

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 741 447**

51 Int. Cl.:

A61K 31/519 (2006.01)

A61P 37/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.09.2015** **PCT/EP2015/072488**

87 Fecha y número de publicación internacional: **07.04.2016** **WO16050806**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.09.2015** **E 15771948 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.05.2019** **EP 3200798**

54 Título: **Tratamientos contra enfermedad autoinmune**

30 Prioridad:

29.09.2014 GB 201417165

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

11.02.2020

73 Titular/es:

**THE PROVOST, FELLOWS, FOUNDATION
SCHOLARS, & THE OTHER MEMBERS OF
BOARD, OF THE COLLEGE OF THE HOLY &
UNDIV. (100.0%)
Trinity of Queen, College Green
Dublin 2, IE**

72 Inventor/es:

KELLY, VINCENT

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 741 447 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

Tratamientos contra enfermedad autoinmune.

Campo de la técnica

La invención se refiere a un enfoque novedoso para el tratamiento de enfermedades autoinmunes, particularmente la esclerosis múltiple.

Antecedentes de la técnica

La esclerosis múltiple (EM) es una enfermedad debilitante del sistema nervioso central (SNC) en la que el propio sistema inmunitario del cuerpo ataca la materia blanca del cerebro y de la médula espinal. Esto desencadena daños inducidos por inflamación en la capa de mielina protectora del SNC causando desmielinización. La pérdida de mielina expone las neuronas a un ataque posterior que conduce a la formación de múltiples lesiones escleróticas. Este daño interrumpe la capacidad de partes del sistema nervioso para comunicarse, lo que da lugar a una amplia gama de problemas incluidos fatiga, visión borrosa, deterioro cognitivo y espasticidad. Muchos pacientes experimentan el desarrollo de una discapacidad motora irreversible. El pronóstico a largo plazo es desfavorable, dentro de los 15 años posteriores a la aparición de la enfermedad, aproximadamente el 50 % de los pacientes no pueden caminar sin ayuda (Polman y Uitdehaag, 2000).

La EM adopta varias formas, con nuevos síntomas que aparecen en ataques aislados (formas recurrentes) o que se acumulan con el tiempo (formas progresivas).

En la actualidad no existe una cura conocida para la esclerosis múltiple. Los tratamientos actuales intentan mejorar la función después de un ataque y/o evitar ataques posteriores. Los medicamentos utilizados para tratar la EM, aunque modestamente eficaces, pueden tener efectos adversos y ser mal tolerados.

Hay una serie de terapias inyectables de primera línea:

- interferón beta-1a (Avonex)
- interferón beta-1a (Rebif)
- interferón beta-1b (Betaferon)
- acetato de glatiramer (Copaxone)

Los interferones pueden producir síntomas similares a los de la gripe y algunas personas que toman glatiramer experimentan una reacción después de la inyección con enrojecimiento, opresión en el pecho, palpitaciones del corazón, dificultad para respirar y ansiedad que, por lo general, dura menos de treinta minutos. Más peligroso, pero mucho menos común es el daño hepático. Glatiramer se asocia con irritación de la piel en el sitio de la inyección.

Las terapias adicionales incluyen:

- Natalizumab, que reduce la tasa de recaídas más que los agentes de primera línea; sin embargo, debido a los problemas de los efectos adversos como la leucoencefalopatía multifocal progresiva, es un agente de segunda línea reservado para aquellos que no responden a otros tratamientos o con enfermedad grave.
- Fingolimod (Gilenya) - autorizado en marzo de 2011 para personas con EM recurrente-remitente grave de rápida evolución (dos o más recaídas al año), y como tratamiento de segunda línea para personas cuya EM permanece activa a pesar del tratamiento con uno de los fármacos de interferón beta.
- Fumarato de dimetilo (Tecfidera) fue autorizado por la FDA en 2013 y es una terapia oral de primera línea para adultos con formas recurrentes-remitentes de EM.
- Teriflunomida (Aubagio) fue aprobada por la FDA en septiembre de 2012, es un medicamento inmunomodulador disponible por vía oral para el tratamiento de las formas recurrentes de EM.
- Mitoxantrona, cuyo uso está limitado por sus efectos adversos graves, disfunción sistólica, infertilidad y leucemia mieloide aguda es una opción de tercera línea para aquellos que no responden a otros medicamentos.

Los corticosteroides (o esteroides) a veces se administran durante unos días, ya sea en forma de comprimidos o por goteo intravenoso. Aunque no hay evidencia de que los esteroides tengan ningún efecto en el curso de la enfermedad a largo plazo, pueden ser eficaces para acelerar la recuperación desde la recaída.

Ningún tratamiento ha demostrado cambiar el curso de la EM progresiva primaria y a partir de 2011 sólo se ha aprobado un medicamento, la mitoxantrona, para la EM progresiva secundaria. En esta población, la evidencia provisional apoya la mitoxantrona que ralentiza moderadamente la progresión de la enfermedad y disminuye las tasas de recaída durante dos años.

