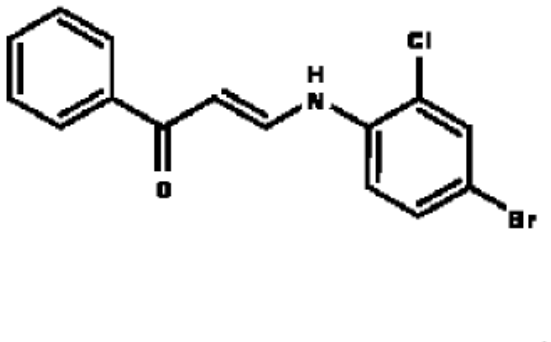


(VIII).

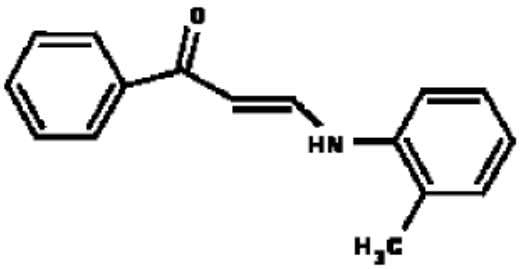
9. Compuesto que tiene una fórmula seleccionada del grupo que consiste en



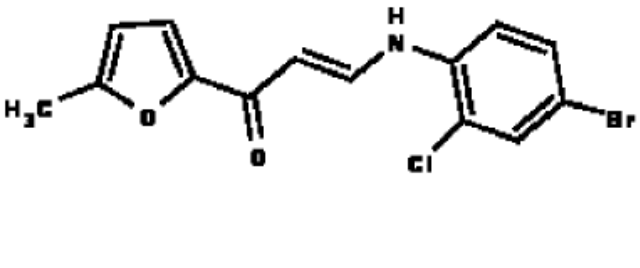
(II)



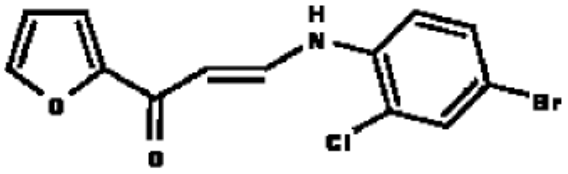
(III)



(IV)

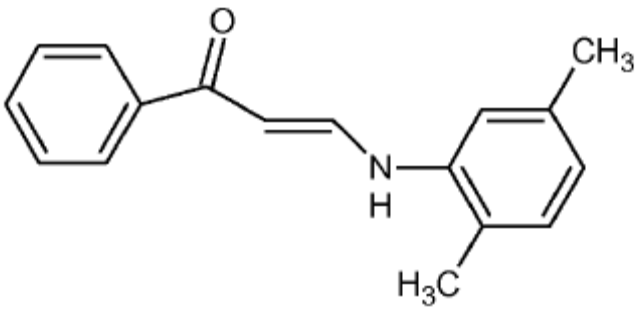


(V)



(VI)

y



(VIII)

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo

para su uso como un medicamento.

Figura 1.

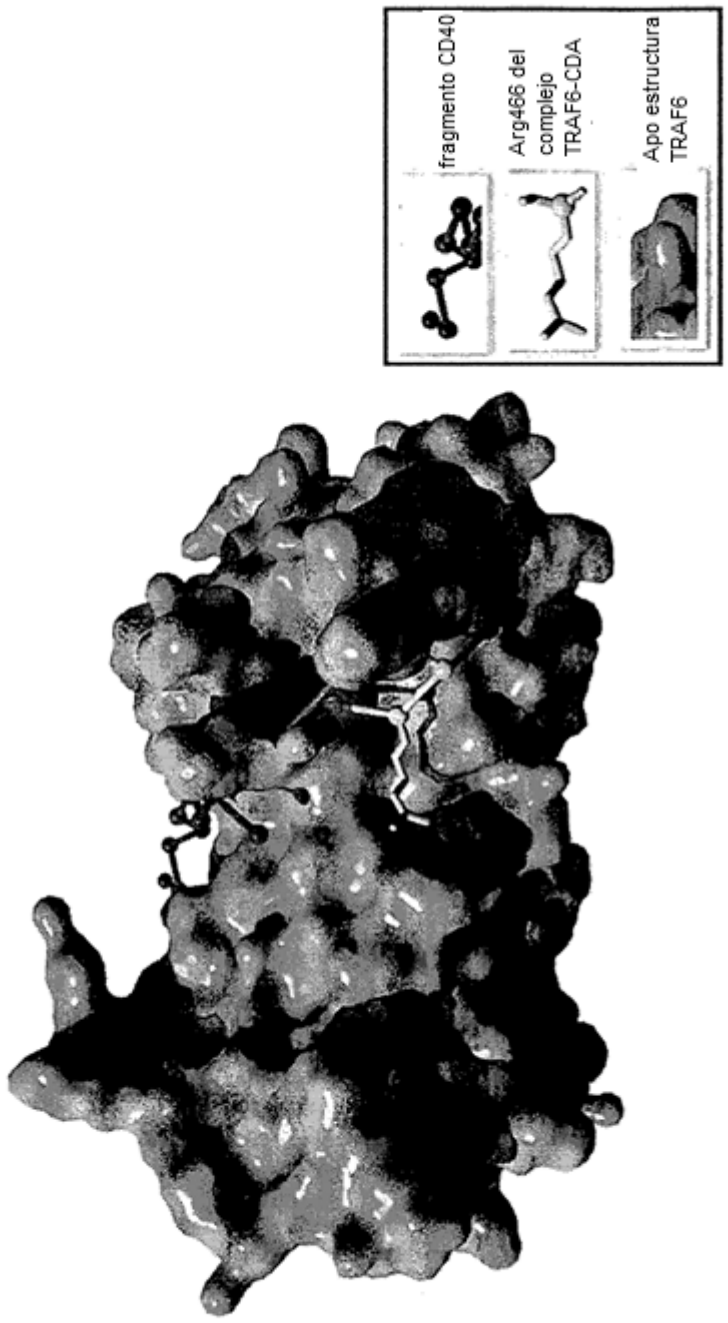

fragmento CD40
Arg466 del complejo TRAF6-CDA
Apo estructura TRAF6

Figura 2 A

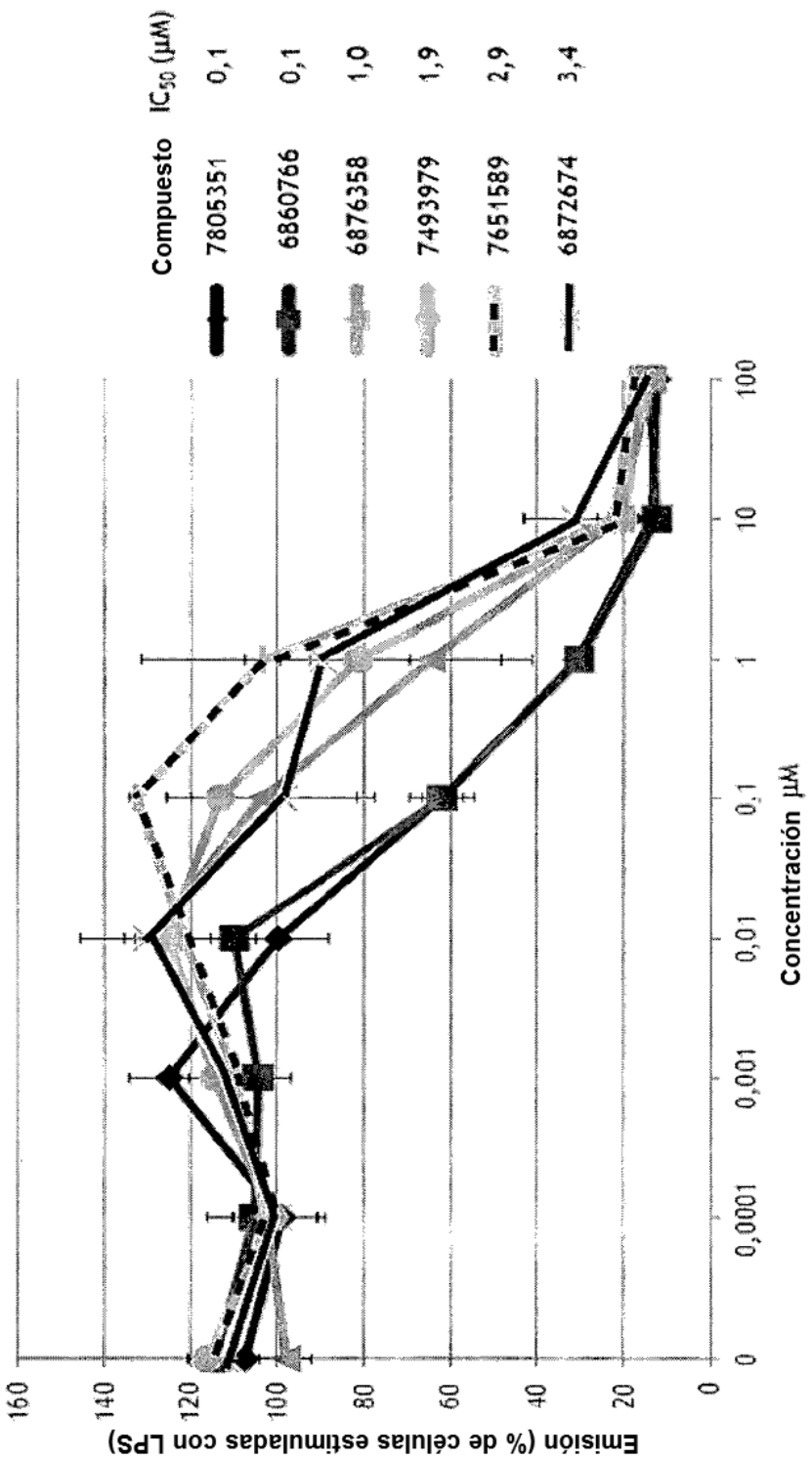

Compuesto
IC50 (µM)
7805351
0,1
6860766
0,1
6876358
1,0
7493979
1,9
7651589
2,9
6872674
3,4
Emisión (% de células estimuladas con LPS)
Concentración µM
0
20
40
60
80
100
120
140
160
0
0,0001
0,001
0,01
0,1
1
10
100

