

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 738 658**

51 Int. Cl.:

A61K 31/404 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61K 31/40 (2006.01)

A61P 29/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.03.2014 PCT/KR2014/002504**

87 Fecha y número de publicación internacional: **02.10.2014 WO14157918**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.03.2014 E 14776253 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.05.2019 EP 2992881**

54 Título: **Composición farmacéutica para inhibir la respuesta inmunitaria a través de la inducción de la diferenciación en células T reguladoras y la promoción de la proliferación de células T reguladoras**

30 Prioridad:

25.03.2013 KR 20130031660

05.07.2013 KR 20130078785

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

24.01.2020

73 Titular/es:

LG CHEM, LTD. (100.0%)

**128, Yeoui-daero, Yeongdeungpo-gu
Seoul 07336, KR**

72 Inventor/es:

CHO, SEOK GOO;

KIM, NA YOUN;

KIM, EUN JUNG;

IM, KEON IL;

LIM, JUNG YEON y

JEON, EUN JOO

74 Agente/Representante:

FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás

ES 2 738 658 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

Composición farmacéutica para inhibir la respuesta inmunitaria a través de la inducción de la diferenciación en células T reguladoras y la promoción de la proliferación de células T reguladoras

5

Campo técnico

La presente invención se refiere a un nuevo uso médico de (tetrahidropiran-4-il)-[2-fenil-5-(1,1-dioxo-tiomorfolin-4-il)metil-1H-indol-7-il]amina. Más específicamente, la presente invención se refiere a un método para la prevención o el tratamiento de diversas enfermedades inmunitarias, incluida la enfermedad de injerto contra huésped (EICH) a través de la acción de (tetrahidropiran-4-il)-[2-fenil-5-(1,1-dioxo-tiomorfolin-4-il)metil-1H-indol-7-il]amina para inducir la diferenciación y promover la proliferación de células T reguladoras, y la acción reguladora inmunitaria de las células T reguladoras activadas; una composición farmacéutica para su uso en dicho método; y un método para obtener células T reguladoras para su uso en la prevención o el tratamiento de enfermedades inmunitarias mediante el uso de la composición farmacéutica.

10

15

Antecedentes de la técnica

La inmunidad se refiere a la acción de autoprotección de sustancias extrañas al reconocer y eliminar sustancias antigénicas extrañas existentes en el cuerpo. La respuesta inmunitaria puede dividirse en gran medida en respuesta inmunitaria mediada por células y respuesta inmunitaria humoral. En la respuesta inmunitaria humoral, los anticuerpos secretados por las células B reconocen antígenos extraños y los neutralizan, ayudan a la fagocitosis de los macrófagos al unirse a la superficie de otras células reconocidas como no propias, o aumentan la respuesta inmunitaria específica activando el sistema complementario. En la respuesta inmunitaria mediada por células, las células T citotóxicas (células Tc) inactivan directamente antígenos extraños o activan los macrófagos secretando citocinas tales como la IL-2 y el IFN-gamma. Como tal, en la respuesta inmunitaria, la capacidad de distinguir entre antígenos propios y no propios es absolutamente importante.

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Sin embargo, en una situación específica de trasplante de células, tejidos u órganos alogénicos o xenogénicos, es necesario suprimir la respuesta inmunitaria para prevenir el rechazo de injertos extraños beneficiosos. Por ejemplo, para tratar cánceres de la sangre tales como la leucemia, el mieloma, el linfoma y la anemia aplásica, el trasplante alogénico de médula ósea o el trasplante de células madre hemotopoyéticas, se han utilizado como un método de tratamiento eficaz. Sin embargo, en el caso de la respuesta de rechazo inmunitario al reconocer a un huésped como antígeno no propio, el injerto derivado del donante puede provocar daños en los tejidos, la piel, los órganos y similares del receptor, e incluso la muerte en el peor de los casos. Como tal, una enfermedad en la que un injerto daña los tejidos de un huésped al provocar una respuesta de rechazo inmunitario se denomina enfermedad de injerto contra huésped (EICH). Por ejemplo, en el caso de trasplante de células madre, se refiere a que células madre nuevas (injerto) trasplantadas a la médula ósea reconocen los tejidos del paciente (huésped) como algo extraño, de tal forma que las células madre del donante alogénico dañan el tejido, la piel, el órgano digestivo, u órganos tales como el hígado y similares del receptor. En la patogenia de la enfermedad de injerto contra huésped, las células del paciente que presentan antígenos activan las células T entre las células de médula ósea trasplantadas para diferenciarse en células Th1 y aumentar la secreción de citocinas tales como la IL-2 y el IFN-gamma, activando así las células T citotóxicas y las células citolíticas naturales, y que atacan los órganos del paciente provocando la enfermedad de injerto contra huésped. La principal causa de la enfermedad de injerto contra huésped es el trasplante alogénico de médula ósea o el trasplante de células madre hemotopoyéticas. Concretamente, se ha informado que la enfermedad de injerto contra huésped la provoca el trasplante de células madre hemotopoyéticas, y el 15-30% de los pacientes fallecieron. Por lo tanto, para prevenir la aparición de la enfermedad de injerto contra huésped y asegurar que el injerto sobreviva durante un largo periodo de tiempo, debe evitarse el sistema inmunitario del receptor que reconoce el antígeno extraño o suprimirse la respuesta inmunitaria.

Además, en la reacción de hipersensibilidad inmunitaria tal como la reacción alérgica, en el caso de que la reacción inmunológica de un sujeto provoque un daño mayor que la invasión de sustancias extrañas, la supresión de la reacción inmunitaria es necesaria. Ejemplos de este tipo de enfermedades alérgicas son la rinitis alérgica, el asma, la dermatitis atópica y similares. Además, las enfermedades autoinmunitarias se refieren a enfermedades en las que el sistema inmunitario es demasiado sensible a la parte del cuerpo del sujeto de manera que la capacidad de diferenciación de las propias de las no propias es deficiente, destruyendo su propio cuerpo. Las enfermedades autoinmunitarias también necesitan tratamiento para la supresión de la respuesta inmunitaria. Ejemplos de este tipo de enfermedades autoinmunitarias son la artritis reumatoide, la diabetes mellitus insulino dependiente, la esclerosis múltiple, el lupus, la psoriasis, la enfermedad inflamatoria del intestino, la colitis ulcerosa, la miastenia grave, la polimiositis, la dermatomiositis, las citopenias autoinmunitarias, el síndrome de vasculitis, el lupus eritematoso sistémico y similares. En todo el mundo, las enfermedades provocadas por la reacción de hipersensibilidad inmunitaria se han aumentado, pero la causa fundamental de tales enfermedades no se ha investigado suficientemente. Por tanto, la supresión de la reacción inmunitaria se ha utilizado extensamente como terapia útil para el tratamiento de pacientes que padecen enfermedades inmunitarias tales como el rechazo de trasplante, la enfermedad de injerto contra huésped, la enfermedad alérgica y la enfermedad autoinmunitaria. En la actualidad, se han desarrollado numerosos inmunosupresores químicos para la supresión de la reacción inmunitaria, y la

ciclosporina A ha mostrado el mejor efecto clínico, utilizándose ampliamente para enfermedades autoinmunitarias incluida la enfermedad de injerto contra huésped, el rechazo de trasplante y diversas enfermedades inflamatorias. Cuando la ciclosporina A se usa en dosis altas, suprime completamente la activación de las células T para tratar enfermedades, pero presenta el inconveniente de mostrar efectos secundarios considerables, incluyendo la toxicidad renal. Por lo tanto, se recomienda su uso en dosis bajas. Además, para ayudar a superar el efecto medicinal reducido debido al uso de dosis bajas, se ha llevado a cabo la administración conjunta con otros 2 ó 3 inmunosupresores. Sin embargo, para la administración conjunta, existe el requisito previo de que el mecanismo de acción y el sitio de toxicidad de dos compuestos sean diferentes. Por tanto, existe la necesidad de desarrollar un inmunosupresor más eficaz que reemplace a los inmunosupresores convencionales.

Mientras tanto, las células T, uno de los grupos celulares que desempeñan un papel central en el sistema inmunitario, maduran en el timo y se clasifican en células T auxiliares (células Th) positivas para CD4 y células T citotóxicas positivas para CD8. A través de una serie de procedimientos de diferenciación, las células T auxiliares se diferencian en células T que tienen propiedades intrínsecas: Th1 (T auxiliar de tipo 1), Th2 (T auxiliar de tipo 2), Th17 (T auxiliar de tipo 17), célula T reguladora (célula Treg) y similares. Las células T reguladoras tienen la propiedad de controlar la reacción inflamatoria mediante la supresión de la función de las células inmunitarias anormalmente activadas, de forma que las enfermedades inmunitarias pueden tratarse mediante la acción de la actividad creciente de la célula T reguladora. La célula T reguladora emplea CD4⁺CD25⁺ como un marcador y expresa el factor de transcripción Foxp3. La importancia de la célula T reguladora en la tolerancia inmunitaria y en las enfermedades autoinmunitarias es evidente en un ratón "Scurfy" con mutación de Foxp3. El ratón "Scurfy" que tiene mutación de Foxp3 muere solamente un mes después del nacimiento debido a una excesiva activación de células T CD4⁺ y a una excesiva producción de citocinas inflamatorias (Sakaguchi S. *et al.*, Cell 2008, 133:775-787), y en humanos es la causa de la enfermedad hereditaria por mutación del gen Foxp3, IPEX (síndrome de inmunodeficiencia, poliendocrinopatía, enteropatía, ligado a X), la cual provoca numerosas enfermedades autoinmunitarias tales como la diabetes mellitus de tipo 1, la alergia, la enfermedad inflamatoria del intestino y similares (Itoh M. *et al.*, J Immunol 1999, 162:5317-5326). Por lo tanto, puede esperarse que diversas enfermedades inmunitarias, incluidas las enfermedades autoinmunitarias y las enfermedades inflamatorias crónicas, puedan tratarse activando las células T reguladoras o administrando un medicamento que contenga células T reguladoras como principio activo. Sin embargo, las células T reguladoras son células diferenciadas que presentan función inmunosupresora en comparación con otros linfocitos T producidos a partir del timo, y ya se encuentran estimuladas por el autoantígeno en el timo. Las células T reguladoras están compuestas por aproximadamente el 5% de los linfocitos T del timo, y aproximadamente el 10-15% de los linfocitos T CD4⁺ existentes en el órgano específico. Como resultado, es muy difícil obtener una cantidad terapéuticamente eficaz de células T reguladoras, por lo que se requiere un método para la obtención de una gran cantidad de células T reguladoras de forma eficaz.

Mientras tanto, la publicación de solicitud de patente coreana n.º 10-2009-0018593 proporciona nuevos compuestos derivados de indol o indazol que poseen actividad inhibitoria de la necrosis celular y un agente terapéutico para el tratamiento de enfermedades asociadas con necrosis que comprenden los mismos. Sin embargo, el documento de patente anterior divulga la actividad de los compuestos de indol o indazol anteriores para inhibir la necrosis celular y la asociación con algunas enfermedades asociadas con la necrosis, como la enfermedad hepática, la enfermedad neurodegenerativa y similares, y no menciona una asociación de los compuestos anteriores con las células T reguladoras, la eficacia en la supresión de la respuesta inmunitaria o la posibilidad de ser utilizadas en el tratamiento de enfermedades asociadas a la reacción de hipersensibilidad inmunitaria.

Por consiguiente, los presentes inventores intentaron proporcionar compuestos que tuvieran una excelente eficacia inmunosupresora que puedan reemplazar o ayudar a los inmunosupresores convencionales. Como resultado, los presentes inventores encontraron que los compuestos de la publicación de solicitud de patente coreana n.º 10-2009-0018593, específicamente (tetrahidropiran-4-il)-[2-fenil-5-(1,1-dioxo-tiomorfolin-4-il)metil-1H-indol-7-il]amina, que se conoce como un inhibidor de la necrosis celular, promueve la diferenciación de células T inmaduras en células T reguladoras y la proliferación, y muestra una eficacia inmunosupresora excelente, por lo que puede aplicarse ampliamente para el tratamiento de rechazo de trasplante, enfermedad de injerto contra huésped, enfermedades alérgicas, enfermedades autoinmunitarias y similares para lograr la presente invención.

Divulgación de la invención

Problema técnico

Por consiguiente, un objeto de la presente invención es proporcionar una composición farmacéutica para su uso en la supresión de la respuesta inmunitaria, que comprende (tetrahidropiran-4-il)-[2-fenil-5-(1,1-dioxo-tiomorfolin-4-il)metil-1H-indol-7-il]amina, una sal o isómero farmacéuticamente aceptable de la misma.