Hay investigaciones en curso que buscan tratamientos más eficaces, convenientes y tolerables para la EM recurrente-remitente.

Los anticuerpos monoclonales han suscitado altos niveles de interés. El anticuerpo monoclonal CD52 alemtuzumab, anticuerpo monoclonal CD25 daclizumab y los anticuerpos monoclonales CD20 como rituximab, ocrelizumab y ofatumumab han demostrado algún beneficio y están bajo estudio como tratamientos potenciales. Su uso también ha sido acompañado por la aparición de efectos adversos potencialmente peligrosos, los más importantes las infecciones oportunistas.

En consecuencia, existe una enorme necesidad médica insatisfecha para el tratamiento de la EM.

Sumario de la invención

La presente invención proporciona nuevos medicamentos para el tratamiento de enfermedades autoinmunes, en particular la esclerosis múltiple.

Un desequilibrio de la función y diferenciación de las células Th puede conducir a inflamación y enfermedad autoinmune. La activación de células T CD4⁺ sin tratamiento previo mediante antígeno hace que se diferencien en células T especializadas efectoras (T_{ef}) (Th1, Th2 o Th17) y en células T reguladoras (T_{reg}), que suprimen las funciones de las células T_{ef}, manteniendo de ese modo las respuestas inmunitarias bajo control. En particular, se ha demostrado que las células Th1 y Th17 y sus citoquinas características IFN- γ e IL-17 desempeñan un papel fundamental en el desarrollo de muchas enfermedades autoinmunes, incluida la esclerosis múltiple (EM).

Se ha identificado un mecanismo novedoso para la regulación de este proceso y, por ello, para el tratamiento de dichas enfermedades. Las moléculas que pueden sacar provecho un complejo enzimático compuesto de dos proteínas, la ARNt guanina transglucosilasa (TGT) también conocida como queuina ARNt-ribosiltransferasa 1, y el dominio queuina ARNt-ribosiltransferasa que contiene 1 (QTRTD1), posteriormente conocido como el complejo enzimático queuina-insertasa, se ha demostrado que tienen efectos beneficiosos en modelos para enfermedades autoinmunes.

Además, son particularmente eficaces aquellas moléculas que son selectivas para evitar vías contrapuestas, tal como no ser sustrato para hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasa (HPRT) o, más positivamente, niveles más bajos de interferón gamma.

La presente invención proporciona nuevos medicamentos para el tratamiento de enfermedades autoinmunes, en particular la esclerosis múltiple.

En una realización de la invención se proporciona una molécula capaz de actuar como sustrato para el complejo enzimático queuina-insertasa y donde dicha molécula no es un sustrato para hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasa (HPRT) para su uso en el tratamiento de enfermedades autoinmunes. Preferiblemente la enfermedad autoinmune es la esclerosis múltiple.

En una realización adicional de la invención se proporciona una molécula capaz de actuar como sustrato para el complejo enzimático queuina-insertasa, donde dicha molécula no es un sustrato para HPRT y donde dicha molécula tiene el efecto de disminuir interferón gamma, para su uso en el tratamiento de enfermedades autoinmunes. Preferiblemente la enfermedad autoinmune es la esclerosis múltiple.

Para moléculas que disminuyen la producción de interferón gamma en células de tipo salvaje, se prefieren aquellas moléculas que son capaces de disminuirla a una concentración de 100 μ M.

Especialmente preferidas son aquellas moléculas que disminuyen el interferón gamma a ≤ 1.750 ng/ml.

Las más preferidas son aquellas moléculas que disminuyen el interferón gamma a ≤ 1.100 ng/ml.

Alternativamente, se pueden probar moléculas que disminuyen la producción de interferón gamma mediante el uso de células de animales en donde el gen TGT ha sido desactivado, posteriormente conocidas como células TGT-KO). Se prefieren aquellas moléculas que a una concentración de 100 μ M no la reducen a ≤ 3.500 ng/ml.

Especialmente preferidas son aquellas moléculas que no disminuyen el interferón gamma a ≤ 4.250 ng/ml.

Las más preferidas son aquellas moléculas que no la disminuyen a ≤ 5.000 ng/ml.