Figura 2 B

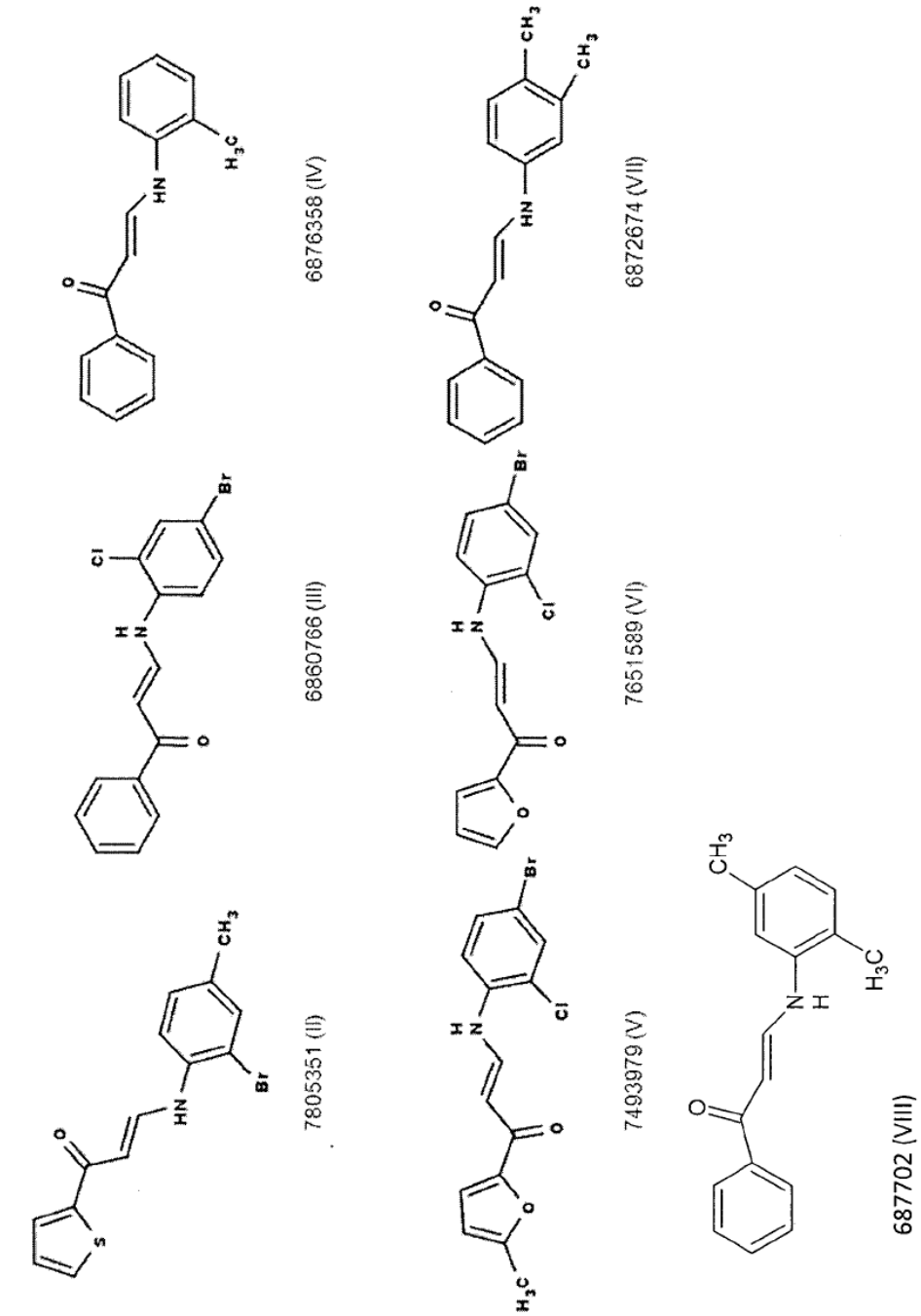

7805351 (II)
6860766 (III)
6876358 (IV)
7493979 (V)
7651589 (VI)
6872674 (VII)
687702 (VIII)

Figura 3

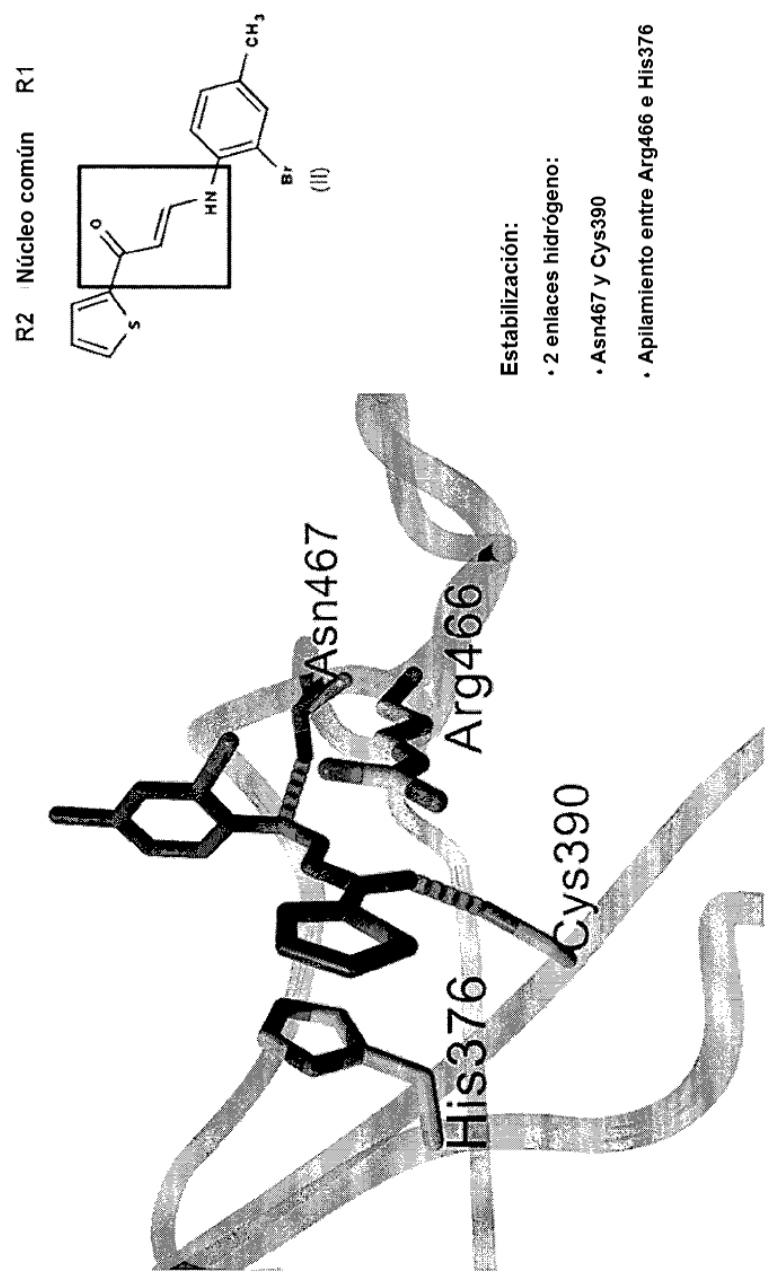

R2 Núcleo común R1
(II)
Estabilización:
• 2 enlaces hidrógeno:
• Asn467 y Cys390
• Apilamiento entre Arg466 e His376
Asn467
Arg466
Cys390
His376