Otro objeto de la presente invención es proporcionar una composición farmacéutica para su uso en la prevención y el tratamiento de enfermedades inmunitarias tales como el rechazo de trasplante, la enfermedad de injerto contra huésped, la enfermedad alérgica, la enfermedad autoinmunitaria y la enfermedad inflamatoria, que comprende (tetrahidropiran-4-il)-[2-fenil-5-(1,1-dioxo-tiomorfolin-4-il)metil-1H-indol-7-il]amina, una sal o isómero farmacéuticamente aceptable de la misma.

Otro objeto más de la presente invención es proporcionar una composición para su uso en la supresión de la respuesta inmunitaria al inducir la diferenciación de células T inmaduras en células T reguladoras y/o promover la proliferación de células T reguladoras, que comprende (tetrahidropiran-4-il)-[2-fenil-5-(1,1-dioxo-tiomorfolin-4-il)metil-1H-indol-7-il]amina, una sal o isómero farmacéuticamente aceptable de la misma .

Otro objeto más de la presente invención es proporcionar un método *ex vivo* para la obtención de células T reguladoras mediante la inducción de la diferenciación en células T reguladoras y la promoción de la proliferación, que comprende una etapa de tratamiento de células T inmaduras con una composición que comprende (tetrahidropiran-4-il)-[2-fenil-5-(1,1-dioxo-tiomorfolin-4-il)metil-1H-indol-7-il]amina, una sal o isómero farmacéuticamente aceptable de la misma.

Solución al problema

Para lograr el objeto anterior, la presente invención proporciona una composición farmacéutica para su uso en la supresión de la respuesta inmunitaria mediante la activación de células T reguladoras, al inducir la diferenciación en células T reguladoras y/o promover la proliferación, que comprende (tetrahidropiran-4-il)-[2-fenil-5-(1,1-dioxo-tiomorfolin-4-il)metil-1H-indol-7-il]amina, una sal o isómero farmacéuticamente aceptable de la misma.

Como un aspecto, la presente invención proporciona una composición farmacéutica para su uso en la supresión de la respuesta inmunitaria, que comprende (tetrahidropiran-4-il)-[2-fenil-5-(1,1-dioxo-tiomorfolin-4-il)metil-1H-indol-7-il]amina, una sal o isómero farmacéuticamente aceptable de la misma.

Como otro aspecto, la presente invención proporciona una composición farmacéutica para su uso en la prevención o tratamiento de enfermedades inmunitarias tales como el rechazo de trasplante, la enfermedad de injerto contra huésped, la enfermedad alérgica, la enfermedad autoinmunitaria y la enfermedad inflamatoria, al suprimir la respuesta inmunitaria mediante la activación de células T reguladoras, que comprende (tetrahidropiran-4-il)-[2-fenil-5-(1,1-dioxo-tiomorfolin-4-il)metil-1H-indol-7-il]amina, una sal o isómero farmacéuticamente aceptable de la misma.

Como todavía otro aspecto adicional, la presente invención proporciona una composición para su uso en la inducción de la diferenciación de células T inmaduras en células T reguladoras y/o promover la proliferación de células T reguladoras, que comprende (tetrahidropiran-4-il)-[2-fenil-5-(1,1-dioxo-tiomorfolin-4-il)metil-1H-indol-7-il]amina, una sal o isómero farmacéuticamente aceptable de la misma.

Como todavía otro aspecto adicional, la presente invención proporciona un método *ex vivo* para la obtención de células T reguladoras mediante la inducción de la diferenciación en células T reguladoras y la promoción de la proliferación, que comprende una etapa de tratamiento de células T inmaduras con una composición que comprende (tetrahidropiran-4-il)-[2-fenil-5-(1,1-dioxo-tiomorfolin-4-il)metil-1H-indol-7-il]amina, una sal o isómero farmacéuticamente aceptable de la misma.

El método para preparar el compuesto de la presente invención, (tetrahidropiran-4-il)-[2-fenil-5-(1,1-dioxotiomorfolin-4-il)metil-1H-indol-7-il]amina, puede referirse al método divulgado en la publicación de solicitud de patente coreana n.º 10-2009-0018593.

El compuesto (tetrahidropiran-4-il)-[2-fenil-5-(1,1-dioxo-tiomorfolin-4-il)metil-1H-indol-7-il]amina según la presente invención puede formar una sal farmacéuticamente aceptable. Dicha "sal farmacéuticamente aceptable" incluye una sal de adición ácida no tóxica que contiene un anión farmacéuticamente aceptable, por ejemplo, una sal con ácidos inorgánicos tales como ácido sulfúrico, ácido clorhídrico, ácido nítrico, ácido fosfórico, ácido bromhídrico, ácido yodhídrico, etc.; una sal con ácidos carboxílicos orgánicos tales como ácido tartárico, ácido fórmico, ácido cítrico, ácido acético, ácido tricloroacético, ácido trifluoroacético, ácido glucónico, ácido benzoico, ácido láctico, ácido fumárico, ácido maleico, ácido salicílico, etc.; o una sal con ácidos sulfónicos tales como ácido metanosulfónico, ácido etanosulfónico, ácido bencenosulfónico, ácido p-toluenosulfónico, ácido naftalenosulfónico, etc. Además, también se incluye una sal de adición de base farmacéuticamente aceptable, por ejemplo una sal con metales alcalinos o alcalinotérreos como litio, sodio, potasio, calcio, magnesio, etc.; una sal con aminoácidos tales como lisina, arginina, guanidina, etc.; o una sal orgánica con dicitohexilamina, N-metil-D-glucamina, tris(hidroximetil)metilamina, dietanolamina, colina, trietilamina, etc. El compuesto (tetrahidropiran-4-il)-[2-fenil-5-(1,1-dioxo-tiomorfolin-4-il)metil-1H-indol-7-il]amina, según la presente invención, puede convertirse en sus sales por cualquiera de los métodos convencionales, y la formación de la sal podría llevarse a cabo fácilmente por un experto en la técnica sin explicaciones adicionales al respecto.

El término "isómero" en la presente memoria descriptiva se refiere a aquellos que tienen la misma fórmula química o molecular, pero que difieren óptica o estéricamente del compuesto o sales del mismo. El compuesto (tetrahidropiran-4-il)-[2-fenil-5-(1,1-dioxo-tiomorfolin-4-il)metil-1H-indol-7-il]amina según la presente invención puede tener uno(s) centro(s) de carbonos asimétrico(s) en la estructura, y por lo tanto puede existir en forma de isómero óptico (isómero R o S), racemato, mezcla de diastereómeros o diastereómero individual, etc. Todos los isómeros y sus mezclas también están cubiertos por la presente invención.

A continuación en el presente documento, el compuesto (tetrahidropiran-4-il)-[2-fenil-5-(1,1-dioxo-tiomorfolin-4-il)metil-1H-indol-7-il]amina según la presente invención incluye sales e isómeros farmacéuticamente aceptables de la misma, a menos que se explique lo contrario.

La presente invención se caracteriza por proporcionar una composición que comprende (tetrahidropiran-4-il)-[2-fenil-5-(1,1-dioxo-tiomorfolin-4-il)metil-1H-indol-7-il]amina, una sal o isómero farmacéuticamente aceptable de la misma para su uso en la supresión de la respuesta inmunitaria.

En la presente memoria descriptiva, el término “inmunosupresión” o “supresión de la respuesta inmunitaria” se refiere a la supresión de la respuesta inmunitaria perjudicial en el cuerpo provocada por un antígeno extraño o autoantígeno.

El compuesto (tetrahidropiran-4-il)-[2-fenil-5-(1,1-dioxo-tiomorfolin-4-il)metil-1H-indol-7-il]amina de la presente invención puede usarse en la supresión de la respuesta de rechazo inmunitario que puede producirse en el trasplante de todas las células, tejidos y órganos. Por ejemplo, puede usarse en la supresión de la respuesta de rechazo inmunitario en el momento del trasplante de piel, sangre, córnea, hígado, pulmón, intestino, páncreas, corazón, riñón, médula ósea, células madre, células precursoras, etc., y preferiblemente puede usarse en la supresión de la respuesta de rechazo inmunitario provocada por el injerto de piel, trasplante de médula ósea, trasplante de células madre, transfusión de sangre y trasplante de órganos.

Por consiguiente, una composición farmacéutica de la presente invención es útil en el tratamiento y la prevención de rechazo de trasplante y/o enfermedad de injerto contra huésped al suprimir la respuesta inmunitaria al órgano, tejido o célula trasplantados.

En la presente memoria descriptiva, “tratamiento” se refiere a interrumpir o retrasar el progreso de la enfermedad cuando se aplica a un sujeto que muestra la aparición de los síntomas de la enfermedad, y “prevención” se refiere a interrumpir o retrasar el signo de la aparición de la enfermedad cuando se aplica a un sujeto que no muestra, pero está en riesgo de, la aparición de los síntomas de la enfermedad.

Además, una composición farmacéutica de la presente invención es útil en el tratamiento y la prevención de diversas enfermedades asociadas con hipersensibilidad inmunitaria provocadas por la reacción de hipersensibilidad inmunitaria, preferiblemente enfermedades alérgicas, enfermedades autoinmunitarias y enfermedades inflamatorias. Ejemplos de enfermedades alérgicas son rinitis alérgica, asma, dermatitis atópica y similares. Además, ejemplos de enfermedades autoinmunitarias son artritis reumatoide, diabetes mellitus insulino dependiente, esclerosis múltiple, lupus, psoriasis, enfermedad inflamatoria del intestino, colitis ulcerosa, miastenia grave, polimiositis, dermatomiositis, citopenias autoinmunitarias, síndrome de vasculitis, lupus eritematoso sistémico y similares.

En el ejemplo específico de la presente invención, para determinar el efecto del compuesto (tetrahidropiran-4-il)-[2-fenil-5-(1,1-dioxo-tiomorfolin-4-il)metil-1H-indol-7-il]amina de la presente invención en la supresión de la respuesta inmunitaria, se preparó un modelo de ratón de respuesta inmunitaria alogénica mediante el trasplante de células de la médula ósea y del bazo del ratón donante al ratón receptor irradiado con radiación, y el compuesto (tetrahidropiran-4-il)-[2-fenil-5-(1,1-dioxo-tiomorfolin-4-il)metil-1H-indol-7-il]amina de la presente invención se administró para medir si se producía rechazo al trasplante inmunitario. Como resultado, la tasa de supervivencia del grupo tratado con el compuesto (tetrahidropiran-4-il)-[2-fenil-5-(1,1-dioxo-tiomorfolin-4-il)metil-1H-indol-7-il]amina de la presente invención aumentó considerablemente en comparación con el grupo no tratado, y se observaron resultados significativos en la evaluación del peso corporal y la reacción de injerto contra huésped (figuras 1 y 2). En la observación histológica, como resultado de la tinción con H&E del intestino grueso, se observó que las vellosidades y la membrana mucosa del intestino grueso se destruyen en el modelo de ratón de la enfermedad en el que no se trató el compuesto de la presente invención, pero el grupo en el que el compuesto de la presente invención se trató es similar al intestino grueso normal (figura 3).

Además, como resultado de la observación de la respuesta inmunitaria por estrés oxidativo en un modelo de ratón de respuesta inmunitaria alogénica, se observó que en el grupo en el que se trató el compuesto de la presente invención, la razón de generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) en las células se suprimió significativamente de manera dependiente de la dosis y del tiempo (figura 4), y la expresión de la proteína B1 del grupo de alta movilidad (a continuación en el presente documento denominada “HMGB1”), que es un marcador de la función reguladora inmunitaria, se suprimió significativamente (figura 5), en comparación con el grupo en el que no se trató el compuesto de la presente invención.

Como tal, en el modelo de ratón de respuesta inmunitaria alogénica se confirmó que el compuesto (tetrahidropiran-4-il)-[2-fenil-5-(1,1-dioxo-tiomorfolin-4-il)metil-1H-indol-7-il]amina de la presente invención disminuye el rechazo del trasplante inmunitario y reduce la producción de ROS y HMGB1, y la necrosis celular en los tejidos. Además, como resultado de determinar la posibilidad de regular la respuesta inmunitaria a nivel celular, en el grupo en el que se trató el compuesto de la presente invención, las células reguladoras inmunitarias CD4+CD25+Foxp3+ (células T reguladoras) aumentó 6 veces o más, y las células CD4+IL-4 aumentaron, pero CD4+IFN- γ se redujo a más de la

mitad, en comparación con el grupo en el que el compuesto de la presente invención no se trató (figura 6). IFN- γ es una citocina que provoca enfermedad de injerto contra huésped representativa secretada por células T de donantes trasplantados, y se sabe el compuesto (tetrahidropiran-4-il)-[2-fenil-5-(1,1-dioxo-tiomorfolin-4-il)metil-1H-indol-7-il]amina de la presente invención suprime la activación de las células T trasplantadas por la regulación por incremento de las células T reguladoras y la IL-4.