El lector experto será consciente de procedimientos para determinar si una molécula, en particular, es o no un sustrato para el complejo enzimático queuina-insertasa. Por ejemplo, las moléculas capaces de actuar como sustrato para el complejo enzimático queuina-insertasa pueden identificarse mediante el uso de un ensayo de desplazamiento como se describe a continuación (Figura 1):

Producción de ARNt marcado (ARNt*) con [8-¹⁴C]-guanina

Los componentes se añaden en el orden indicado en la Tabla 1. Antes de añadir la solución de 8-[¹⁴C]-guanina a la reacción, la solución se neutralizó con un volumen igual (vol./vol.) de NaOH 0,01 M, ya que la [8-¹⁴C]-guanina se suministra en solución acuosa de HCl 0,01 M. Se hizo una solución patrón de ARNt de levadura de *Saccharomyces*

cerevisiae a una concentración de 2 unidades de absorbancia (260 nm) en agua ultrapura exenta de nucleasas. La enzima recombinante ARNt guanina transglucosilasa de *Escherichia coli* (E. coli) (TGT de E. coli) que contiene una etiqueta de polihistidina N-terminal se produjo en células *tgt::Km^r*, BL21 BL21(DE3) como se describió anteriormente (Boland et al., 2009).

5 Tabla 1. Componentes de la reacción de marcado de ARNt con [8-¹⁴C]-guanina

Componente	Volumen (μl)	Conc. final
Tris-HCl 1 M, pH 7,5	7,5	50 mM
NaCl 5 M	0,6	20 mM
MgCl ₂ 1 M	0,75	5 mM
DTT 1 M	0,3	2 mM
ARNt de levadura (2 u. de abs./μl)	12,5	25 u. de abs. total en rxn
H ₂ O	hasta 130 μl	
TGT de <i>E. coli</i>	10 μl	10 μg
[8- ¹⁴ C]-guanina	10 μl	

10 La reacción se incubó durante 2 h a 37 °C. Después de la incubación, la reacción se reconstituyó hasta 400 μl con tampón. La mezcla de reacción se extrajo mediante la adición de un volumen igual (400 μl) de ácido fenol:cloroformo (5:1; pH 4,5) y se centrifugó a 16.000 × g durante 5 min. La fase acuosa superior se transfirió a un nuevo tubo de 1,5 ml. El ARNtradiomarcado con [8-¹⁴C]-guanina en la tercera posición del bucle de anticodón (ARNt*) se precipitó por la adición de 0,1 volumen (40 μl) de acetato de sodio 3 M (ac.) y 2 volúmenes de etanol (800 μl) e incubado durante la noche a -20 °C. A la mañana siguiente, el ARNt* fue granulado por centrifugación a 16.000 × g durante 20 min a 4 °C. El gránulo se lavó con 1 ml de etanol helado 70 %, sin alterar el gránulo. El gránulo de ARNt* se volvió a suspender en 20 μl de agua exenta de nucleasas y la concentración se midió espectrofotométricamente en A₂₆₀.

15 **Ensayos de desplazamiento**

Cada reacción se configuró por triplicado y se incubó durante 1 h a 37 °C. Cada uno de los componentes de la reacción se añadieron en el orden mostrado en la Tabla 2, con el ARNt* añadido en último lugar para iniciar la reacción. "Compuesto" se refiere a las moléculas que están bajo estudio.

Tabla 2. Componentes de los ensayos de desplazamiento de [8-¹⁴C]-guanina

Componente	Volumen (μl)	Concentración final
Tris-HCl 1 M pH 7,5	7,5	50 mM
NaCl 5 M	0,6	20 mM
MgCl ₂ 1 M	0,75	5 mM
Ditiotreitol 1 M	0,3	2 mM
Compuesto (patrón 2 mM)	15	200 μM
H ₂ O	hasta 140	
Enzima queuina-insertasa	10	2 μg
ARNt*	2 unidades de Abs.	1,8 μM

Preparación de las columnas DEAE: Aproximadamente 25 gramos de resina de la celulosa DEAE-52 de Whatmann se pesaron en un tubo exento de ARN estéril de 50 ml. Se añadió un volumen de 20 ml de Tris-HCl 200 mM de pH 7,5 y el tubo se invirtió 5 veces y se centrifugó a $750 \times g$ en una centrífuga de mesa para sedimentar la resina. El sobrenadante se retiró mediante vertido y se comprobó el pH. El lavado de la resina se repitió otras 4 veces hasta que el lavado alcanzó un pH de 7,5. La resina se suspendió en una suspensión 1:1 con Tris-HCl 200 mM de pH 7,5 y se cargó en una columna de centrifugación de 1,5 ml (que contiene un filtro de fibra de vidrio) hasta que se logró un volumen final de lecho de resina de 1 ml.

Después de la incubación, la reacción se cargó en la columna y se centrifugó a $0,1 \times g$ durante 10 segundos. La circulación se recogió y se volvió a cargar en la columna. Este paso se repitió 5 veces para permitir la máxima unión de ARNt. La columna se lavó después con $8 \times 250 \mu\text{l}$ de tampón de lavado (Tris-HCl 20 mM, pH 7,5, MgCl_2 10 mM, NaCl 200 mM) con 10 segundos de centrifugación a $0,1 \times g$ entre cada lavado. Estos pasos de carga y lavado se recogieron en viales de centelleo. El ARNt ligado se eluyó después en alícuotas de $4 \times 250 \mu\text{l}$ en Tampón de Elución (Tris-HCl 20 mM, pH 7,5, MgCl_2 10 mM, NaCl 1 M) y se recogió en viales de centelleo. A todos los viales se añadieron 10 ml de Ecoscint A (cóctel de centelleo). Los viales que contienen la circulación y los lavados se contabilizan para la guanina [^{14}C] desplazada.