Figura 4

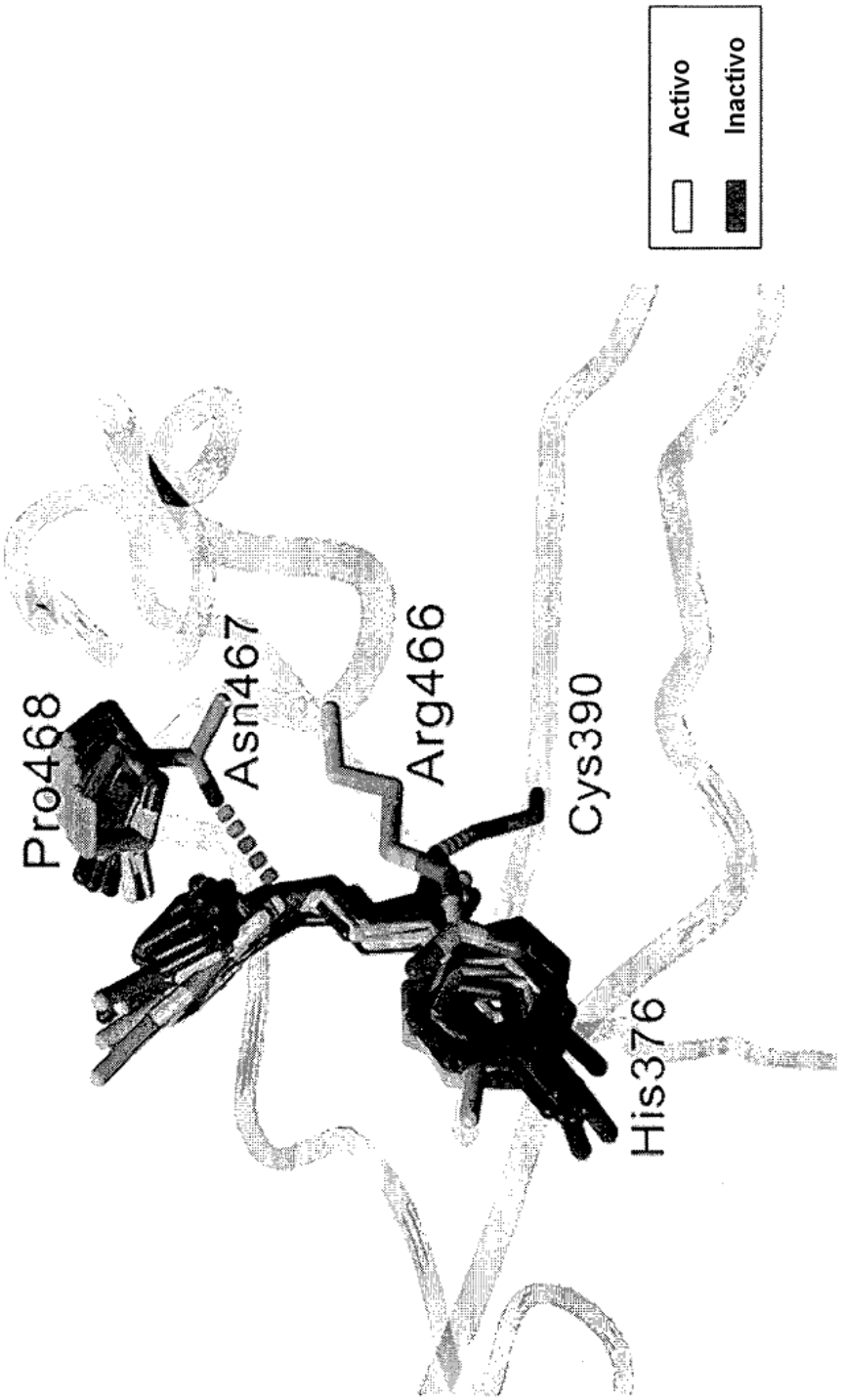


Figura 5

Peritonitis inducida por tioglicolato 18 horas */- compuesto 6872674(VII)

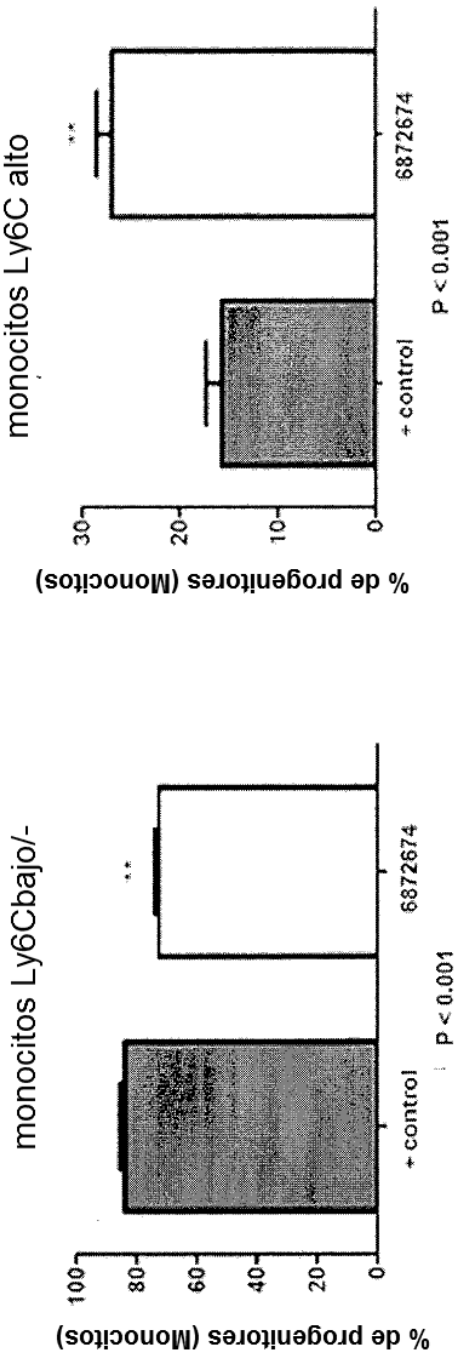
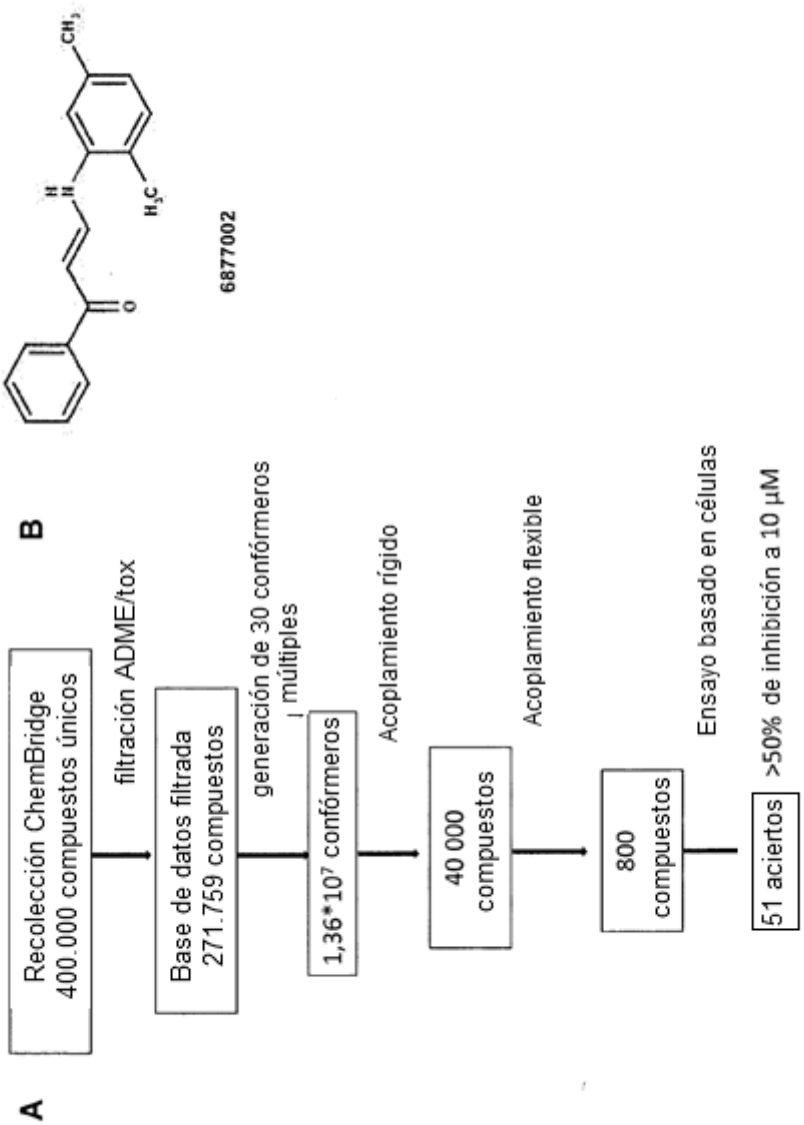


Figura 6 A, B


A
Recolección ChemBridge
400.000 compuestos únicos
filtración ADME/tox
Base de datos filtrada
271.759 compuestos
generación de 30 confórmeros
múltiples
1,36*10^7 confórmeros
Acoplamiento rígido
40 000
compuestos
Acoplamiento flexible
800
compuestos
Ensayo basado en células
51 aciertos
>50% de inhibición a 10 µM
B
6877002