De los resultados de tal experimento, puede confirmarse que el compuesto (tetrahidropiran-4-il)-[2-fenil-5-(1,1-dioxo-tiomorfolin-4-il)metil-1H-indol-7-il]amina de la presente invención aumenta las células T reguladoras, suprime la activación de las células T trasplantadas mediante la acción inmunosupresora de las células T reguladoras aumentadas, controla la reacción inflamatoria, y es eficaz en la supresión de la respuesta inmunitaria mediante la reducción de las especies reactivas de oxígeno (ROS) en las células y la expresión de HMGB1. Por tanto, el compuesto de la presente invención puede usarse de manera útil como composición farmacéutica para suprimir la respuesta inmunitaria, y aún más ampliamente aplicado al tratamiento de enfermedades inmunitarias tales como rechazo de trasplante, enfermedad de injerto contra huésped, enfermedad alérgica, enfermedad autoinmunitaria, enfermedad inflamatoria y similares, que necesitan la supresión de la respuesta inmunitaria.

Una composición farmacéutica para la inmunosupresión que comprende el compuesto (tetrahidropiran-4-il)-[2-fenil-5-(1,1-dioxotiomorfolin-4-il)metil-1H-indol-7-il]amina de la presente invención puede usarse en combinación con otros conocidos inmunosupresores. Ejemplos de otros inmunosupresores combinables son, pero no se limitan a, ciclosporina A, rapamicina, tacrolimus, sacrolimus, metotrexato, azatioprina, micofenolato de mofetilo y diversas preparaciones de esteroides.

Como todavía otro aspecto adicional de la presente invención, se proporciona una composición farmacéutica para su uso en la supresión de la respuesta inmunitaria mediante la inducción de la diferenciación de células T inmaduras en células T reguladoras y/o la promoción de la proliferación de células T reguladoras, que comprende (tetrahidropiran-4-il)-[2-fenil-5-(1,1-dioxo-tiomorfolin-4-il)metil-1H-indol-7-il]amina, una sal o isómero farmacéuticamente aceptable de la misma.

En la presente memoria descriptiva, el término "célula T reguladora" se refiere a una célula que puede regular la respuesta de las células T, utiliza CD4+CD25+ como marcador y expresa el factor de transcripción Foxp3. La célula T reguladora tiene la propiedad de controlar la reacción inflamatoria mediante la supresión de la función de las células inmunitarias anormalmente activadas, y suprime la reacción inflamatoria crónica de tal forma que puede mostrarse el efecto en el tratamiento de la tolerancia inmunitaria y las enfermedades autoinmunitarias. Concretamente, se sabe que el factor Foxp3 tiene un papel importante en la diferenciación y activación de células T reguladoras.

Por tanto, las células T reguladoras inducidas por el compuesto (tetrahidropiran-4-il)-[2-fenil-5-(1,1-dioxo-tiomorfolin-4-il)metil-1H-indol-7-il]amina de la presente invención pueden emplearse en la supresión de la respuesta de rechazo inmunitario que puede producirse en el trasplante de todas las células, tejidos y órganos. Por ejemplo, puede usarse en la supresión de la respuesta de rechazo inmunitario en el momento de trasplante de piel, sangre, córnea, hígado, pulmón, intestino, páncreas, corazón, riñón, médula ósea, células madre, células precursoras, etc., y preferiblemente puede emplearse en la supresión de la respuesta de rechazo inmunitario provocada por injerto de piel, trasplante de médula ósea, trasplante de células madre, transfusión de sangre y trasplante de órganos. Por consiguiente, la célula T reguladora inducida por el compuesto de la presente invención es útil en el tratamiento y la prevención del rechazo de trasplante o la enfermedad de injerto contra huésped mediante la supresión de la respuesta inmunitaria al órgano, tejido o célula. Además, la célula T reguladora inducida por el compuesto de la presente invención es útil en el tratamiento y la prevención de diversas enfermedades asociadas a hipersensibilidad inmunitaria provocadas por la reacción de hipersensibilidad inmunitaria, preferiblemente enfermedades alérgicas, enfermedades autoinmunitarias y enfermedades inflamatorias. Ejemplos de enfermedades autoinmunitarias son artritis reumatoide, diabetes mellitus insulino dependiente, esclerosis múltiple, lupus, psoriasis, enfermedad inflamatoria del intestino, colitis ulcerosa, miastenia grave, polimiositis, dermatomiositis, citopenias autoinmunitarias, síndrome de vasculitis, lupus eritematoso sistémico y similares.

En el ejemplo específico de la presente invención, se confirmó que el compuesto (tetrahidropiran-4-il)-[2-fenil-5-(1,1-dioxo-tiomorfolin-4-il)metil-1H-indol-7-il]amina de la presente invención promueve la diferenciación de células T CD4+ aisladas de células de bazo de ratón en células T reguladoras (figuras 7 y 8), y dicho efecto resulta excelente en comparación con retinal o ácido retinoico, los cuales son conocidos como inductores de diferenciación en el pasado. Aún más, se confirmó que en el caso de que el compuesto de la presente invención se trate en combinación con retinal o ácido retinoico, el efecto de promoción de la diferenciación en la célula T reguladora se aumenta aún más (figuras 9 y 10). Además, en un experimento *in vitro*, las células T reguladoras inducidas por el tratamiento del compuesto de la presente invención mostraron el efecto de la supresión de la proliferación de células T y una respuesta inmunitaria alogénica de las células, y en el modelo de ratón de enfermedad de injerto contra huésped *in vivo*, se confirmó su efecto en la función reguladora inmunitaria de las células T reguladoras (figuras 11 a 14).

Por tanto, el compuesto de la presente invención o una composición que comprende el mismo pueden usarse provechosamente en la producción a gran escala o a concentraciones en cantidades terapéuticamente eficaces de

células T reguladoras para el tratamiento de enfermedad inmunitaria y enfermedades inflamatorias crónicas mediante la inducción de la diferenciación de células T inmaduras en células T reguladoras y/o promover la proliferación de células T reguladoras.

5 Preferiblemente, una composición farmacéutica para inducir la diferenciación de células T inmaduras en células T reguladoras y/o promover la proliferación de células T reguladoras, que comprende el compuesto de la presente invención, puede comprender además anticuerpo anti-CD3, anticuerpo anti-CD28 y TGF-beta para la diferenciación en células T reguladoras, y puede comprender además retinal o ácido retinoico que es un inductor de diferenciación convencional para mejorar además el efecto sobre la promoción de la diferenciación y la proliferación.

10 Las células T reguladoras diferenciadas por el compuesto de la presente invención muestran el fenotipo CD4⁺, CD25⁺ y Foxp3⁺, y tienen la función de regular y suprimir la respuesta inmunitaria en células de respuesta inmunitaria alogénicas y ratón con EICH.

15 Una composición farmacéutica de la presente invención puede comprender un portador, diluyente, excipiente o una combinación de los mismos farmacéuticamente aceptable, en caso necesario, junto con los compuestos de la presente invención. Una composición farmacéutica facilita la administración del compuesto en un organismo vivo. Existen diversas técnicas para administrar el compuesto, las cuales incluyen, pero no se limitan a, vía oral, inyectable, aerosol, parenteral y administración tópica.

20 En la presente memoria descriptiva, un portador farmacéuticamente aceptable significa un portador o diluyente el cual no estimula considerablemente el organismo vivo y no inhibe actividades biológicas y propiedades del compuesto a administrar. Además, el aditivo puede facilitar la preparación, la compresibilidad, el aspecto y el sabor de la formulación. Por ejemplo, pueden añadirse, si fuera necesario, un estabilizador, un surfactante, un modificador de deslizamiento, un agente solubilizador, un agente de tamponamiento, un agente edulcorante, un compuesto base, un absorbente, un potenciador del sabor, un agente de unión, un agente de suspensión, un agente endurecedor, un antioxidante, un agente de pulido, un componente de fragancia, un agente de sabor, un pigmento, un agente de recubrimiento, un agente humectante, un agente de ajuste de la humedad, una carga, un agente antiespumante, un agente refrescante, un agente de masticación, un agente antiestático, un agente colorante, un agente de recubrimiento de azúcar, un agente isotónico, un agente suavizante, un agente emulsionante, un agente adhesivo, un agente espesante, un agente espumante, un agente de ajuste de pH, un excipiente, un agente dispersante, un agente disgregante, un agente impermeable, un agente antiséptico, un conservante, un adyuvante de solubilización, un disolvente, un plastificante, etc.

35 La dosis del compuesto (tetrahidropiran-4-il)-[2-fenil-5-(1,1-dioxo-tiomorfolin-4-il)metil-1H-indol-7-il]amina comprendida en una composición farmacéutica de la presente invención depende de la prescripción de un médico, teniendo en cuenta factores como el peso corporal, el sexo, la edad, el estado de salud, y la dieta del paciente, la naturaleza específica de la enfermedad, el tiempo de administración del agente, el método de administración, la razón de mezclado de los agentes, la gravedad de la enfermedad, etc. Sin embargo, la dosis necesaria para el tratamiento de un adulto es normalmente desde aproximadamente 1,0 mg hasta 2.000 mg al día, dependiendo de la intensidad y frecuencia de la administración. Cuando se administra a un adulto por vía intramuscular o intravenosa, una dosis total que varía normalmente desde aproximadamente 1,0 mg hasta 300 mg al día sería suficiente cuando se administra por separado en una única dosis, pero para algunos pacientes puede ser conveniente una dosis diaria más alta.

45 **Efectos de la invención**

Una composición farmacéutica de la presente invención puede usarse provechosamente como composición farmacéutica para su uso en la supresión de la respuesta inmunitaria, y puede aplicarse todavía más al tratamiento del rechazo de trasplante, la enfermedad de injerto contra huésped, enfermedades alérgicas, enfermedades autoinmunitarias y similares. Además, puede usarse provechosamente en la obtención de una cantidad terapéuticamente eficaz de células T reguladoras para el tratamiento de enfermedad inmunitaria y enfermedades inflamatorias crónicas a gran escala mediante la promoción de la diferenciación de células T inmaduras en células T reguladoras y la proliferación, y las células T reguladoras obtenidas según la presente invención pueden aplicarse ampliamente empleadas al tratamiento de rechazo de trasplante, enfermedad autoinmunitaria tal como enfermedad de injerto contra huésped, enfermedad inflamatoria crónica y similares, las cuales necesitan la supresión de la respuesta inmunitaria.

60 **Breve descripción de los dibujos**

La figura 1 son fotografías de ratón con EICH en las que el compuesto (tetrahidropiran-4-il)-[2-fenil-5-(1,1-dioxotiomorfolin-4-il)metil-1H-indol-7-il]amina (a continuación en el presente documento denominado "compuesto A") no se trata, y ratón con EICH en el que se trata el compuesto A.