En este ensayo (véase la figura 1), el desplazamiento máximo mediante base de queuina 200 μM , el sustrato natural del complejo enzimático queuina-insertasa, es de 240 pmol de [^{14}C] guanina. Los valores de referencia son ≤ 10 pmol. Por lo tanto, un desplazamiento ≥ 50 pmol se considera un sustrato positivo para TGT.

Ensayo para la capacidad de los compuestos que se utilizarán como sustratos para el complejo enzimático queuina-insertasa – por desplazamiento de [^{14}C] guanina del ARNt de levadura (Figura 1).

Guanina, queuina, cloruro de *N*-((2-amino-4-oxo-4,7-dihidro-3*H*-pirrolo[2,3-*d*]pirimidin-5-il)metil)-3-fenilpropan-1-aminio (mostrado como compuesto I) y 7-metilguanina fueron evaluados por su capacidad para reemplazar la guanina en el ARNt de levadura. En primer lugar, el ARNt de levadura se cargó con [8- ^{14}C]-guanina (ARNt*) por la enzima TGT de *E. coli*. En cada reacción, se utilizaron 2 unidades de absorbancia A_{260} de ARNt* junto con 200 μM de molécula especificada. Las reacciones se procesaron en columnas de celulosa DEAE de 1 ml. La circulación y lavados de reacción se recogieron y analizaron por recuento de centelleo líquido para la presencia de [^{14}C]-guanina desplazada.

Del mismo modo, el lector experto será consciente de los procedimientos adecuados para determinar si un compuesto es un sustrato o inhibidor de HPRT. Por ejemplo, las moléculas que no son un sustrato ni un inhibidor de HPRT pueden ser identificadas mediante el uso del siguiente ensayo:

Ensayo para evaluar compuestos como sustratos o inhibidores de la enzima hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasa o “Ensayo HPRT” (Figura 2).

Preparación y equilibrio de la columna: Dowex-1x8, tamaño de malla 200-400, se pesó en un tubo estéril de 50 ml y se lavó 3 veces con HCl 1 M acuoso para cargar la resina. La resina se lavó 5-6 veces (20 ml cada una) con H_2O Milli-Q hasta que se alcanzó un pH neutro. Las columnas (columnas de plástico Bio-rad de 10 ml) se instalaron con 1 ml de Dowex húmedo (se aplicó mezcla húmeda, se dejó asentar y se volvió a aplicar hasta que se alcanzó un volumen empaquetado de 1 ml). La resina empaquetada se enjuagó con 10 volúmenes (v/v) de H_2O mili-Q para garantizar que se lograra un pH neutro y un empaquetado consistente.

Las reacciones HPRT se configuran en volumen de 100 μl por triplicado con los siguientes componentes:

HEPES 20 mM (pH 8)
 MgCl_2 10 mM
 Fosforribosil Pirofosfato 0,1 mM (PRPP—recién preparado el día de los ensayos)
 [8- ^{14}C]-guanina 20 μM
 Compuesto 400 μM que se ensayará

La mezcla de reacción se precalentó a 37 $^\circ\text{C}$ antes de añadir 10 ng de la enzima HPRT humana recombinante. Se dejó que las reacciones continuaran durante 1 h antes de ser detenidas por calentamiento durante 8 min a 100 $^\circ\text{C}$. También se incluyó siempre una reacción de control que comprendía enzima inactivada por calor (tratada a 100 $^\circ\text{C}$ durante 8 minutos antes de añadir a la reacción).

Después de la inactivación, las reacciones se enfriaron a temperatura ambiente (usando hielo), antes de ser aplicadas a una columna de resina empaquetada de 1 ml de Dowex-1x8, tamaño de malla 200-400. La columna se lavó con 5 ml de H_2O milli-Q y 10 ml de HCl 10 mM, eliminando la guanina no ligada y sin reaccionar. La GMP se eluyó de la columna con 5 ml de HCl 50 mM en viales de centelleo. Se añadieron 15 ml de cóctel de centelleo (Ecoscint A) y se contaron viales para evaluar el nivel de conversión de [8- ^{14}C]-guanina a GMP.

Para moléculas que no son un sustrato de HPRT ni un inhibidor, la reacción producirá el producto GMP en cantidades ≥ 60 % de la reacción de control que contiene sólo [8- ^{14}C]-guanina.