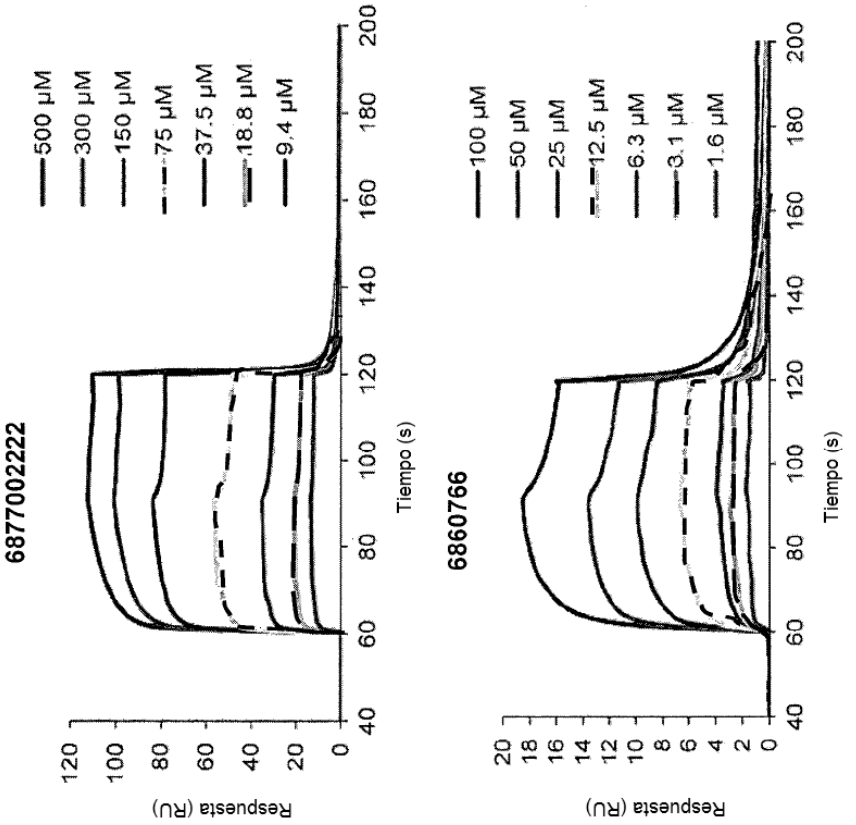

6877002222
500 µM
300 µM
150 µM
75 µM
37.5 µM
18.8 µM
9.4 µM
Respuesta (RU)
Tiempo (s)
6860766
100 µM
50 µM
25 µM
12.5 µM
6.3 µM
3.1 µM
1.6 µM
Respuesta (RU)
Tiempo (s)

Figura 6 C

Figura 7 A-C

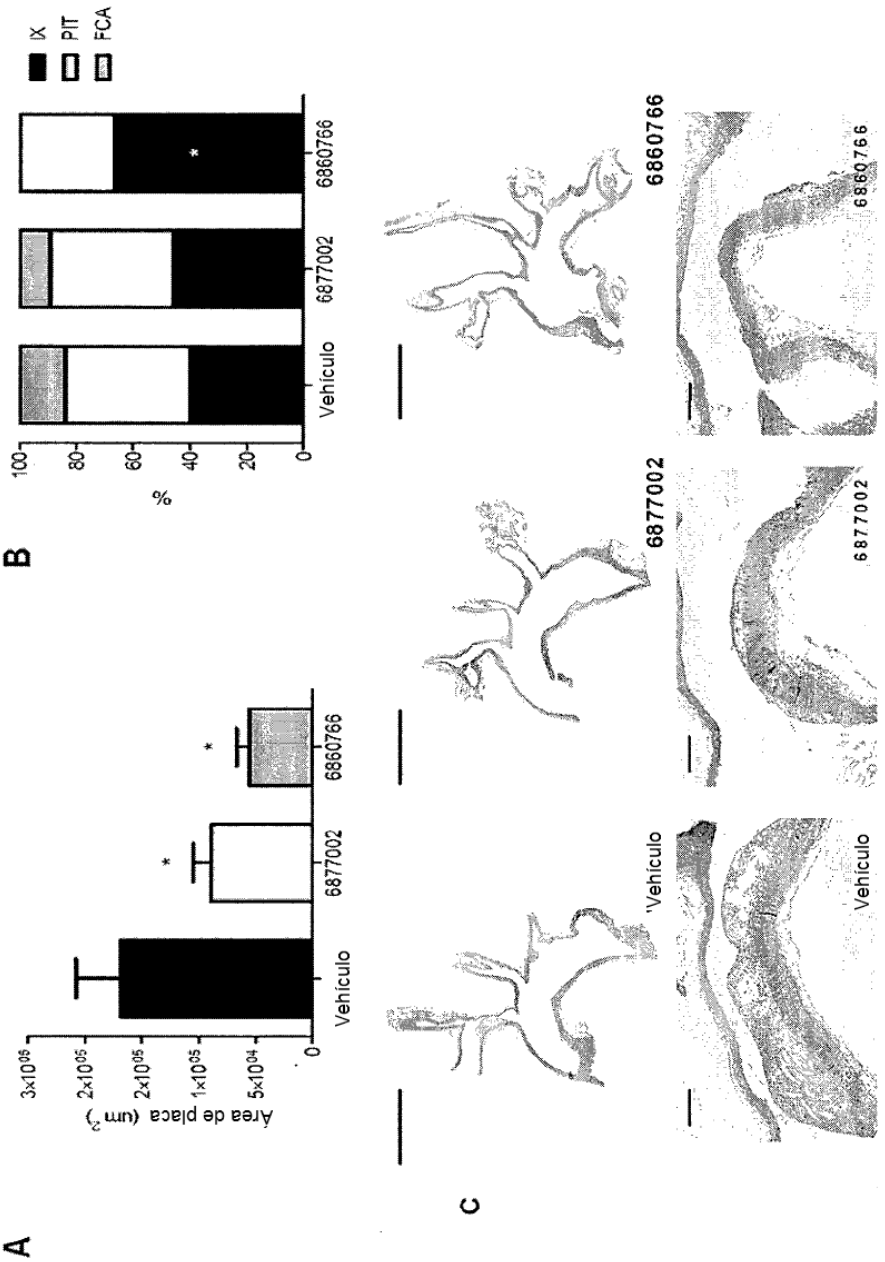

A
Área de placa (um²)
3x10⁵
2x10⁵
2x10⁵
1x10⁵
5x10⁴
0
Vehículo
6877002
6860766
*
*
B
IK
PIT
FCA
%
100
80
60
40
20
0
Vehículo
6877002
6860766
*
C
Vehículo
6877002
6860766