65 La figura 2 son gráficas que muestran el puntaje clínico de EICH (A), la tasa de supervivencia (B) y el peso corporal (C) según el día transcurrido tras el trasplante de modelo de ratón con EICH en el que se trasplantan células de

- 5 médula ósea y bazo de un ratón donante a un ratón receptor irradiado. ■ representa un ratón con EICH preparado mediante trasplante de células de médula ósea y de bazo, ● representa un ratón en el cual la EICH no se induce mediante trasplante de células de médula ósea ni de bazo, Δ representa un modelo de ratón con EICH en el cual se administran 0,3 mg/kg de compuesto A, y ▼ representa un modelo de ratón con EICH en el cual se administra 1 mg/kg de compuesto A.
- La figura 3 son fotografías que muestran los resultados de la tinción con H&E de cada intestino grueso de ratón con EICH no tratado con el compuesto A y de ratón de compuesto A con EICH tratado con el compuesto A.
- 10 La figura 4 son gráficas que muestran la razón de generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) de ratón con EICH no tratado con el compuesto A y de ratones con EICH en los que el compuesto A se trata en cada dosis en el día 7 (A) y en el día 14 (B) tras el tratamiento.
- 15 La figura 5 son gráficas que muestran la expresión relativa de HMGB1 del ratón con EICH no tratado con el compuesto A y de ratones con EICH en los que el compuesto A se trata en cada dosis en el día 7 (A) y en el día 14 (B) tras el tratamiento.
- 20 La figura 6 muestra los resultados del análisis de citometría de flujo para células T reguladoras (CD4+CD25+Foxp3+) y células CD4+IFN- γ de los bazos aislados de ratón con EICH no tratado con el compuesto A y de ratón con EICH tratado con el compuesto A.
- 25 La figura 7 es una gráfica que muestra los grados de diferenciación en células T reguladoras (CD4+CD25+Foxp3+) de células CD4⁺ aisladas de células de bazo de ratón en las que se tratan anti-CD3 (aCD3) y anti-CD28 (aCD28), TGF-beta se trata adicionalmente, y entre 40 μ M y 80 μ M de compuesto A se trata adicionalmente.
- 30 La figura 8 muestra los resultados del análisis de citometría de flujo para el grado de expresión de Foxp3+ de células diferenciadas, las cuales son células CD4⁺ aisladas de células de bazo de ratón en las que se tratan anti-CD3 y anti-CD28, TGF-beta se trata adicionalmente, y entre 40 μ M y 80 μ M de compuesto A se trata adicionalmente.
- 35 La figura 9 muestra los resultados del análisis de citometría de flujo para el efecto de la diferenciación en células T reguladoras en cada grupo. En el transcurso de la inducción de la diferenciación en células T reguladoras mediante el tratamiento de células CD4⁺ aisladas del bazo de ratón con anti-CD3 y anti-CD28, o TGF-beta adicional, los grupos se dividen en grupo tratado con 40 μ M de compuesto A, grupo tratado con 80 μ M de compuesto A, grupo tratado con 0,1 μ M de ácido retinoico (a continuación en el presente documento denominado "RA"), grupo tratado con 1 μ M de retinal, grupo tratado con 0,1 μ M de RA y 40 μ M de compuesto A, grupo tratado con 0,1 μ M de RA y 80 μ M de compuesto A, grupo tratado con 1 μ M de retinal y 40 μ M de compuesto A, y grupo tratado con 1 μ M de retinal y 80 μ M de compuesto A.
- 40 La figura 10 es un gráfico que muestra los grados de diferenciación en células T reguladoras (CD4+CD25+Foxp3+). En el transcurso de la inducción de la diferenciación en células T reguladoras mediante el tratamiento de células CD4⁺ aisladas del bazo de ratón con anti-CD3, anti-CD28 y TGF-beta, los grupos se dividen en grupo solamente tratado con compuesto A, grupo solamente tratado con retinal, grupo solamente tratado con RA, grupo conjuntamente tratado con compuesto A y retinal, y grupo conjuntamente tratado con compuesto A y RA.
- 45 La figura 11 es un gráfico que muestra los resultados del efecto supresor sobre la proliferación de células T a través del análisis de [³H]timidina para células T reguladoras inducidas por la adición de aCD3 y aCD28, células T reguladoras inducidas por la adición de aCD3, aCD28 y TGF- β (denominadas "TGF-beta Treg"), células T reguladoras inducidas por la adición de aCD3, aCD28, TGF- β y RA (denominadas "RA Treg"), células T reguladoras inducidas por la adición de aCD3, aCD28, TGF- β y 40 μ M de compuesto A, y células T reguladoras inducidas por la adición de aCD3, aCD28, TGF- β y 80 μ M de compuesto A (denominadas "compuesto A Treg").
- 50 La figura 12 es un gráfico que muestra los resultados del efecto supresor sobre la proliferación celular de la respuesta inmunitaria alogénica a través del análisis de [³H]timidina para células T reguladoras inducidas por la adición de aCD3 y aCD28, células T reguladoras inducidas por la adición de aCD3, aCD28 y TGF- β (denominadas "TGF-beta Treg"), células T reguladoras inducidas por la adición de aCD3, aCD28, TGF- β y RA (denominadas "RA Treg"), células T reguladoras inducidas por la adición de aCD3, aCD28, TGF- β y 40 μ M de compuesto A, y células T reguladoras inducidas por la adición de aCD3, aCD28, TGF- β y 80 μ M de compuesto A (denominadas "compuesto A Treg").
- 55 La figura 13 es un gráfico que muestra los resultados del análisis comparativo del efecto sobre la inducción de la diferenciación en células T reguladoras en función de la concentración de compuesto A en células inmunitarias alogénicas.
- 60 La figura 14 es un gráfico que muestra los resultados del análisis comparativo del efecto sobre la promoción de la diferenciación en células T reguladoras en función de la concentración de compuesto A en un modelo de ratón con
- 65

enfermedad de injerto contra huésped (EICH).

Modo para la invención

- 5 A continuación en el presente documento, la presente invención se explica en más detalle con los siguientes ejemplos. Sin embargo, los siguientes ejemplos sólo pretenden facilitar la comprensión de la presente invención, y el alcance de protección de la presente invención no se encuentra limitado a los mismos.

Ejemplo 1: Establecimiento del modelo de ratón de respuesta inmunitaria alogénica

- 10 El ratón C57BL/6/6 (H-2kb) y el ratón BALB/c (H-2kd) de 6-8 semanas de edad que presentan distinta clase MHC entre ellos se adquirieron de OrientBio Co., Ltd. Tras pasar la regulación del comité de gestión del Departamento de Animal de Laboratorio, Universidad Católica de Corea, los ratones se usaron bajo su cuidado. Se irradió un ratón BALB/c (H-2kd) receptor con radiación sistémica a 800 cGy. En el plazo de 24 horas, se trasplantaron 5×10^6 células de médula ósea y 5×10^6 células de bazo aisladas de un ratón C57BL/6 (H-2kd) donante al ratón receptor alogénico por vía intravenosa para inducir un modelo de reacción de rechazo de injerto contra huésped. Se observó el ratón trasplantado con médula ósea y se evaluó de la siguiente manera: peso, postura, actividad, estado del pelaje y densidad de la piel, con criterios de evaluación en una escala total de diez puntos, dos puntos por cada parámetro (tabla 1).

Puntuación	Peso	Postura	Actividad	Estado del pelaje	Densidad de la piel
0	<10%	Normal	Normal	Normal	Normal
1	>10% a <25%	Ligeramente doblada	Pequeña disminución	Ligeramente enredado	Decapado de pata y cola
2	>25%	Gravemente doblada	Inmóvil sin estímulo	Muy enredado	Decapado evidente de piel

Ejemplo 2: Citometría de flujo (análisis FACS)

- 25 Los ratones se dividieron en un grupo con EICH en el que se trató (tetrahidropiran-4-il)-[2-fenil-5-(1,1-dioxotiomorfolin-4-il)metil-1H-indol-7-il]amina (LG Life Sciences Ltd., Daejeon, Corea, a continuación en el presente documento denominado "compuesto A") como grupo de prueba y un grupo con EICH en el que el compuesto A no se trató como grupo de control. Los bazos de cada grupo se aislaron y se llevó a cabo el aislamiento de células individuales. La expresión de CD4+CD25+Foxp3+, que es el fenotipo de la célula T reguladora, y las células CD4+IFN- γ y las células CD4+IL-4 se analizaron mediante el uso de anticuerpos monoclonales fluorescentes y un citómetro de flujo.

Ejemplo 3: Medición de las especies reactivas de oxígeno (ROS)

- 35 Se sacrificaron los animales de cada grupo y se aislaron los bazos. Tras el aislamiento de las células individuales, las células obtenidas se lavaron dos veces con solución salina tamponada con fosfato (PBS). Se llevó a cabo la reacción con carboxi-H₂DCFDA 3 μ M a 37°C durante 10 minutos. Tras el lavado con PBS, el análisis se llevó a cabo en un citómetro de flujo a 540 nm.

Ejemplo 4: RT-PCR

- 40 Se extrajo ARN total de las células mediante el uso de reactivo TRIzol. Se hizo reaccionar 1 μ g de ARN con transcriptasa inversa de AMV y hexámero aleatorio a 45°C durante 1 hora para sintetizar ADNc. Se llevó a cabo PCR en tiempo real mediante el uso de una mezcla de 1 μ g de ADNc como molde, cebador S, cebador AS y agua destilada, y SYBR Green. La PCR se llevó a cabo mediante el uso de HMGB1 (5'-GAT GGG CAA AGG AGA TCC TAA G-3' y 5'-TCA CTT TTT TGT CTC CCC TTT GGG-3') a una condición de 35 ciclos a 95°C durante 15 segundos, a 60°C durante 10 segundos y a 72°C durante 30 segundos. Los datos de fluorescencia se midieron mediante el uso del sistema en tiempo real Rad CFX96 (Bio-Rad Laboratories).

Ejemplo 5: Inmunocitoquímica

- 50 Se obtuvieron secciones en serie de 4 μ m de tejido embebido con parafina, se trataron con xileno tres veces para eliminar la parafina, y después se hidrataron gradualmente en etanol al 95%, al 90% y al 70%. Tras eliminar la peroxidasa endógena con peróxido de hidrógeno al 0,5%, la muestra se trató con suero de cabra normal durante 30 minutos y después se hizo reaccionar con anticuerpo primario diluido con albúmina de suero bovino (BSA) al 3% en PBS durante 1 hora, según las instrucciones del fabricante. Después de la reacción del anticuerpo primario a las proteínas expresadas dirigidas a los genes que muestran la diferencia de expresión en el estudio anterior, la muestra se lavó tres veces con solución salina tamponada con Tris (TBS), se hizo reaccionar con IgG anti-ratón biotinilado/anti-conejo 5 μ g/ml diluida en BSA al 3% durante 30 minutos, y se lavó tres veces con TBS. La muestra

se mantuvo en peroxidasa de rábano picante - estreptavidina 3 µg/ml durante 30 minutos, se llevó a cabo desarrollo del color mediante el uso de DAB y peróxido de hidrógeno, y se llevó a cabo una contratinción con hematoxilina de Meyer o verde de metilo al 1%.

5 Resultados

1. *Supresión del rechazo del trasplante inmunitario en modelo de ratón mediante el compuesto (tetrahidropiran-4-il)-[2-fenil-5-(1,1-dioxo-tiomorfolin-4-il)metil-1H-indol-7-il]amina de la presente invención*

10 En la presente invención, se observó el efecto del compuesto (tetrahidropiran-4-il)-[2-fenil-5-(1,1-dioxo-tiomorfolin-4-il)metil-1H-indol-7-il]amina de la presente invención sobre la supresión de la respuesta al rechazo inmunitario a través del modelo de ratón con EICH. Como resultado, la tasa de supervivencia del grupo en el que el compuesto de la presente invención se trata aumentó considerablemente en comparación con el grupo no tratado, y se observaron resultados significativos en la evaluación del peso corporal y la reacción injerto contra huésped (figuras 1 y 2). En la observación histológica, como resultado de la tinción con H&E del intestino grueso, se observó que las vellosidades y la membrana mucosa del intestino grueso se destruyeron en el modelo de ratón de la enfermedad en el que el compuesto de la presente invención no se trató, pero el grupo en el que el compuesto de la presente invención se trató es similar al intestino grueso normal (figura 3).

20 *2. Regulación del estrés oxidativo mediante (tetrahidropiran-4-il)-[2-fenil-5-(1,1-dioxo-tiomorfolin-4-il)metil-1H-indol-7-il]amina*

25 Las ROS desempeñan un papel muy importante en la regulación de la función celular en el cuerpo y contribuyen a la acción defensiva de células inmunitarias en el sistema inmunitario. En células necróticas, la mitocondria genera ROS, oxidando así a la HMGB1. Finalmente, la HMGB1 oxidada provocada tolerancia inmunitaria.

30 Por consiguiente, los presentes inventores observaron una respuesta inmunitaria mediante estrés oxidativo a través del modelo de ratón con EICH. Como resultado, se observó que en el grupo en el que se trató el compuesto de la presente invención, la razón de generación de especies reactivas de oxígeno en las células se suprimió significativamente según una manera dependiente de la dosis y del tiempo, en comparación con el grupo de control (figura 4).

35 *3. Supresión de la generación de HMGB1 mediante (tetrahidropiran-4-il)-[2-fenil-5-(1,1-dioxo-tiomorfolin-4-il)metil-1H-indol-7-il]amina*

40 Es bien conocido que la liberación de HMGB1 presenta la posibilidad de que la función regule la inflamación y la inmunidad. Por tanto, en este estudio los animales del grupo de prueba en el que el modelo de ratón con EICH se trató con el compuesto de la presente invención y el modelo de control se sacrificó, se extrajo el ARN de las células del bazo, y después se sintetizó el ADnc, y se realizó un estudio comparativo sobre la expresión de HMGB1 mediante PCR en tiempo real. Como resultado, se confirmó que la liberación de HMGB1 en el grupo en el que el compuesto de la presente invención se trató se suprimió significativamente de manera dependiente del tiempo, en comparación con el grupo de control (figura 5).