En la Figura 2, se muestran los resultados para guanina, queuína-HCl (monohidrocloreto de 2-amino-5-[[[(1S,4S,5R)-4,5-dihidroxi-2-ciclopenten-1-il]amino]metil]-1,7-dihidro-4H-pirrol[2,3-d]pirimidin-4-ona) y cloruro de *N*-((2-amino-4-oxo-4,7-dihidro-3H-pirrol[2,3-d]pirimidin-5-il)metil)-3-fenilpropan-1-aminio (mostrado como Compuesto I en el gráfico).

5 La capacidad de las moléculas para disminuir el interferón gamma puede medirse con el siguiente ensayo *ex vivo* (Figura 3):

La EAE crónica y monofásica fue inducida en ratones C57BL/6 hembra de 8-10 semanas de edad, según lo descrito por Stromnes y Gorman, (2006). Los animales fueron sometidos a perfusión transcardialmente con solución salina tamponada de fosfato helado (PBS) y se les extirpó el bazo.

- 10 Las suspensiones de una sola célula del bazo se prepararon por extrusión a través de una malla de nilón de 70 micrometros y la célula se lavó en medio cRPMI (medios del Roswell Park Memorial Institute que contenían 10 % de suero fetal bovino, L-glutamina 2 mM, 100 unidades de penicilina, 1 mg/ml de estreptomicina) por centrifugación a 240 × *g* durante 5 minutos, se contaron y se sembraron a una densidad final de 1 × 10⁶/ml en placas de 96 pocillos con fondo en U que contenían solo el medio (control negativo) o 100 µl de péptido de mielina glicoproteína de oligodendrocitos de 50 µg/ml (MOG₃₃₋₅₅). Todas las concentraciones patrón de moléculas se reconstituyeron en DMSO estéril y se ensayaron en células a concentraciones de 10 µM y 100 µM. Las administraciones de moléculas no superaron la concentración final de DMSO del 0,5 % en las células. Después de 72 h, las placas se centrifugaron a 240 × *g* durante 3 minutos para permitir que las células decantaran. Los sobrenadantes fueron cuidadosamente retirados y se analizaron para IFN gamma según el protocolo de los fabricantes suministrado en el kit ELISA de eBioscience.

Esta prueba se puede utilizar con células salvajes o con células TGT-KO como se describe en este documento.

Las moléculas adecuadas para su uso en la invención incluyen:

2-amino-5-(((3-fenilpropil)amino)metil)-3,7-dihidro-4H-pirrol[2,3-d]pirimidin-4-ona;

Cloruro de *N*-((2-amino-4-oxo-4,7-dihidro-3H-pirrol[2,3-d]pirimidin-5-il)metil)-3-fenilpropan-1-aminio;

- 25 2-amino-5-((butilamino)metil)-3,7-dihidro-4H-pirrol[2,3-d]pirimidin-4-ona;

Cloruro de *N*-((2-amino-4-oxo-4,7-dihidro-3H-pirrol[2,3-d]pirimidin-5-il)metil)butan-1-aminio

2-amino-5-(((hexilamino)metil)-3,7-dihidro-4H-pirrol[2,3-d]pirimidin-4-ona

Cloruro de *N*-((2-amino-4-oxo-4,7-dihidro-3H-pirrol[2,3-d]pirimidin-5-il)metil)hexan-1-aminio

- 30 Queuína; 2-amino-5-(((1S,4S,5R)-4,5-dihidroxiciclopent-2-en-1-il)amino)metil)-3,7-dihidro-4H-pirrol[2,3-d]pirimidin-4-ona

Queuína-HCl, monohidrocloreto de 2-amino-5-[[[(1S,4S,5R)-4,5-dihidroxi-2-ciclopenten-1-il]amino]metil]-1,7-dihidro-4H-pirrol[2,3-d]pirimidin-4-ona

- 35 Sin estar vinculado por la teoría, parece que los compuestos de la presente invención operan a través de una nueva vía de fármacos. Sacan provecho de un complejo enzimático compuesto de dos proteínas: TGT (ARNt guanina transglucosilasa) y QTRTD1 (dominio de queuína ARNt transglucosilasa que contiene 1) conocido en este documento como el complejo enzimático queuína-insertasa. El resultado es disminuir las poblaciones de células T efectoras (T_{ef}) y/o aumentar las poblaciones relativas de células T reguladoras (T_{reg}). Las células T_{reg} son una parte del sistema inmunitario que están estrechamente involucradas en la determinación de proteínas propias y no propias, es decir, protegiendo proteínas de sí mismas de ser atacadas por el sistema inmunitario.