Figura 7 D-G

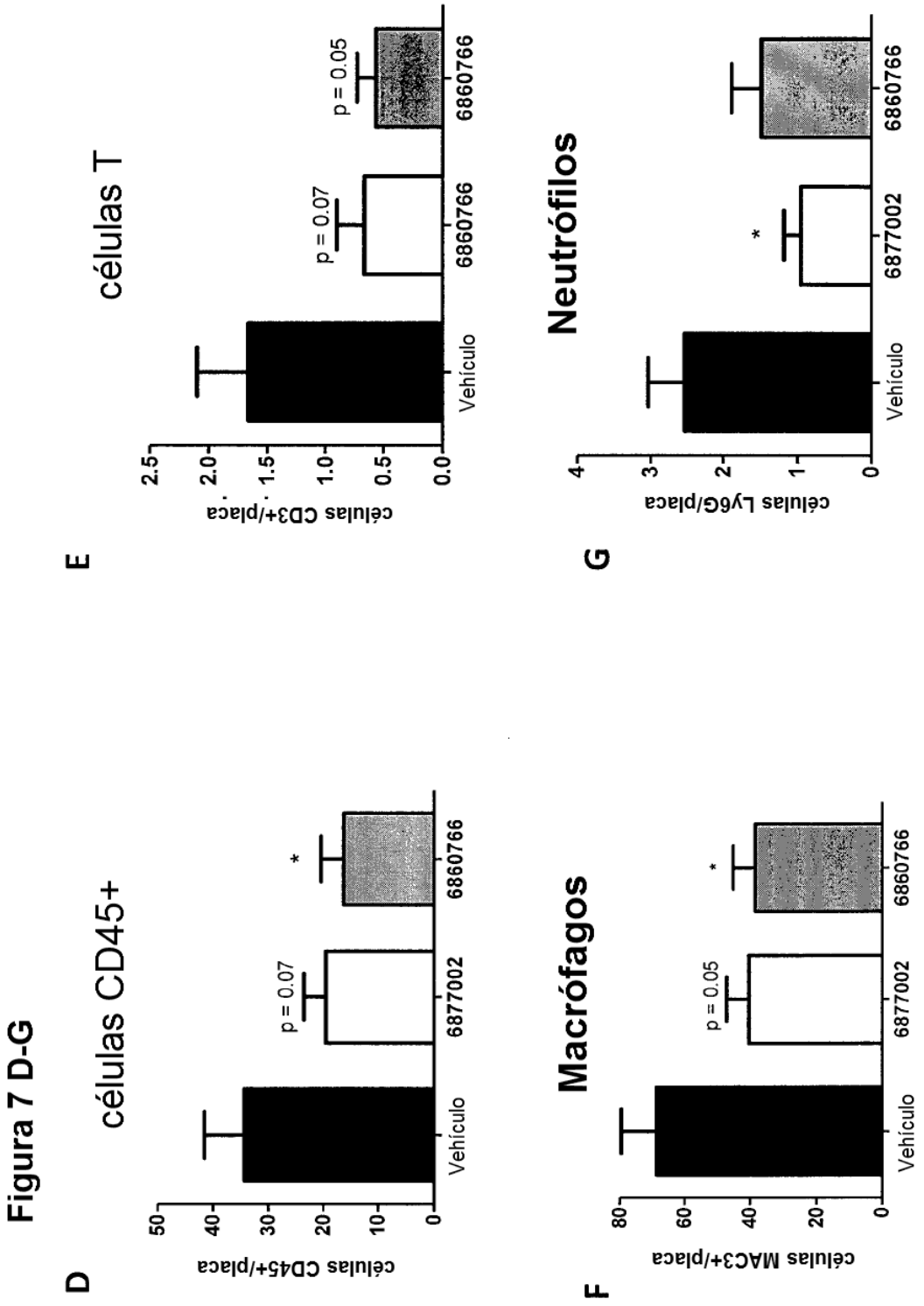

D
células CD45+
células CD45+/placa
50
40
30
20
10
0
p = 0.07
*
Vehículo
6877002
6860766
E
células T
células CD3+/placa
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
p = 0.07
p = 0.05
Vehículo
6860766
6860766
F
Macrófagos
células MAC3+/placa
80
60
40
20
0
p = 0.05
*
Vehículo
6877002
6860766
G
Neutrófilos
células Ly6G/placa
4
3
2
1
0
*
Vehículo
6877002
6860766

Figura 8 A

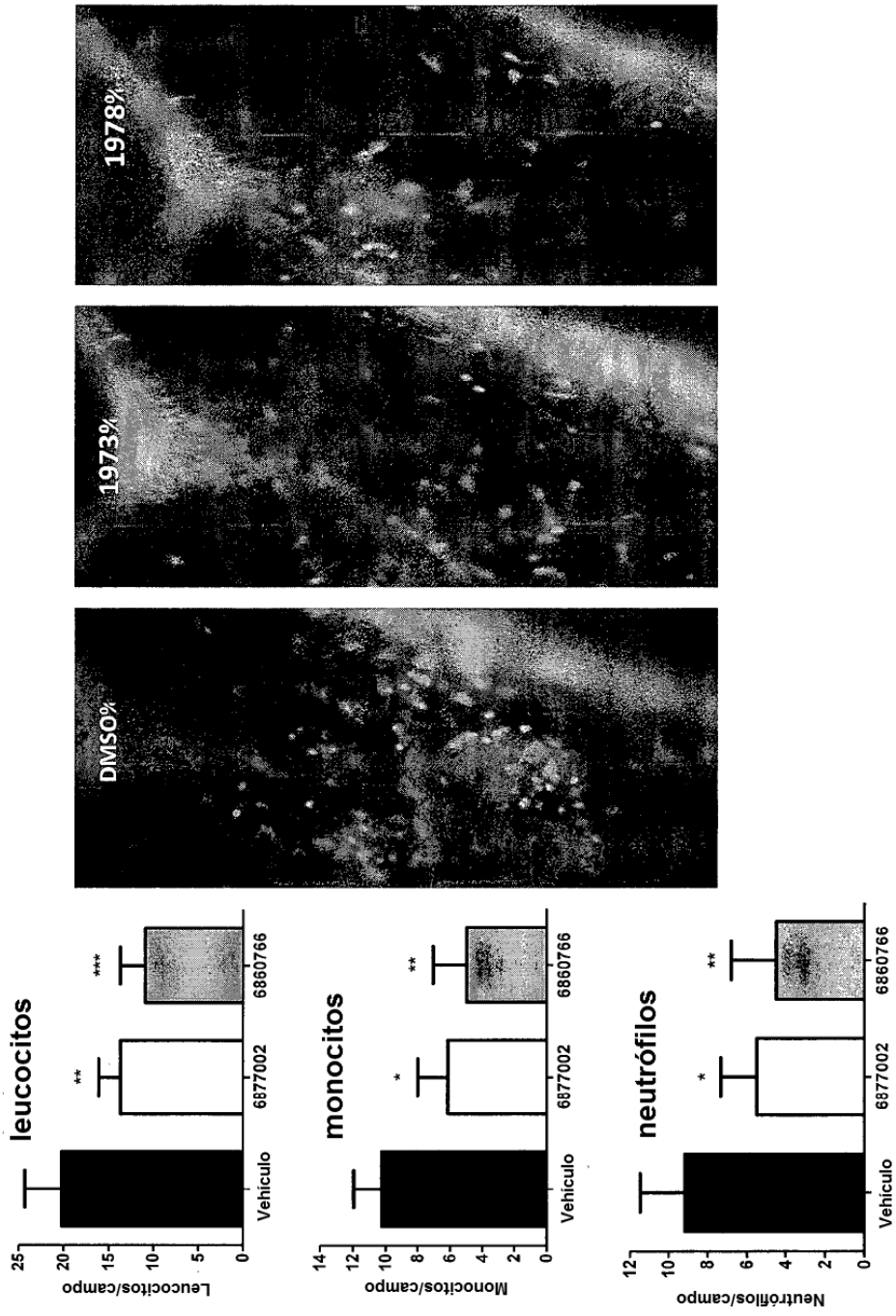

DMSO%
1973%
1978%
leucocitos
Leucocitos/campo
Vehiculo
6877002
6860766
monocitos
Monocitos/campo
neutrófilos
Neutrófilos/campo