45 *4. Regulación de la respuesta inmunitaria mediante (tetrahidropiran-4-il)-[2-fenil-5-(1,1-dioxo-tiomorfolin-4-il)metil-1H-indol-7-il]amina*

50 Los presentes inventores encontraron que en el modelo de ratón con EICH, se redujo el rechazo de trasplante inmunitario, y se suprimieron la producción de ROS y HMGB1 y la necrosis celular en tejidos mediante el compuesto de la presente invención, de forma que se intentó observar la posibilidad de regular la respuesta inmunitaria en el modelo animal de enfermedad inmunitaria. Por consiguiente, ratones del grupo de prueba en el que se trató el compuesto de la presente invención y el grupo de control se sacrificó, se aislaron sus bazos, se llevó a cabo aislamiento de células individuales, y la función de regulación inmunitaria se exploró mediante citometría de flujo. Como resultado, en el grupo en el que se trató el compuesto de la presente invención, las células reguladoras inmunitarias CD4+CD25+Foxp3+ (células T reguladoras) se aumentaron 6 veces o más, en comparación con el grupo de control. Además, aumentaron las células CD4+IL-4, y las células CD4+IFN-γ se redujeron a más de la mitad (figura 6). En el modelo de EICH, tras la irradiación de altas dosis de radiación, las células T trasplantadas del donante son activadas y proliferadas por células del huésped que presentan antígenos para secretar IFN-γ, el cual es conocido como una citocina representativa que provoca EICH. Los resultados experimentales anteriores mostraron que el compuesto de la presente invención suprimió el IFN-γ mediante la regulación por incremento de células T reguladoras y de IL-4. Por tanto, puede saberse que el compuesto de la presente invención puede suprimir la respuesta inmunitaria mediante la supresión de la activación de las células T trasplantadas.

65 Ejemplo 6: Confirmación sobre el efecto de inducir la diferenciación en células T reguladoras mediante (tetrahidropiran-4-il)-[2-fenil-5-(1,1-dioxo-tiomorfolin-4-il)metil-1H-indol-7-il]amina en experimentación *in vitro*

Se llevó a cabo la experimentación para investigar el efecto del compuesto de la presente invención sobre la

diferenciación de células Th de linfocitos. Se dispensaron 5×10^5 células T CD4⁺ aisladas del bazo del ratón en una placa de 24 pocillos recubierta con 1 µg/ml de anti-CD3 (aCD3), y a continuación se trataron con 1 µg/ml de anti-CD8 (aCD28) y 5 ng/ml de TGF-beta para inducir la diferenciación en las células T reguladoras durante 3 días. Antes de la diferenciación en las células T reguladoras, el compuesto (tetrahidropiran-4-il)-[2-fenil-5-(1,1-dioxo-tiomorfolin-4-il)metil-1H-indol-7-il]amina (a continuación en el presente documento denominado "compuesto A") (LG Life Sciences Ltd., Daejeon, Corea) de la presente invención se trató con la concentración de 40 µM y de 80 µM. Para la citometría de flujo, se añadieron a lo mismo anticuerpos marcados con fluorescencia con PE CD4 PerCP, CD25 APC y FoxP3 anti-ratón y se hicieron reaccionar a 4°C durante 30 minutos. Tras lavar con PBS, se llevó a cabo la medición con un citómetro de flujo (FACSCalibur™).

Como tal, como resultado del tratamiento con el compuesto A tras crear un entorno de diferenciación de células T reguladoras mediante la estimulación de células T CD4⁺ con aCD3, aCD28 y TGF-beta, la expresión de Foxp3⁺ se duplicó prácticamente mediante la promoción de la diferenciación en células T reguladoras, en comparación con el grupo de control en el que el compuesto A no se trató, y la diferenciación en células T reguladoras se aumentó de manera dependiente de la concentración del compuesto A. Específicamente, puede saberse que el compuesto A promueve la diferenciación en células Foxp3⁺ Treg mediante la regulación de señales de TGF-beta (figuras 7 y 8).

Ejemplo 7: Comparación de la proliferación de células T reguladoras mediante inductor de diferenciación convencional retinal/ácido retinoico y compuesto A, y confirmación sobre el efecto de la terapia de combinación en experimentación *in vitro*

Se sabe que el RA aumenta la diferenciación en Foxp3⁺ Treg en presencia de TGF-beta. De los resultados experimentales del ejemplo 6, se confirmó que el compuesto A aumentó en gran medida la expresión de Foxp3⁺ específicamente, de forma que se realizó la experimentación en la que el compuesto A se comparó con el efecto del convencionalmente conocido RA.

Se dispensaron 5×10^5 células T CD4⁺ aisladas de células del bazo del ratón en una placa de 24 pocillos recubierta con 1 µg/ml de anti-CD3 (aCD3), y a continuación se trataron con 1 µg/ml de anti-CD8 (aCD28) y 5 ng/ml de TGF-beta para inducir la diferenciación en las células T reguladoras durante 3 días, y los grupos se dividieron en (1) grupo tratado solamente con 40 µM u 80 µM de compuesto A, (2) grupo tratado solamente con 0,1 µM de ácido retinoico (RA), (3) grupo tratado con 1 µM de retinal, (4) grupo tratado con 0,1 µM de RA y 40 µM u 80 µM de compuesto A, y (5) grupo tratado con 1 µM de retinal y 40 µM u 80 µM de compuesto A, y entonces se comparó el efecto sobre la diferenciación en células T reguladoras de cada grupo.

Como lo anterior, como resultado de tratar células CD4⁺ con cada compuesto solo o en combinación en presencia de aCD3, aCD28 y TGF-beta, en el caso de tratar con compuesto A solo, la expresión de Foxp3⁺ se aumentó en un grado similar que en el caso de tratar con retinal o RA. Además, en los casos de tratar con compuesto A en combinación con RA o retinal, la expresión de Foxp3⁺ se aumentó en comparación con los grupos en los que cada compuesto se trató solo. Estos resultados confirmaron que el compuesto A promovía la diferenciación en células T reguladoras en la diferenciación de células Th (figuras 9 y 10).

Ejemplo 8: Confirmación sobre el efecto de células T reguladoras inducido por el compuesto A en la supresión de la proliferación de células de respuesta inmunitaria alogénicas

Para confirmar la función de células T reguladoras inducidas por el compuesto A (a continuación en el presente documento denominado "iTreg"), se evaluó si las células iTreg podrían suprimir la proliferación de células T (estimulación aCD3+aCD28+) y la actividad de las células de respuesta inmunitaria alogénicas (alorespuesta de B6 CD4⁺ y 2000 cGy B/c APC). Para ello, se llevó a cabo un análisis comparativo mediante la prueba de cultivo mixto de leucocitos de (1) células Treg inducidas mediante la adición de aCD3 y aCD28, (2) células Treg inducidas mediante la adición de aCD3, aCD28 y TGF-β (nombradas "TGF-beta Treg"), (3) células Treg inducidas mediante la adición de aCD3, aCD28, TGF-β y RA (nombradas "RA Treg"), (4) células Treg inducidas mediante la adición de aCD3, aCD28, TGF-β y 40 µM de compuesto A (nombradas "compuesto A Treg"), y (5) células Treg inducidas mediante la adición de aCD3, aCD28, TGF-β y 80 µM de compuesto A (nombradas "compuesto A Treg").

En primer lugar, se llevó a cabo el análisis de la proliferación de células T. Se dispensaron 1×10^5 células T CD4⁺ de ratón en una placa de fondo redondo de 96 pocillos recubierta con 1 µg/ml de anti-CD3 (aCD3), y a continuación se estimularon con 1 µg/ml de anti-CD8 (aCD28) para crear un entorno para la proliferación de las células T CD4⁺.

En segundo lugar, mediante la incubación conjunta de 1×10^5 células de bazo del donante y 1×10^5 células de bazo del receptor irradiadas con radiación de 20 Gy, se indujo la respuesta inmunitaria alogénica de las células de bazo del donante a las células de bazo del receptor.

Se añadieron a cada pocillo 1×10^5 células T reguladoras inducidas *in vitro* de 5 grupos en razón 1:1 de células T CD4⁺ e se incubaron a 37°C durante 3-4 días. Entonces, se añadió [³H]timidina a lo mismo y se incubó durante 8-14 horas antes de la recolección. Se midió la radiactividad de las células obtenidas mediante filtración con una máquina

de recolección Tomtec.

5 De los resultados experimentales, se confirmó que las Treg inducidas por el compuesto A suprimían de manera más eficiente la actividad de las células T de acuerdo con la proliferación de células T y la respuesta inmunitaria alogénica, en comparación con TGF-beta Treg y RA Treg (figuras 11 y 12).

Ejemplo 9: Confirmación sobre el efecto en la diferenciación de células T reguladoras mediante el compuesto A en experimentación *in vitro*

10 Se añadieron 1×10^6 células T CD4⁺ aisladas de células de bazo de células que presentan antígenos (APC) C57BL/6 y BALBc irradiadas a 20 Gy a una placa de 48 pocillos y se incubaron a 37°C durante 5 días. La incubación se llevó a cabo bajo la condición de que la respuesta inmunitaria alogénica por células que presentan antígenos se induce a las células de bazo, y se llevó a cabo el tratamiento con el compuesto A a diversas concentraciones antes de que la incubación se llevara a cabo para un análisis comparativo. Las células se recogieron tras una incubación de 5 días, y para la citometría de flujo se añadieron anticuerpos marcados con fluorescencia con PE CD4 PerCP, CD25 APC y FoxP3 anti-ratón, y se hicieron reaccionar a 4°C durante 30 minutos. Tras lavar con PBS, se llevó a cabo la medición con un citómetro de flujo (FACSCalibur™).

20 Como resultado, se confirmó que las células T reguladoras se aumentaron según la concentración de compuesto A (figura 13).

Ejemplo 10: Confirmación sobre el efecto en el incremento de células T reguladoras mediante el compuesto A en un modelo de ratón de enfermedad de injerto contra huésped (EICH) *in vivo*

25 Se usaron el ratón C57BL/6/6 (H-2kb) y el ratón BALB/c (H-2kd) de 6-8 semanas de edad que presentan distinta clase MHC entre ellos. Se irradió un ratón receptor BALB/c (H-2kd) con radiación sistémica a 8 Gy. En el plazo de 24 horas, se trasplantaron 5×10^6 células de médula ósea y 5×10^6 células de bazo aisladas del ratón donante C57BL/6 (H-2kd) al ratón receptor por vía intravenosa para inducir el modelo de reacción de rechazo de injerto contra huésped (modelo de EICH). Se inyectó el compuesto A por vía intravenosa en el modelo de EICH cuatro veces por semana durante dos semanas. Los ratones se sacrificaron, se llevó a cabo aislamiento de células individuales, y la función de la regulación inmunitaria en el bazo se investigó mediante citometría de flujo. Como resultado, se confirmó que en el grupo en el que se administró el compuesto A, se aumentaron las células T CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ reguladoras.