- 40 El sustrato natural del complejo enzimático queuína-insertasa es la queuína, una molécula que no puede ser sintetizada por células eucariotas. Sin embargo, es fácilmente producida por la mayoría de las bacterias, y en los seres humanos queuína debe ser cosechada ya sea de los alimentos ingeridos o de la microflora intestinal. El complejo enzimático queuína-inserta inserta queuína en el bucle anticodón de ARN de transferencia de t-tirosilo, de histidilo, de asparaginilo y de aspartilo (ARNt de la familia GUN; ARNt_{GUN}) en la posición de cabeceo. La mayoría de ARNt_{GUN} en el cuerpo se modifica en la posición de cabeceo con queuína. Es importante que la queuína esté ausente o agotada (hipomodificada) en la posición de cabeceo de los isotipos ARNt_{GUN} en células que proliferan rápidamente. Trabajos anteriores que emplean 6-tioguanina (6TG) han demostrado que el uso de este sustrato alternativo para el complejo enzimático queuína-insertasa puede tener un efecto drástico sobre el modelo murino de la EM crónica (es decir, encefalomiелitis autoinmune experimental; EAE). Desafortunadamente, desde una perspectiva terapéutica, 6TG tiene el problema de que es un sustrato más potente para HPRT (aprox. 10 veces mayor que para el complejo enzimático queuína-insertasa). Posteriormente se incorpora al ADN, haciéndolo genotóxico e inadecuado como tratamiento para la EM.

La presente invención gira en torno a moléculas capaces de sacar provecho los aspectos beneficiosos de la 6TG (intercambio dependiente de queuina-insertasa en la posición de cabeceo de ARNt_{GUN}), pero que eluden el problema asociado con la actividad biológica principal de la 6TG (es decir, actividad de HPRT y posterior inserción en el ADN).

Las figuras 4a-4d muestran que la proliferación se redujo a menos del 50 % en células T de tipo salvaje tras el tratamiento con cloruro de *N*-((2-amino-4-oxo-4,7-dihidro-3H-pirrol[2,3-d]pirimidina-5-il)metil)-3-fenilpropan-1-aminio a una concentración de 100 µM (mostrado como Compuesto I en la Figura 4a-d). La falta de participación de HPRT en el efecto observado quedó demostrada por una reducción similar de la proliferación de células en las que el gen HPRT había sido desactivado (HPRT KO, Figura 4b). La falta de actividad de HPRT también ha sido confirmada por un ensayo *in vitro* que emplea la enzima HPRT recombinante en donde se ha demostrado que la molécula no es ni un sustrato ni un inhibidor (Figura 2). El requisito para el complejo enzimático queuina-insertasa se confirma por la falta de efecto de cloruro de *N*-((2-amino-4-oxo-4,7-dihidro-3H-pirrol[2,3-d]pirimidin-5-il)metil)-3-fenilpropan-1-aminio (mostrado como Compuesto I) a una concentración de 100 µM en proliferación en células en las que el gen TGT ha sido desactivado (TGT KO, Figura 4d). Estos datos indican que el mecanismo de acción está efectivamente mediado por el complejo enzimático queuina-insertasa, que se confirma aún más (Figura 4c) por el hecho de que la doble desactivación TGT:HPRT no se ve esencialmente afectada cuando se trata con cloruro de *N*-((2-amino-4-oxo-4,7-dihidro-3H-pirrol[2,3-d]pirimidin-5-il)metil)-3-fenilpropan-1-aminio (Fórmula I) a una concentración de 100 µM. El análisis *in vitro* de cloruro de *N*-((2-amino-4-oxo-4,7-dihidro-3H-pirrol[2,3-d]pirimidin-5-il)metil)-3-fenilpropan-1-aminio (Compuesto I) utilizando la enzima TGT recombinante también ha demostrado que el compuesto es un sustrato para TGT (Figura 1). Los datos demuestran que dicho compuesto opera como un sustrato para el complejo enzimático queuina-insertasa, pero no es un sustrato para HPRT.

El sustrato del complejo enzimático queuina-insertasa funciona suprimiendo las poblaciones de células T efectoras y de memoria encefalitogénicas sin afectar a la población sin tratamiento previo. Estas mismas poblaciones de células inmunitarias contribuyen ampliamente a la patogénesis de todas las enfermedades autoinmunes.

El ARN de transferencia (ARNt) de células que proliferan rápidamente es deficiente (hipomodificado) en la modificación de la queuina; ejemplos incluyen hígado fetal, múltiples tipos de tumores y regenerando hígado adulto. Por el contrario, el ARNt de células adultas totalmente diferenciadas contiene altos niveles de queuina, que no se pueden desplazar una vez incorporados.

Se podría esperar que el ARNt de las células inmunitarias en rápida expansión (como ocurre en una respuesta autoinmune) también sea deficiente en la modificación de la queuina. La incorporación de novedosos sustratos de Queuina Insertasa selectivamente en el ARNt deficiente en queuina de las células inmunitarias podría interrumpir la proliferación y la producción de citocinas modulando así la respuesta inmunitaria.