Figura 8 B parte 1

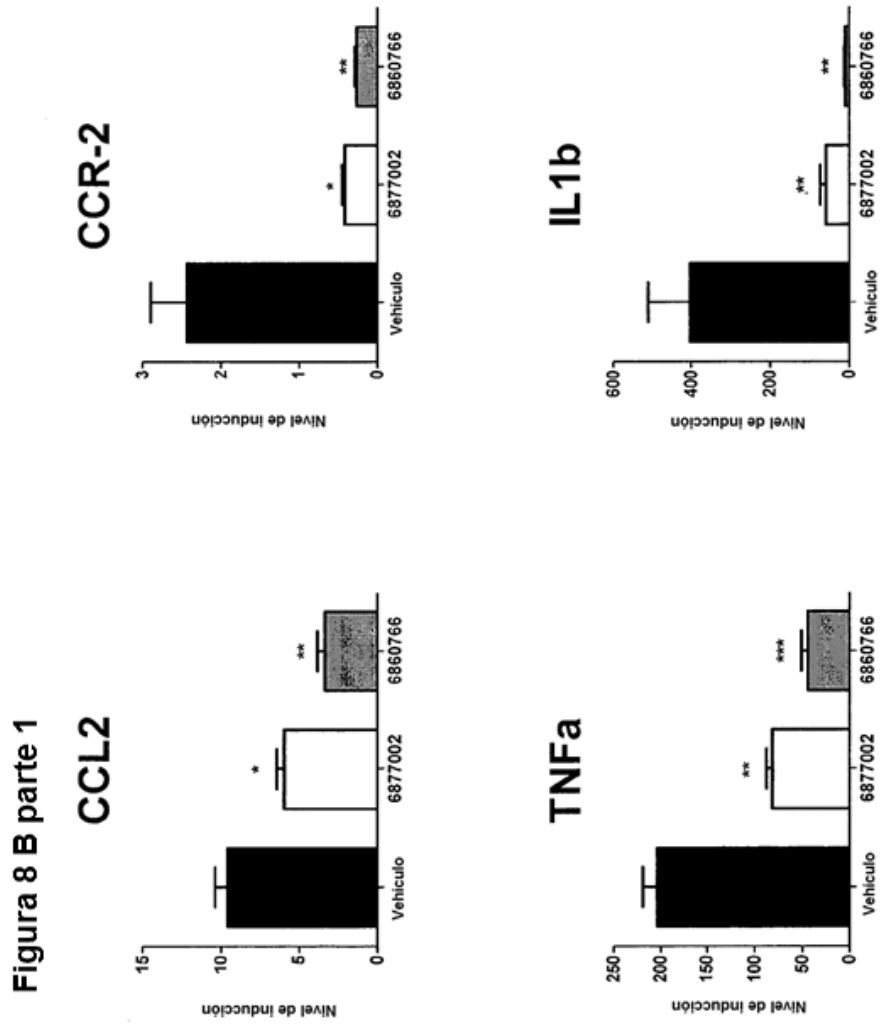


Figura 8 B parte 2

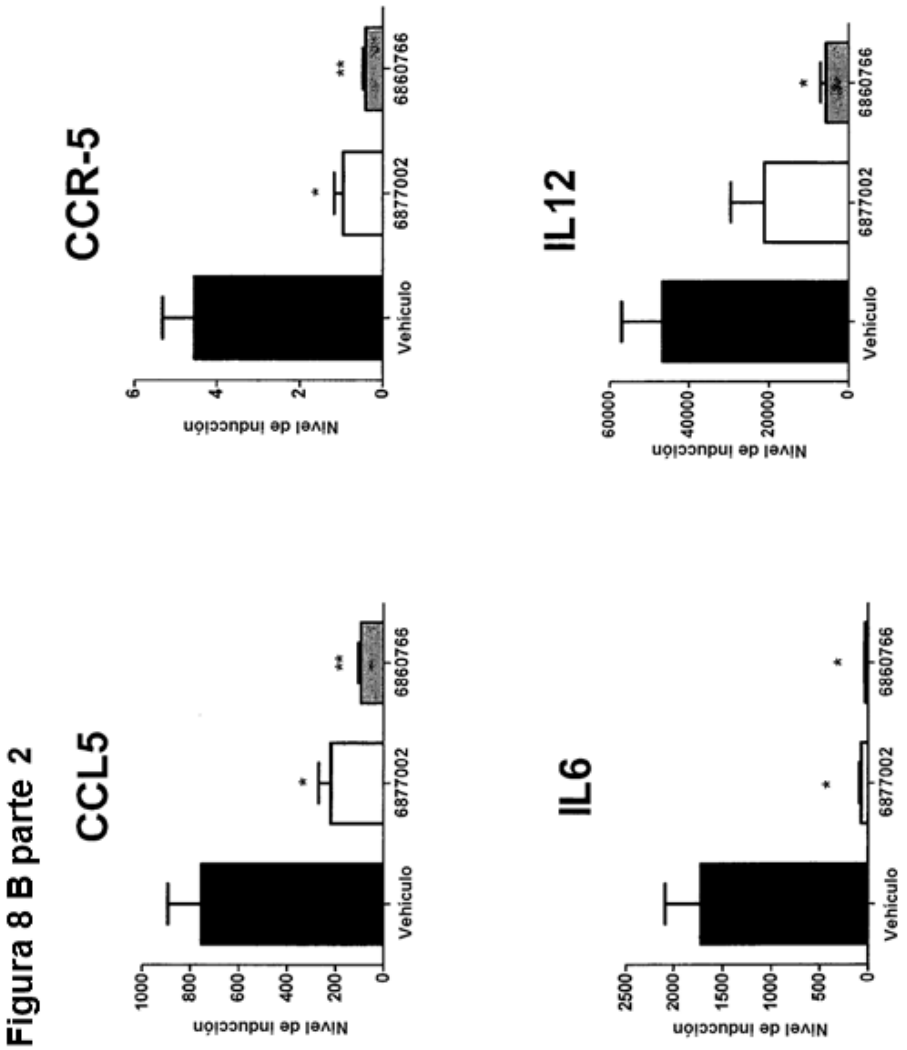
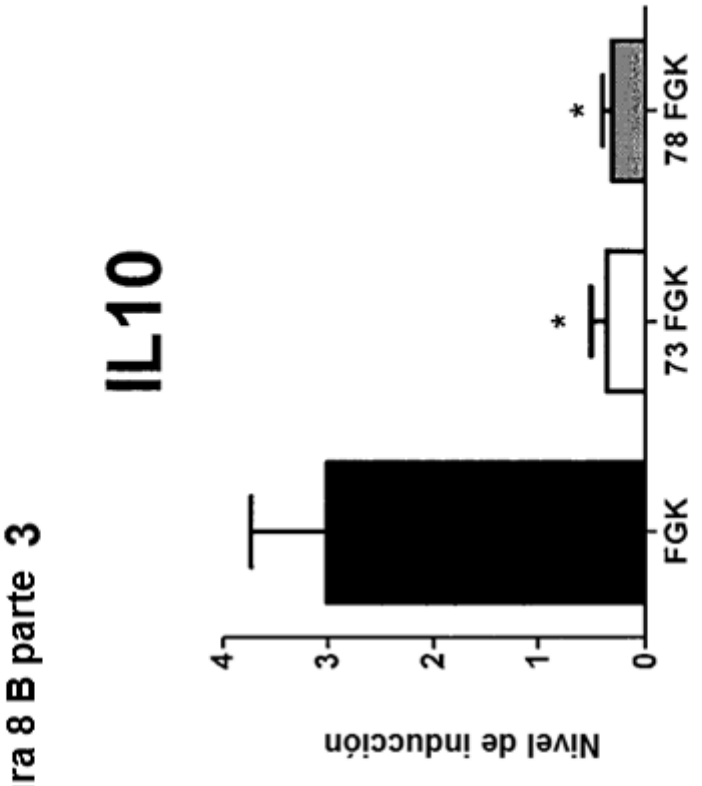