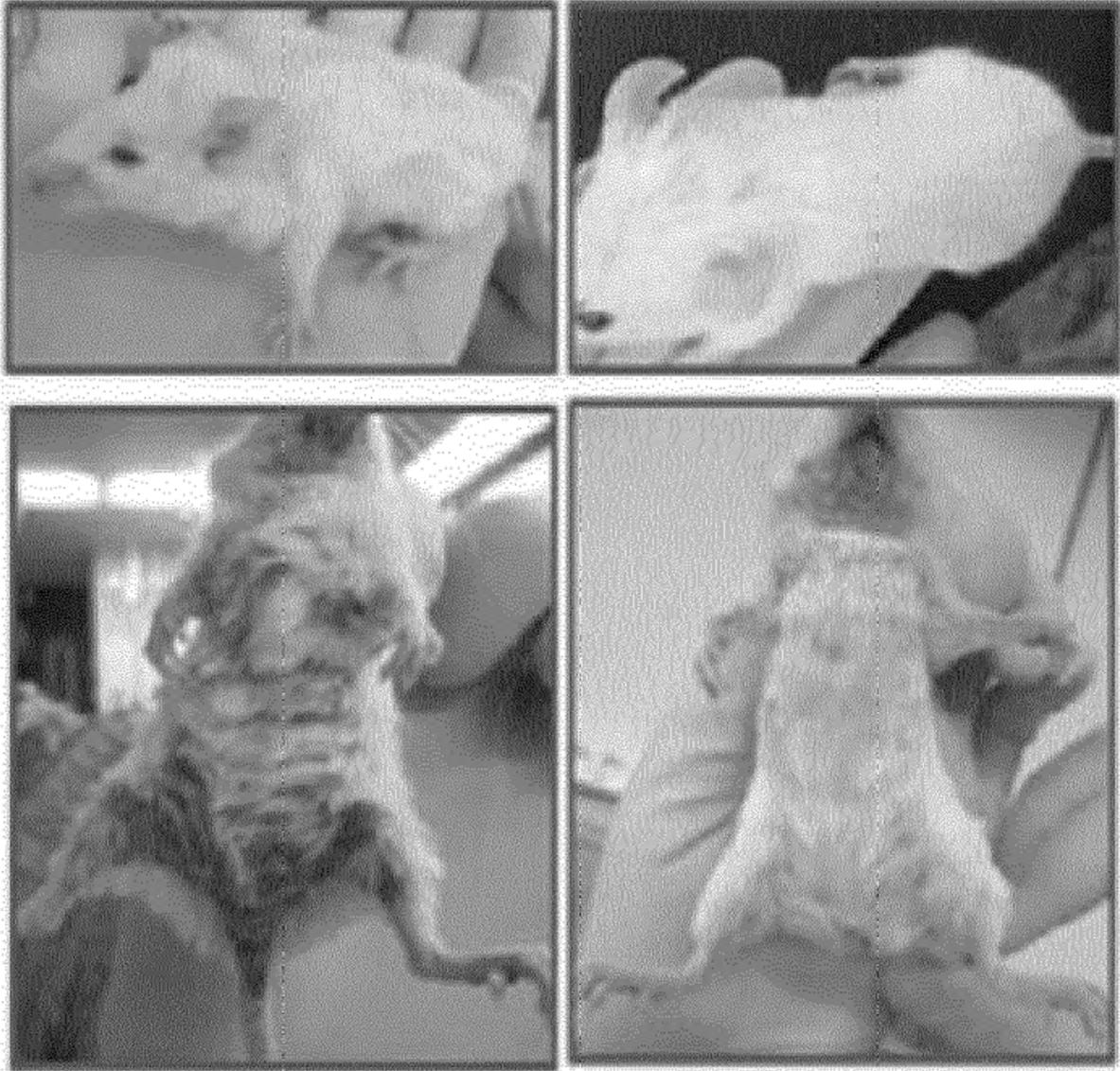
REIVINDICACIONES

- 5 1. Composición farmacéutica para su uso en la supresión de la respuesta inmunitaria, que comprende (tetrahidropiran-4-il)-[2-fenil-5-(1,1-dioxo-tiomorfolin-4-il)metil-1H-indol-7-il]amina, una sal o isómero farmacéuticamente aceptable de la misma.
- 10 2. Composición farmacéutica según la reivindicación 1 para su uso en la supresión de la respuesta inmunitaria según la reivindicación 1, que es para suprimir la reacción de rechazo inmunitario al trasplante de piel, sangre, córnea, hígado, pulmón, intestino, páncreas, corazón, riñón, médula ósea, célula madre o célula precursora.
- 15 3. Composición farmacéutica según la reivindicación 1 para su uso en la supresión de la respuesta inmunitaria según la reivindicación 1, que es para su uso en el tratamiento y prevención de enfermedad de injerto contra huésped, enfermedad alérgica, enfermedad autoinmunitaria o enfermedad inflamatoria.
- 20 4. Composición para su uso en la supresión de la respuesta inmunitaria mediante la inducción de la diferenciación de células T inmaduras en células T reguladoras y/o la promoción de la proliferación de células T reguladoras, que comprende (tetrahidropiran-4-il)-[2-fenil-5-(1,1-dioxotiomorfolin-4-il)metil-1H-indol-7-il]amina, una sal o isómero farmacéuticamente aceptable de la misma.
- 25 5. Composición según la reivindicación 4 para su uso según la reivindicación 4, que además comprende un anticuerpo anti-CD3, un anticuerpo anti-CD28 y TGF-beta.
6. Composición según la reivindicación 4 para su uso según la reivindicación 4 que además comprende ácido retinoico (RA) o retinal.
- 30 7. Composición según la reivindicación 4 para su uso según la reivindicación 4, en la que la célula T reguladora tiene el fenotipo de CD4⁺, CD25⁺ y Foxp3⁺.
- 35 8. Método *ex vivo* para inducir la diferenciación en células T reguladoras, que comprende una etapa de tratamiento de células T inmaduras con la composición tal como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 7 *ex vivo*.
9. Método *ex vivo* para promover la proliferación de células T reguladoras, que comprende una etapa de tratamiento de células T inmaduras con la composición tal como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 7 *ex vivo*.
- 40 10. Método *ex vivo* para la obtención de células T reguladoras mediante la inducción de la diferenciación y la promoción de la proliferación de células T reguladoras, que comprende una etapa de tratamiento de células T inmaduras con la composición tal como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 7 *ex vivo*.

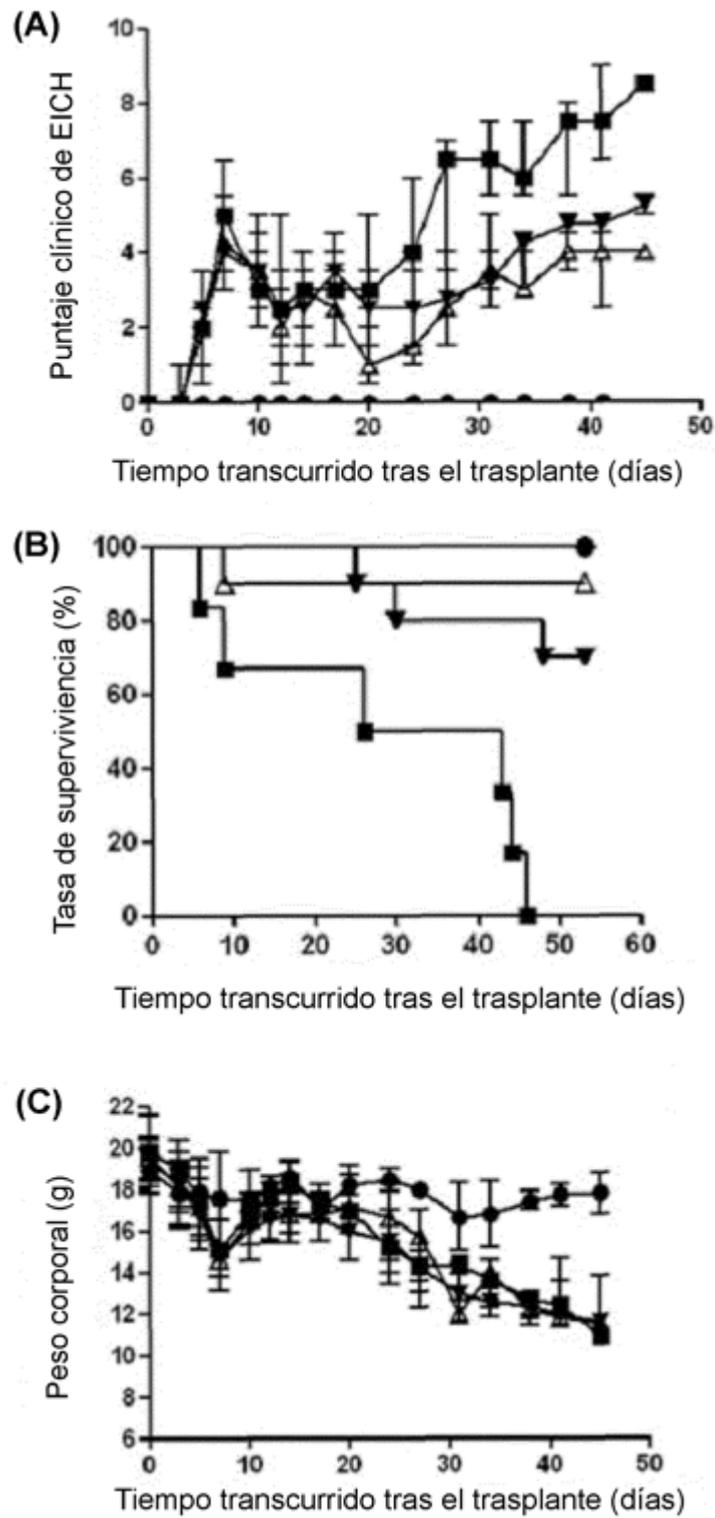
[Fig. 1]

EICH

Grupo tratado con
el compuesto A



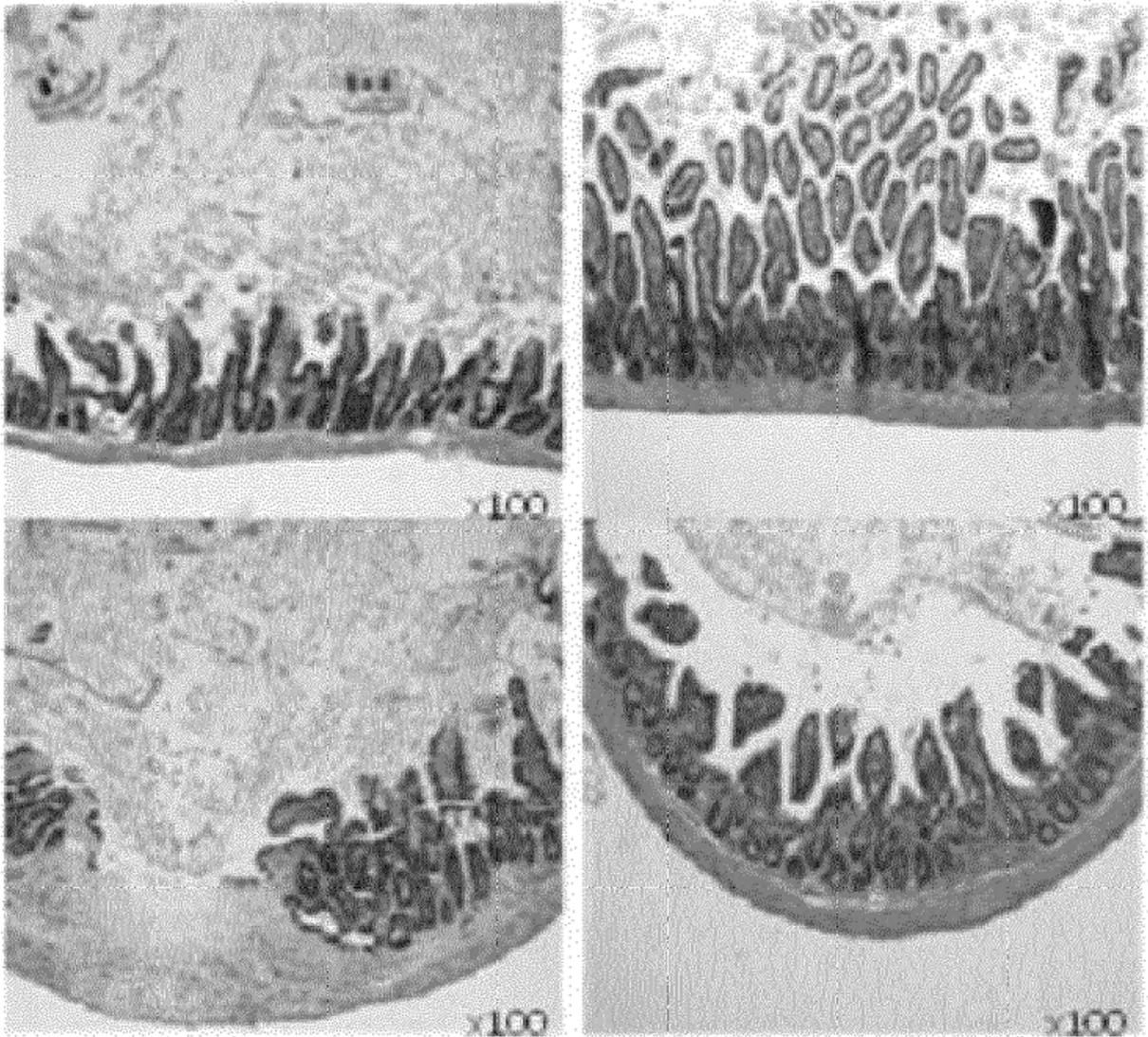
[Fig. 2]