Compuestos de la presente invención encuentran utilidad en el tratamiento de afecciones autoinmunes incluidas, entre otras, la esclerosis múltiple, artritis reumatoide, colitis ulcerosa, psoriasis, diabetes y enfermedad inflamatoria intestinal, incluida la enfermedad de Crohn; y como agentes para suprimir el rechazo al trasplante.

Se puede proporcionar un procedimiento de tratamiento de la esclerosis múltiple en un mamífero, en particular un ser humano, que comprende la administración a dicho mamífero de una cantidad de una molécula tal como se define en el presente documento, o una sal o solvato de la misma farmacéuticamente aceptable.

El término "tratamiento" pretende incluir el curado, reversión, alivio, tratamiento paliativo y profiláctico de la afección.

La invención se refiere además a moléculas de la invención en combinación con otros agentes adecuados, para su uso en el tratamiento de la esclerosis múltiple.

Los pacientes que padecen esclerosis múltiple son comúnmente co-administrados con agentes terapéuticos adicionales. En el caso de los pacientes que experimentan un ataque grave, los corticoesteroides intravenosos, como la metilprednisolona o técnicas como la plasmaféresis, pueden administrarse conjuntamente con cualquier tratamiento.

Los efectos del daño en las células nerviosas causados por la esclerosis múltiple dan como resultado diversas formas de daño al paciente. El daño a los nervios puede provocar dolor, dificultad para controlar la vejiga y muchos otros problemas. Por esta razón, a los pacientes con esclerosis múltiple se le prescriben a menudo medicamentos adicionales para ayudarles a tratar los efectos del daño por EM. Los co-administrantes adecuados incluirían:

Para problemas de vejiga

- toxina botulínica (Botox)
- desmopresina (Desmospray, Desmotabs)
- oxibutinina (Ditropan, Lyrinel)
- tolterodina (Detrusitol)

Para la depresión

- amitriptilina (Triptafen)
- fluoxetina (Prozac)
- imipramina (Tofranil)
- paroxetina (Seroxat)

5 Para la disfunción eréctil

- alprostadil (Caverject, MUSE, Viridal Duo)
- citrato de sildenafil (Viagra)
- tadalafilo (Cialis)
- vardenafilo (Levitra)

10 Para la fatiga

- amantadina (Lysovir, Symmetrel)
- modafinilo (Provigil)

Para la neuritis óptica

- esteroides

15 Para el dolor

- amitriptilina (Triptafen)
- carbamazepina (Tegretol)
- gabapentina (Neurontin)
- ibuprofeno
- imipramina (Tofranil)
- lamotrigina (Lamictal)
- fenitoína (Epanutin)
- pregabalina (Lyrica)

20

Para problemas al caminar

25 • fampridina (Fampyra)

Para afectación pseudobulbar

- Nuedexta

Para espasticidad y espasmos

30

- baclofeno (Lioresal)
- toxina botulínica (Botox)
- carbamazepina (Tegretol)
- clonazepam (Rivotril)
- dantroleno (Dantrium)
- diazepam (Valium)
- gabapentina (Neurontin)
- fenol
- tetrahidrocannabinol y cannabidiol (Sativex)
- tizanidina (Zanaflex)

35

Para los temblores

40 • clonazepam (Rivotril)
• talamotomía

Para la neuralgia del trigémino

45

- carbamazepina (Tegretol)
- gabapentina (Neurontin)
- oxcarbazepina (Trileptal)
- fenitoína (Epanutin)
- pregabalina (Lyrica)

Otros agentes terapéuticos se administran comúnmente a pacientes con EM. Otros medicamentos de este tipo son bien conocidos por los médicos y otros expertos en terapias.

50 Dichos agentes pueden administrarse secuencialmente, simultáneamente o de forma concomitante.

La invención también se refiere a una composición farmacéutica que comprende una molécula de la presente invención y un diluyente o portador farmacéuticamente aceptable.

Las composiciones farmacéuticas adecuadas para la administración de compuestos de la presente invención y los procedimientos para su preparación serán evidentes para los expertos en la técnica. Tales composiciones y procedimientos para su preparación pueden encontrarse, por ejemplo, en Remington's Pharmaceutical Sciences, 19^a Edición (Mack Publishing Company, 1995).

Los compuestos de la fórmula (I) se pueden administrar por vía oral. La administración oral puede suponer la deglución, de modo que el compuesto entre en el tubo digestivo, o puede emplearse la administración bucal o sublingual por la cual el compuesto entra en el torrente sanguíneo directamente desde la boca. Las formulaciones adecuadas para la administración oral incluyen formulaciones sólidas como comprimidos, cápsulas que contienen partículas, líquidos o polvos, pastillas (incluyendo las rellenas de líquido), gomas de mascar, multi- y nano-partículas, geles, solución sólida, liposoma, películas, óvulos, aerosoles y formulaciones líquidas.