Figura 8 B parte 3



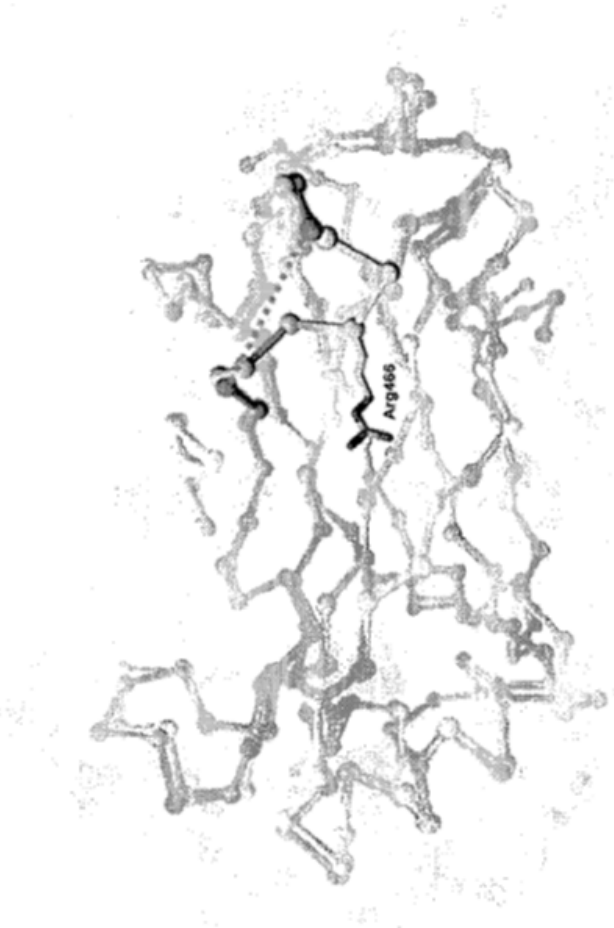


Figura 9

Figura 10

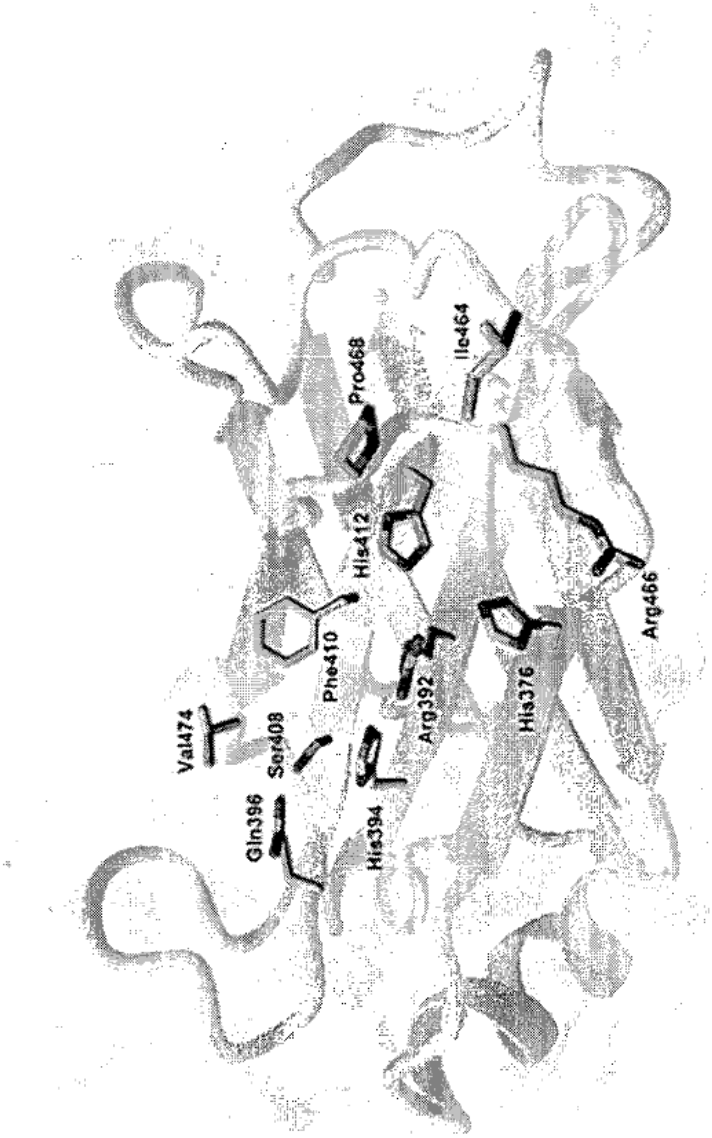

Pro468
Ile464
His412
Phe410
Arg392
His376
Arg466
Val474
Ser408
Gln396
His394

Figura 11

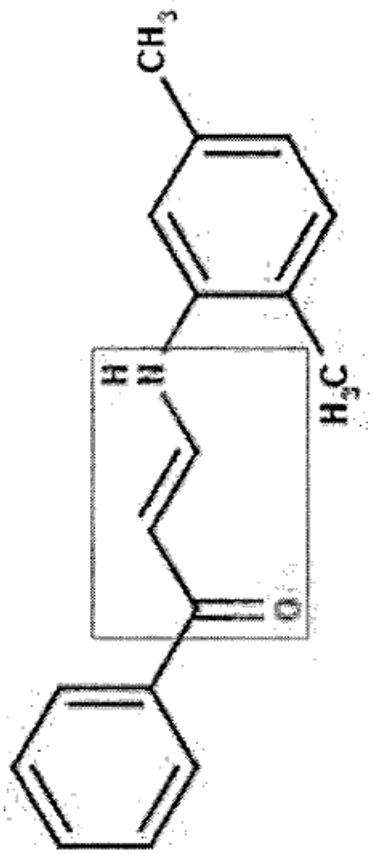


Figura 12

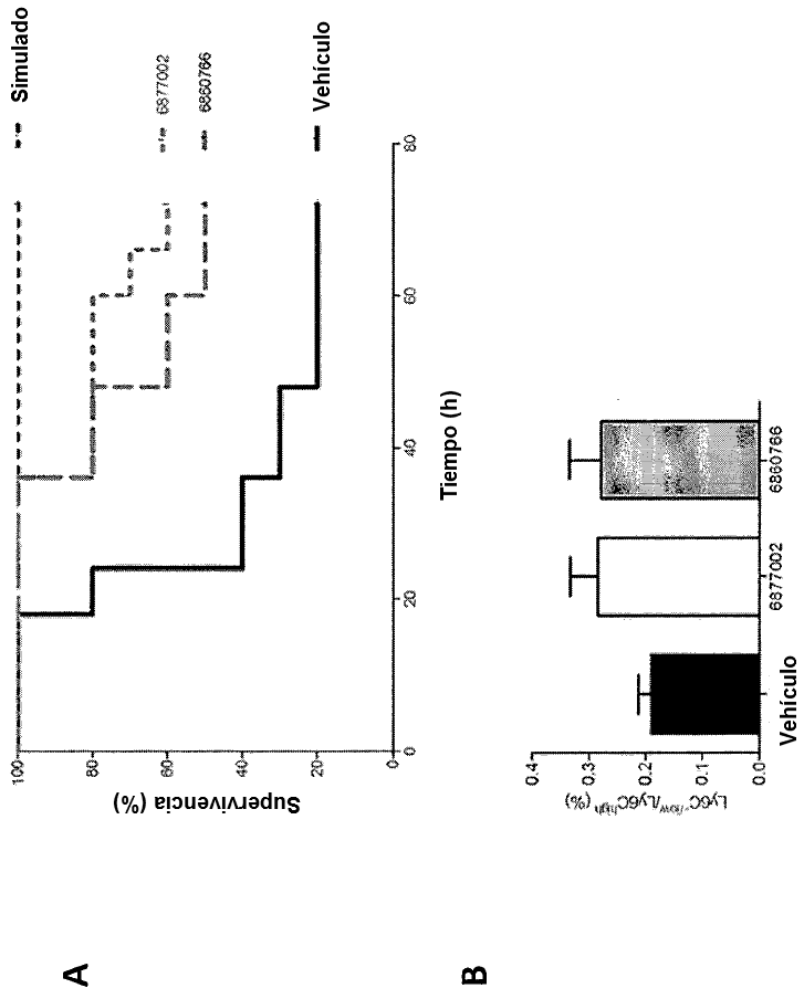

A
Supervivencia (%)
100
80
60
40
20
0
0
20
40
60
80
Tiempo (h)
Simulado
6877002
6860766
Vehículo
B
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
Vehículo
6877002
6860766

Figura 13

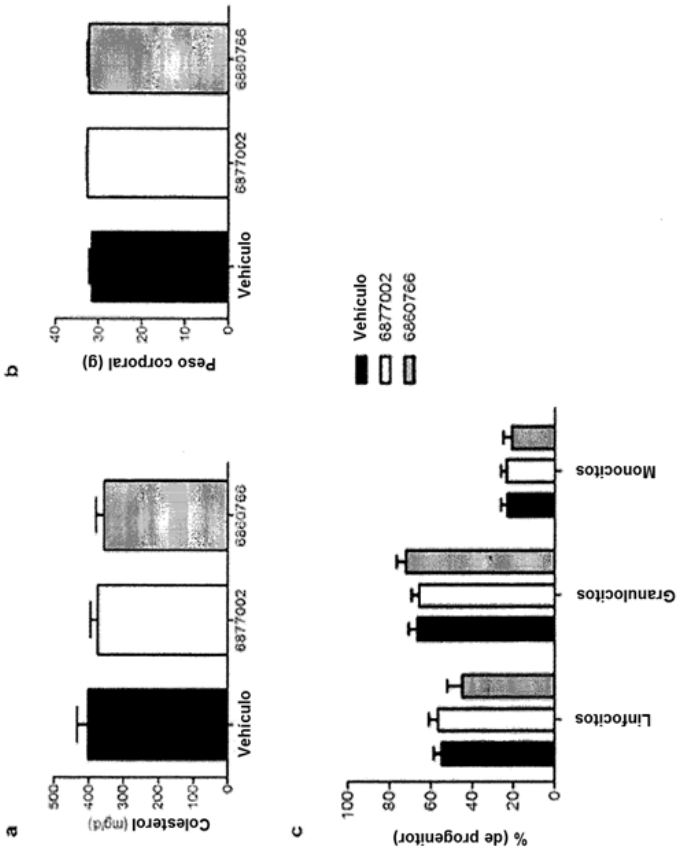
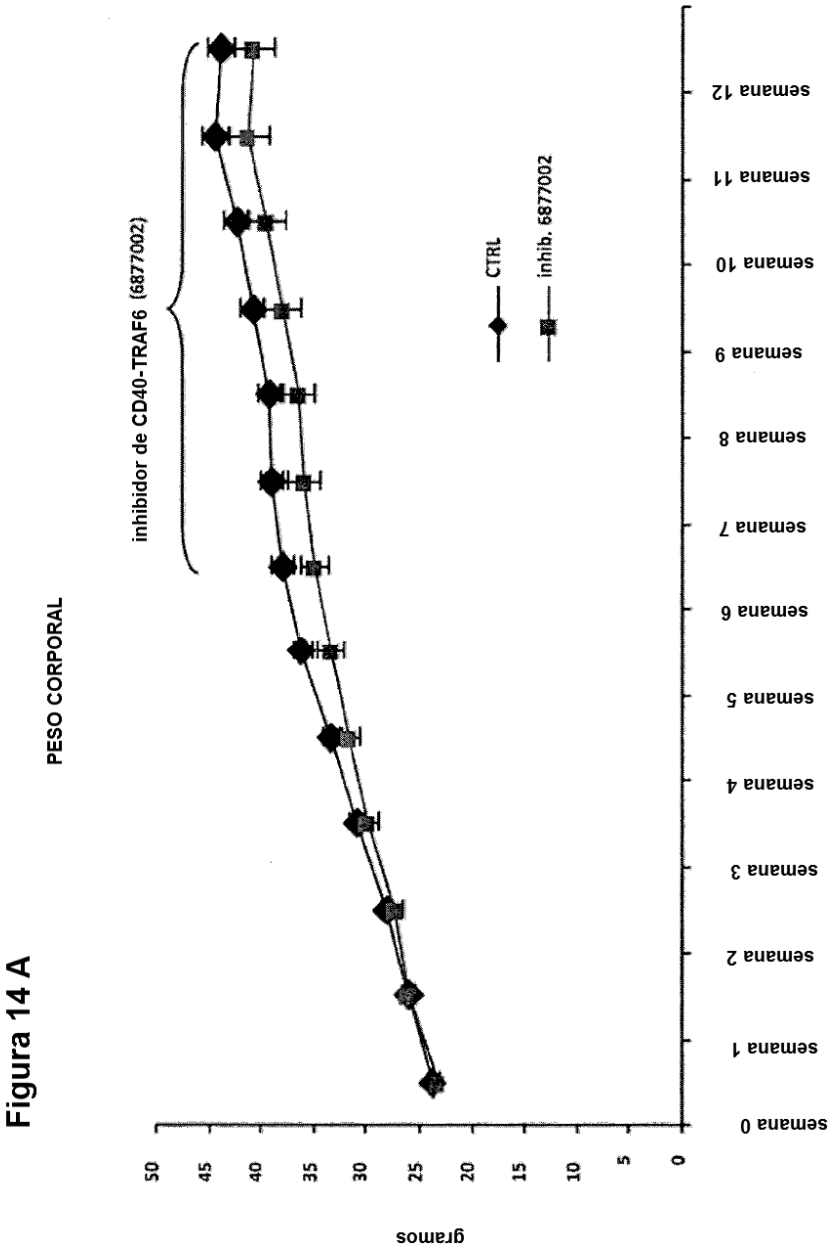

a
Colesterol (mg/d)
500
400
300
200
100
0
Vehículo
6877002
6860766
b
Peso corporal (g)
40
30
20
10
0
Vehículo
6877002
6860766
c
% (de progenitor)
100
80
60
40
20
0
Linfocitos
Granulocitos
Monocitos
Vehículo
6877002
6860766