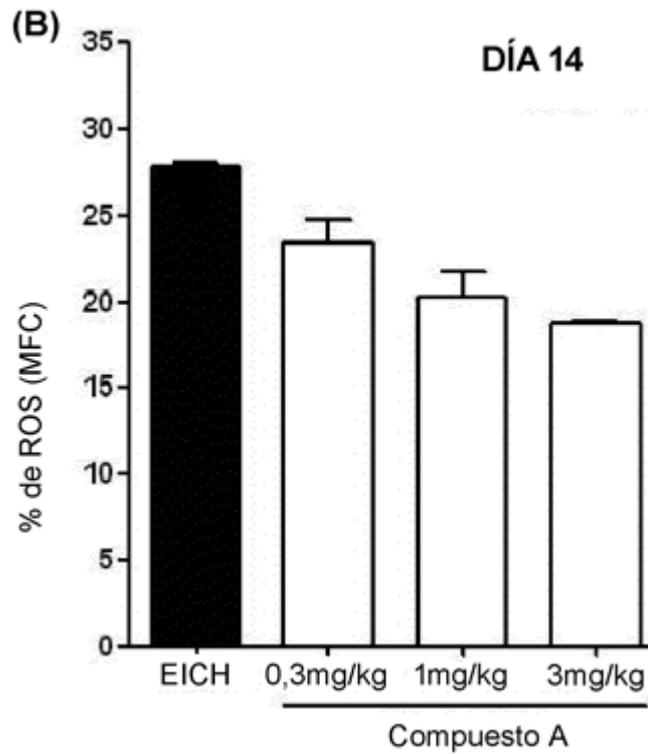
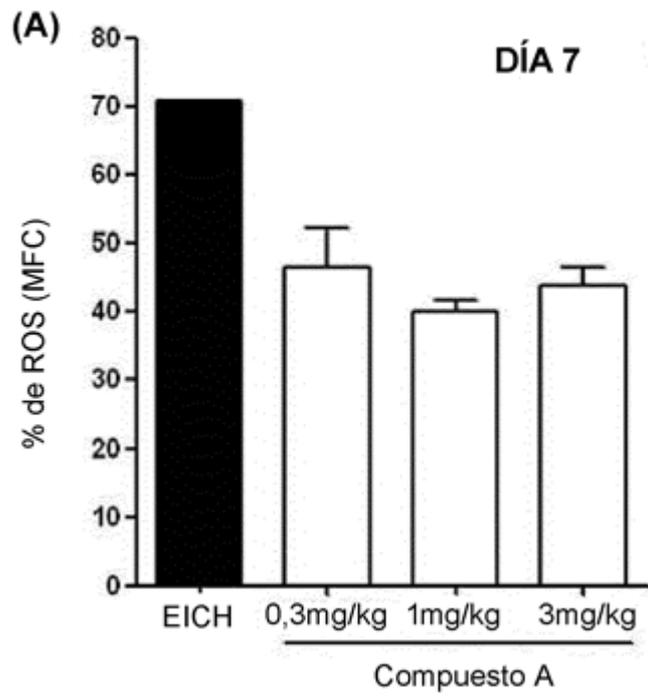
[Fig. 3]

EICH

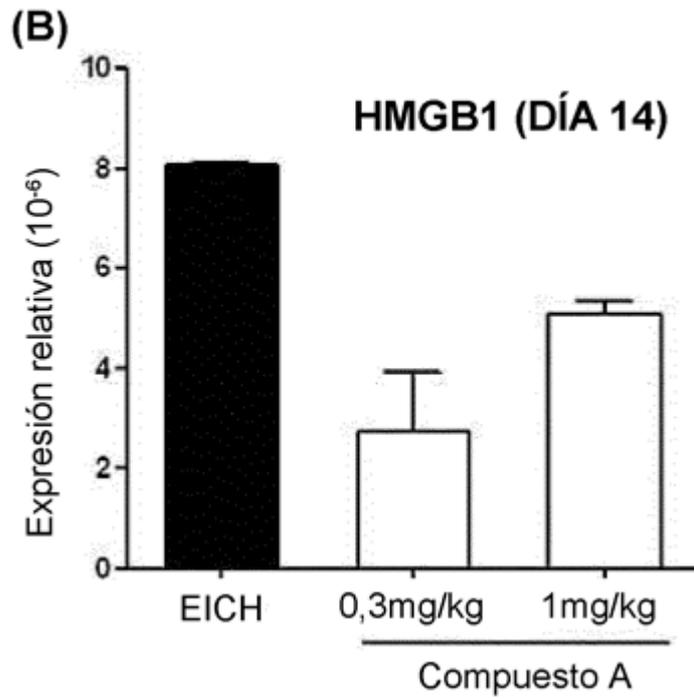
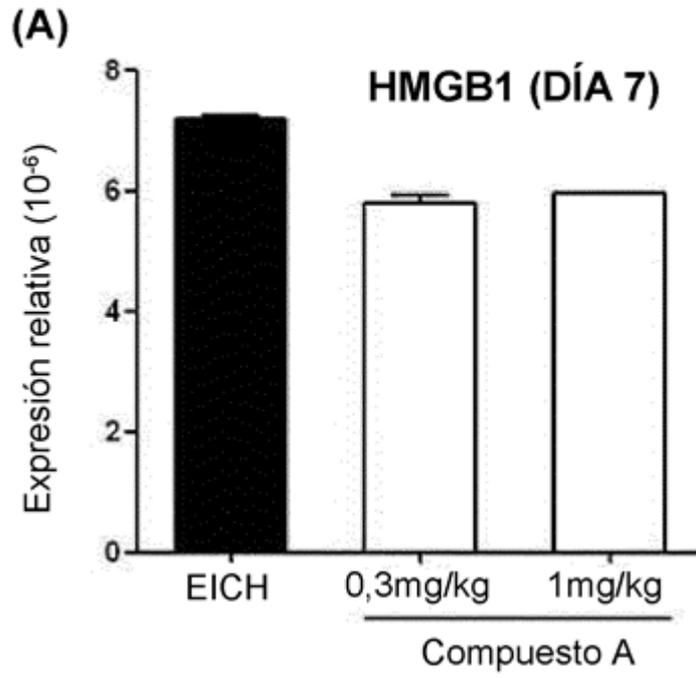
Grupo tratado con el compuesto A



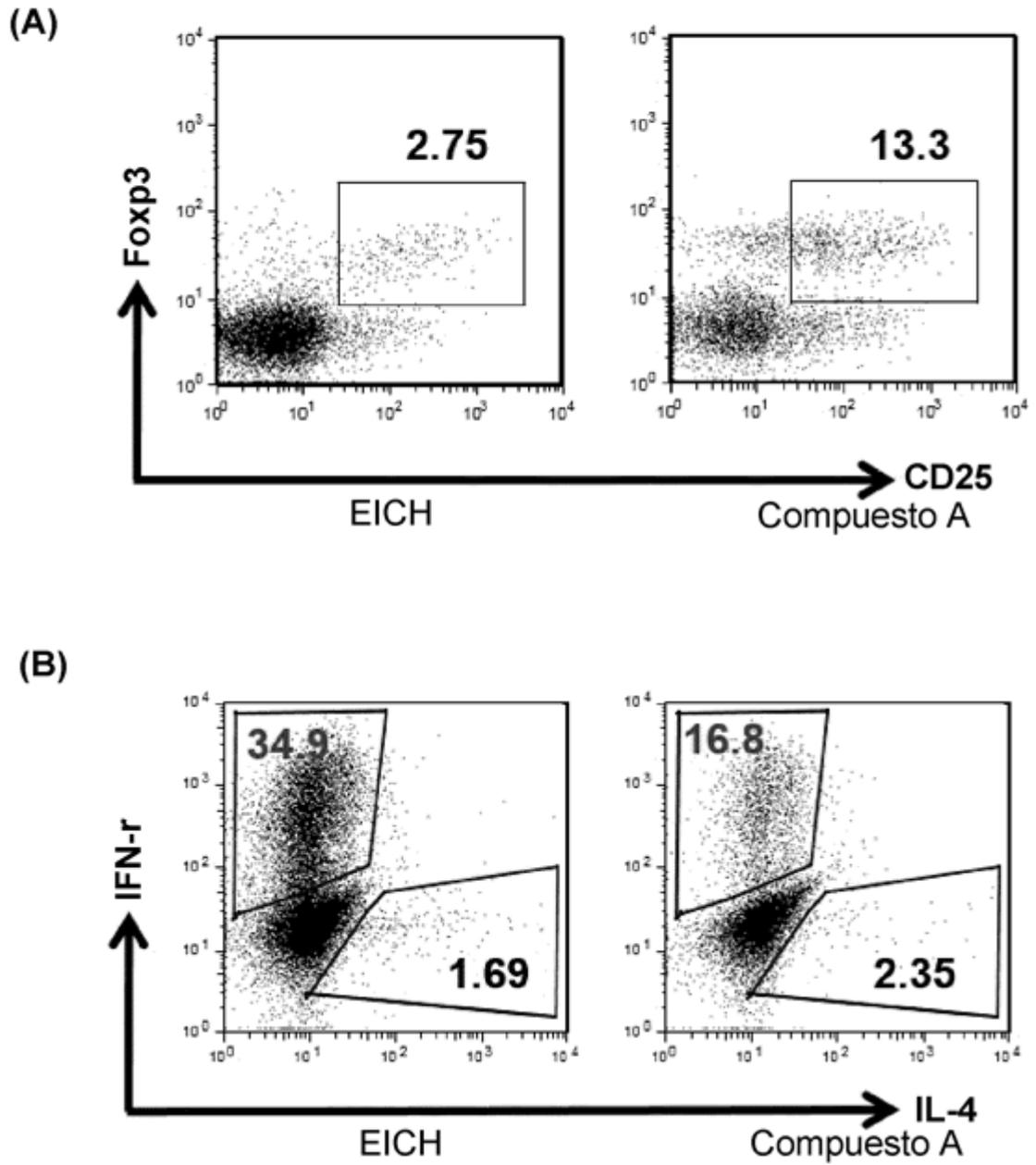
[Fig. 4]



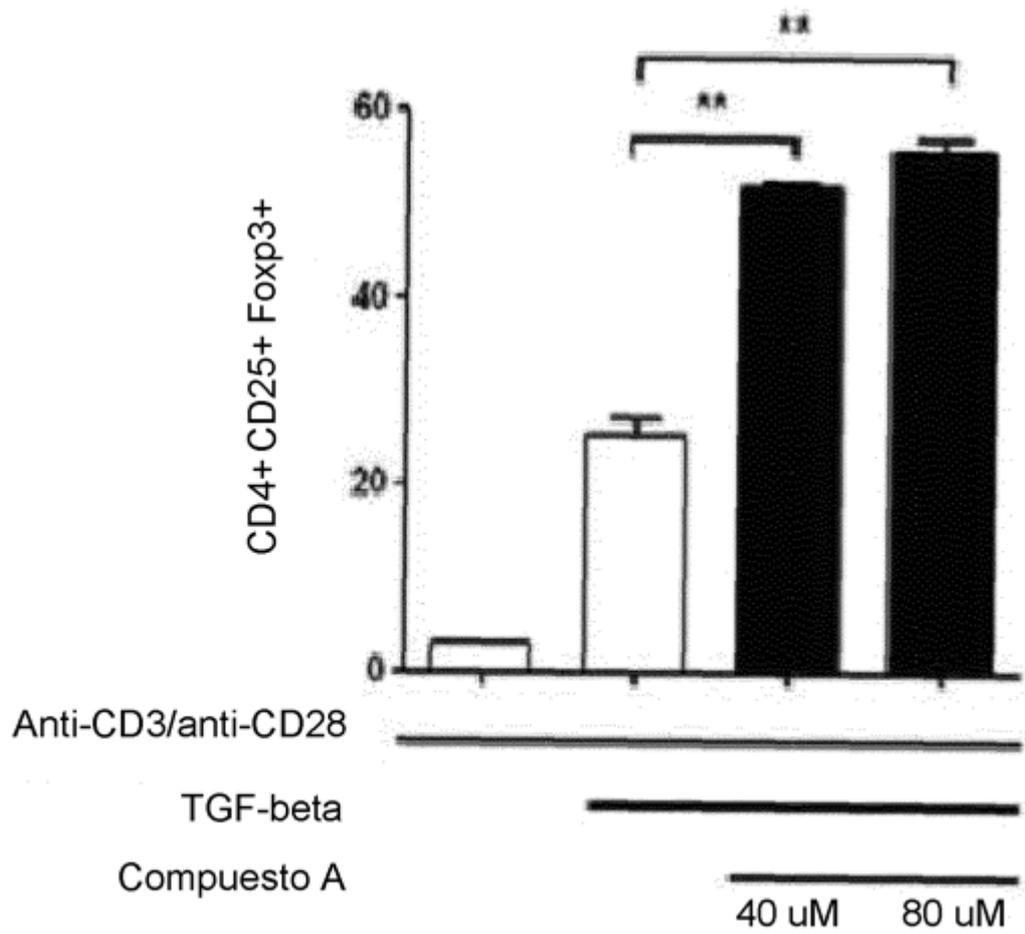
[Fig. 5]