Figura 14 A


PESO CORPORAL
inhibidor de CD40-TRAF6 (6877002)
CTRL
inhib. 6877002
gramos
0
5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
semana 0
semana 1
semana 2
semana 3
semana 4
semana 5
semana 6
semana 7
semana 8
semana 9
semana 10
semana 11
semana 12

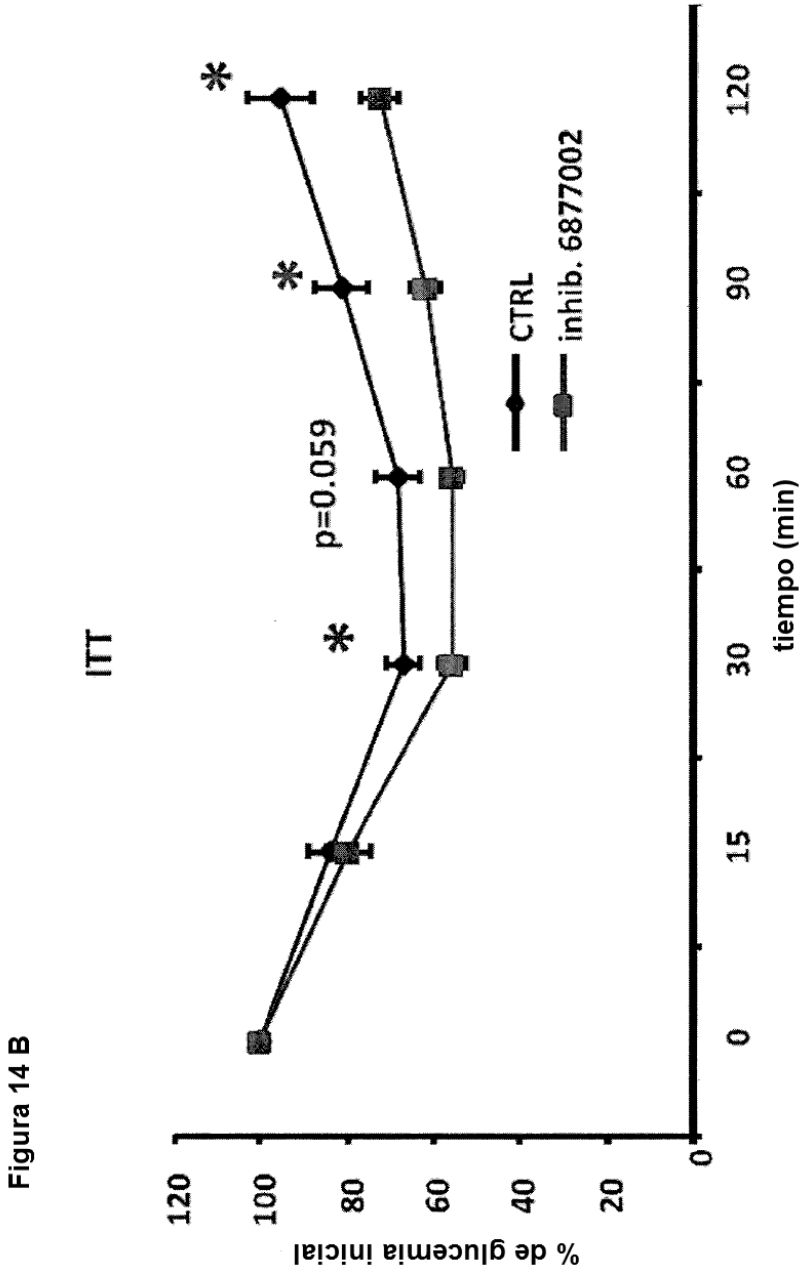
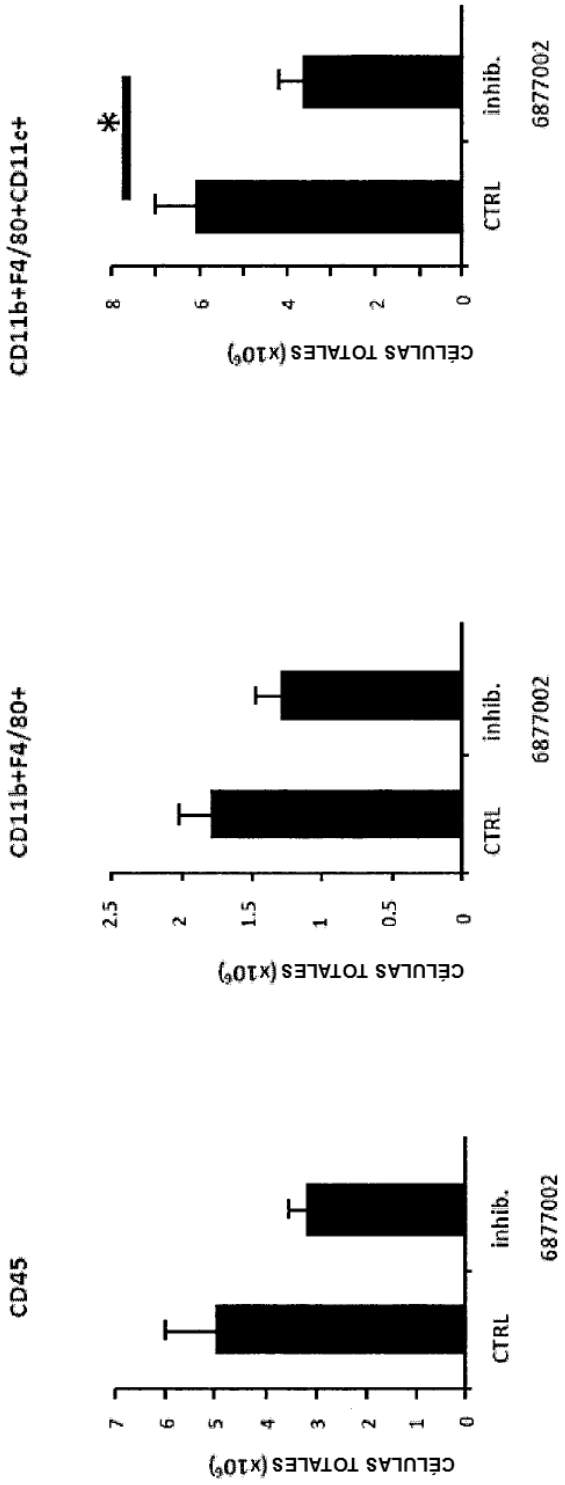

ITT
p=0.059
CTRL
inhib. 6877002
% de glucemia inicial
tiempo (min)
120
100
80
60
40
20
0
0
15
30
60
90
120

Figura 14 B

Figura 14 C


CD45
CD11b+F4/80+
CD11b+F4/80+CD11c+
CÉLULAS TOTALES (x10⁶)
CTRL
inhib.
6877002
*

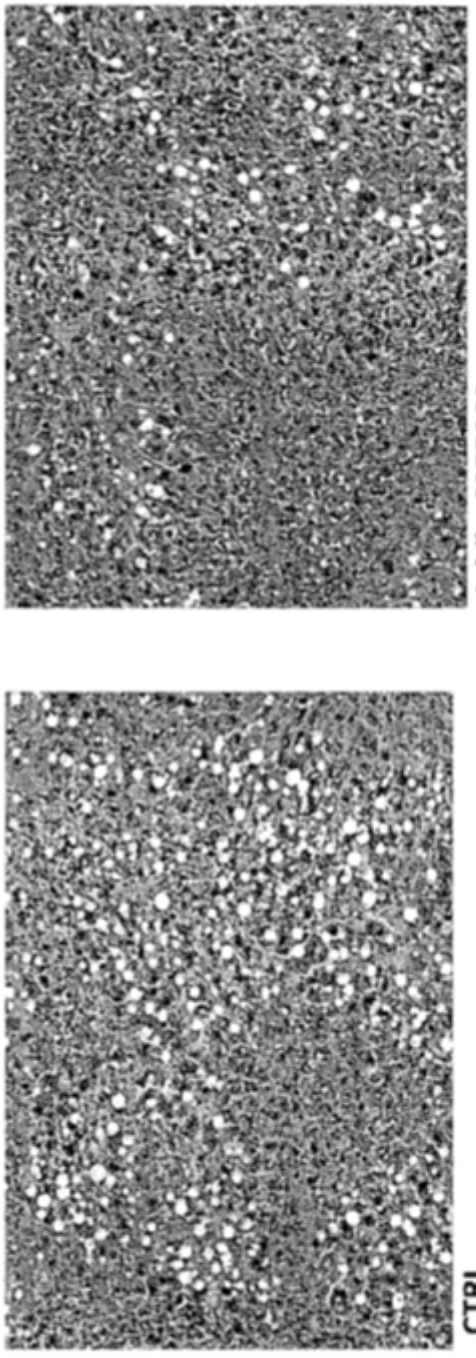


Figura 14 D