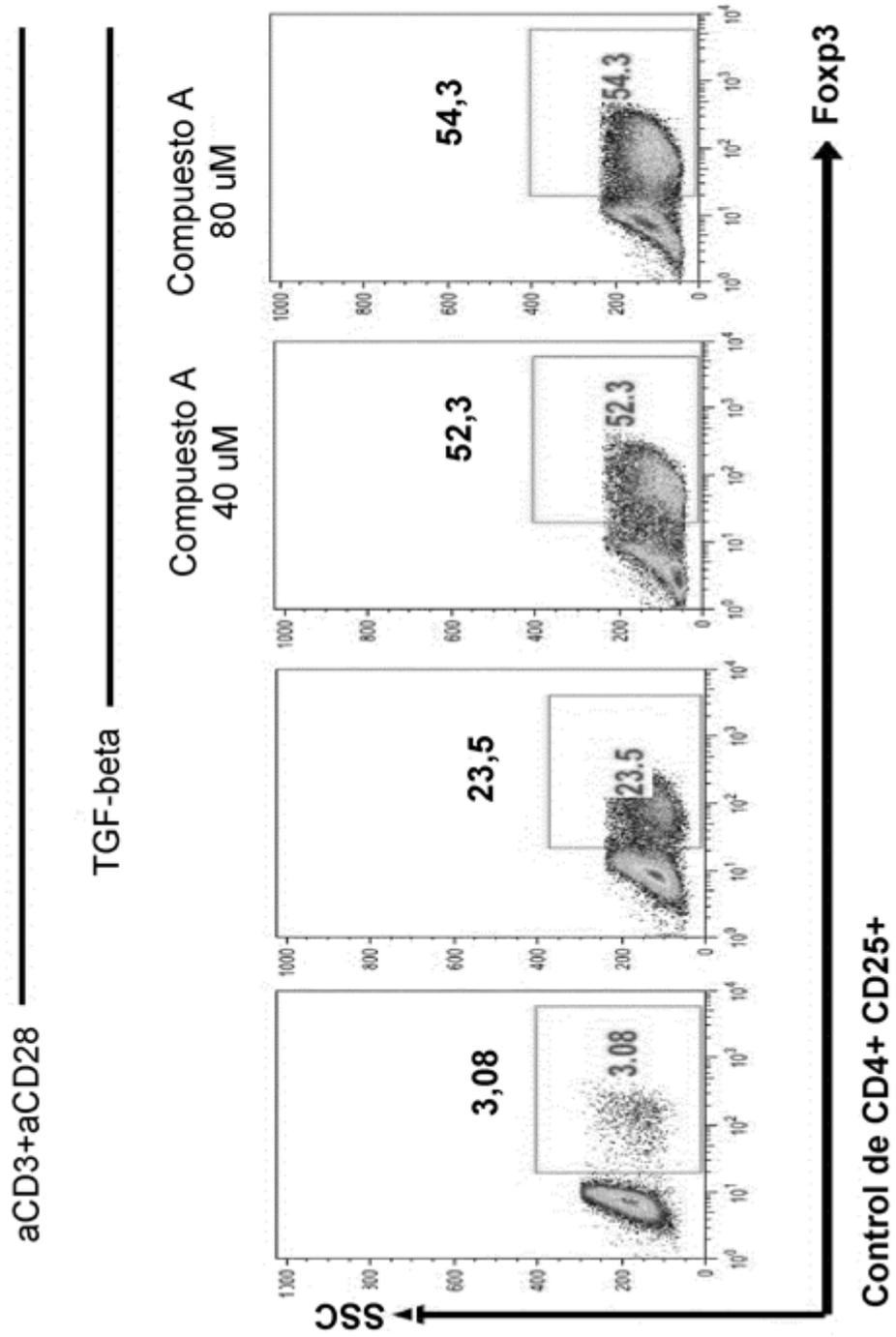
[Fig. 6]



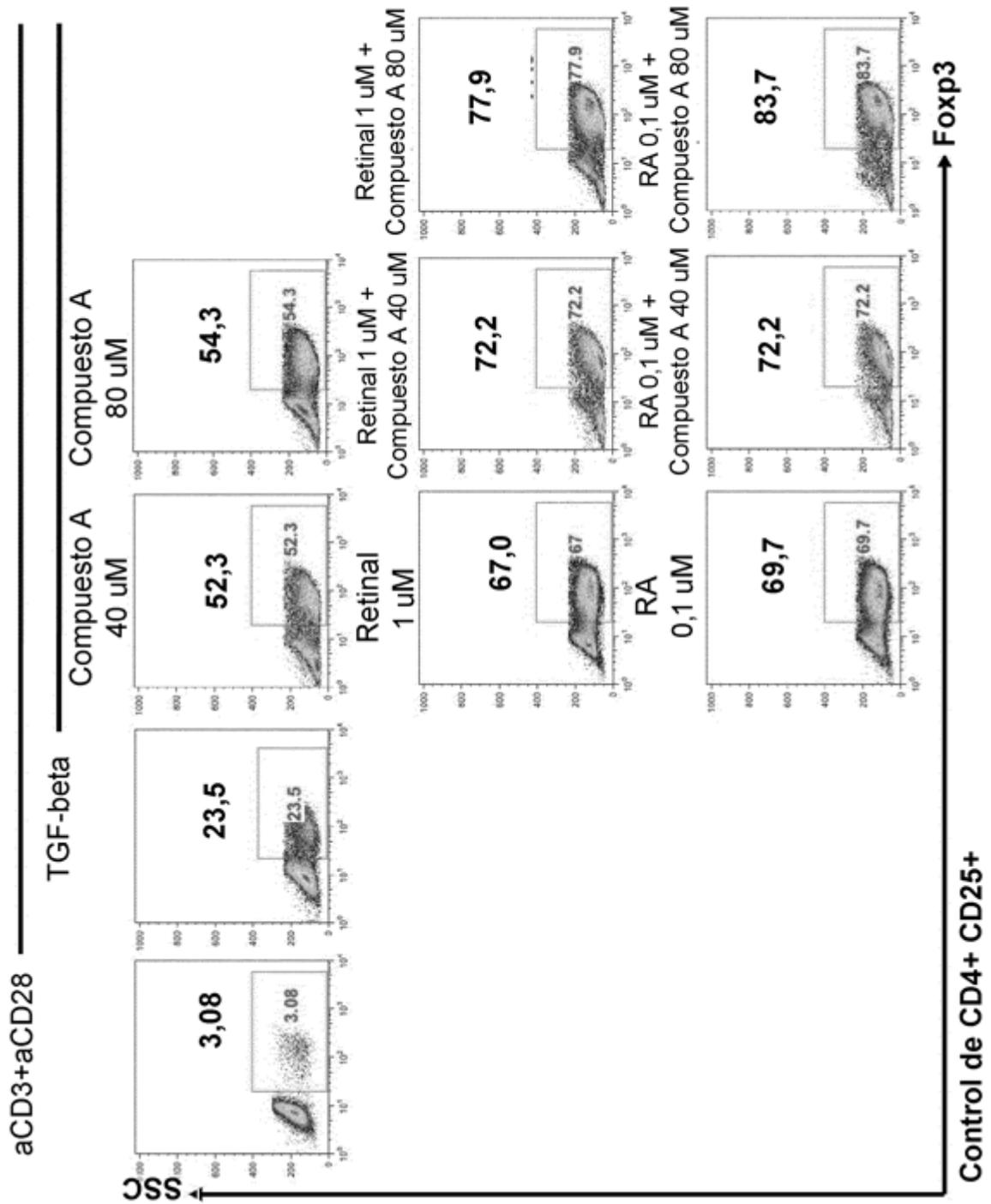
[Fig. 7]



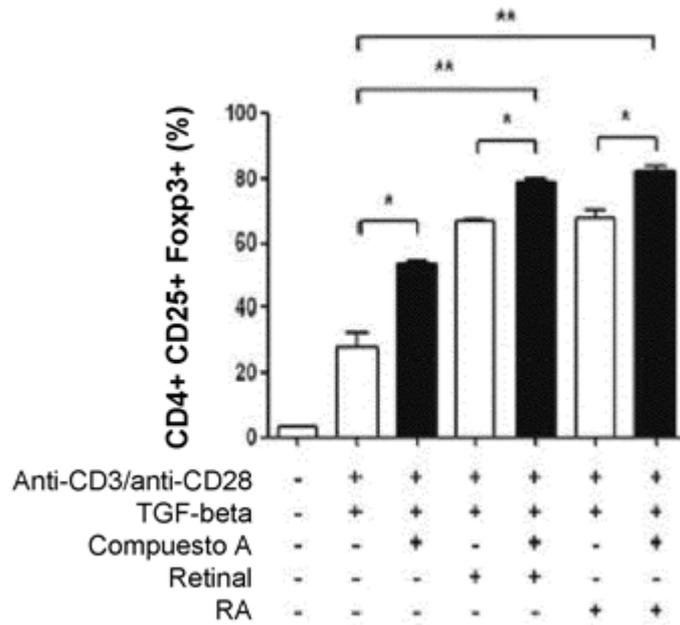
[Fig. 8]



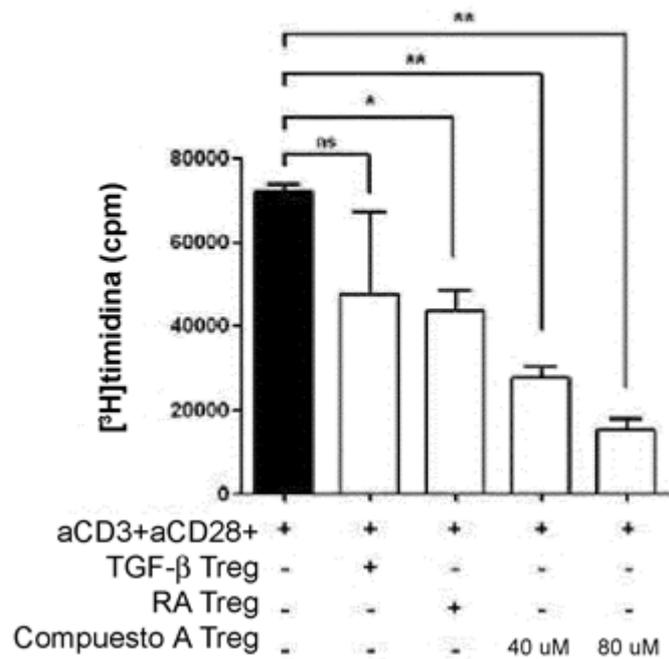
[Fig. 9]



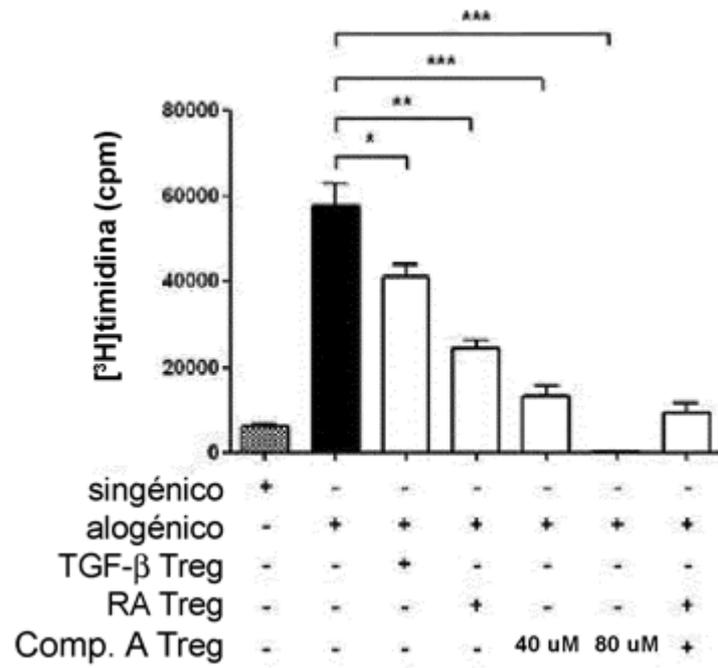
[Fig. 10]



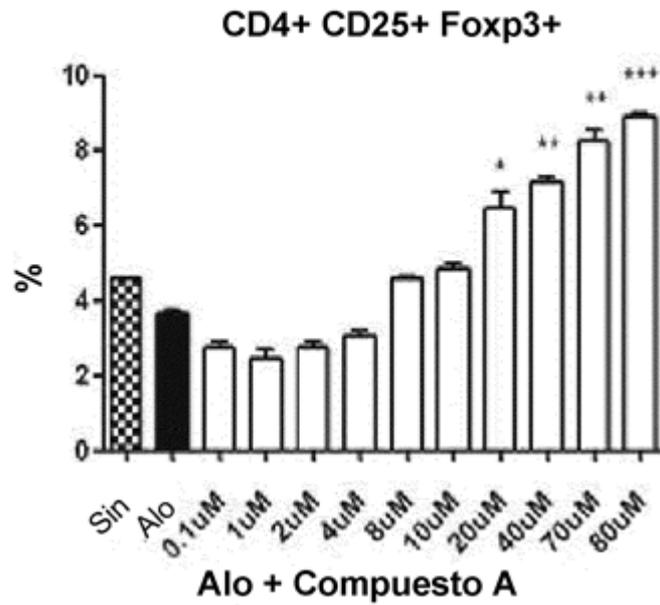
[Fig. 11]



[Fig. 12]



[Fig. 13]



[Fig. 14]