Las formulaciones líquidas incluyen suspensiones, soluciones, jarabes y elixires. Dichas formulaciones pueden emplearse como rellenos en cápsulas blandas o duras y comprenden, normalmente, un portador, por ejemplo, agua, etanol, polietilenglicol, propilenglicol, metilcelulosa, o un aceite adecuado, y uno o más agentes emulsionantes y/o agentes de suspensión. Las formulaciones líquidas también podían prepararse mediante la reconstitución de un sólido, por ejemplo, a partir de un sobrecito.

Los compuestos de la fórmula (I) también pueden utilizarse en formas de dosificación de rápida disolución y de rápida disgregación, como las descritas en Expert Opinion in Therapeutics Patents, 11 (6), 981-986, por Liang y Chen (2001).

Para las formas de dosificación de comprimidos, dependiendo de la dosis, el medicamento puede constituir de 1 % a 80 % en peso de la forma de dosificación, más típicamente de 5 % a 60 % en peso de la forma de dosificación. Además del fármaco, los comprimidos contienen, generalmente, un disgregante. Ejemplos de disgregantes incluyen glicolato sódico de almidón, carboximetilcelulosa sódica, carboximetilcelulosa cálcica, croscarmelosa sódica, crospovidona, polivinilpirrolidona, metilcelulosa, celulosa microcristalina, hidroxipropilcelulosa sustituida con alquilo inferior, almidón, almidón pregelatinizado y alginato sódico. En general, el disgregante comprenderá de 1 % en peso a 25 % en peso. En una realización de la presente invención, el disgregante comprenderá del 5 % en peso al 20 % en peso de la forma de dosificación. Los aglutinantes se utilizan, generalmente, para impartir cualidades cohesivas a una formulación de comprimido. Los aglutinantes adecuados incluyen celulosa microcristalina, gelatina, azúcares, polietilenglicol, gomas naturales y sintéticas, polivinilpirrolidona, almidón pregelatinizado, hidroxipropilcelulosa e hidroxipropilmetilcelulosa. Los comprimidos también pueden contener diluyentes, como lactosa (monohidrato, monohidrato secado por pulverización, anhidro y similar), manitol, xilitol, dextrosa, sacarosa, sorbitol, celulosa microcristalina, almidón y fosfato cálcico dibásico dihidratado. Los comprimidos también pueden comprender, opcionalmente, agentes tensioactivos, como el laurilsulfato sódico y el polisorbato 80, y agentes de deslizamiento como dióxido de silicio y talco. Cuando están presentes, los agentes tensioactivos pueden comprender del 0,2 % en peso al 5 % en peso del comprimido, y los agentes de deslizamiento pueden comprender del 0,2 % en peso al 1 % en peso del comprimido. Los comprimidos también contienen, generalmente, lubricantes como estearato de magnesio, estearato de calcio, estearato de zinc, estearilfumarato sódico y mezclas de estearato de magnesio con laurilsulfato sódico. Los lubricantes comprenden, generalmente, del 0,25 % en peso al 10 % en peso. En una realización de la presente invención, los lubricantes comprenden entre el 0,5 % en peso y el 3 % en peso del comprimido. Otros posibles ingredientes incluyen antioxidantes, colorantes, agentes aromatizantes, conservantes y agentes de enmascaramiento del sabor.

Comprimidos de ejemplo contienen hasta un 80 % de fármaco, de aproximadamente 10 % en peso a aproximadamente 90 % en peso de aglutinante, de aproximadamente 0 % en peso a aproximadamente 85 % de diluyente, de aproximadamente 2 % en peso a aproximadamente 10 % de disgregante, y de aproximadamente 0,25 % en peso a aproximadamente 10 % en peso de lubricante.

Las mezclas de comprimidos pueden comprimirse directamente o por rodillo para formar comprimidos. Las mezclas o porciones de mezclas de comprimidos pueden ser, alternativamente, granuladas en húmedo, en seco o en fusión, coagularse en fusión, o extruirse antes de la formación del comprimido. La formulación final puede comprender una o más capas y puede estar recubierta o no; incluso pueden estar encapsuladas. Formulaciones de comprimidos se discuten en Pharmaceutical Dosage Forms: Tablets, Vol. 1, por H. Lieberman y L. Lachman (Marcel Dekker, Nueva York, 1980).

Las películas orales consumibles para uso humano o veterinario son típicamente formas flexibles de dosificación de película delgada solubles en agua o que pueden hincharse en agua que pueden disolverse rápidamente o mucoadhesivas y comprenden, por lo general, un compuesto de fórmula (I), un polímero formador de película, un aglutinante, un disolvente, un humectante, un plastificante, un estabilizador o emulsionante, un agente modificador de la viscosidad y un disolvente. Algunos componentes de la formulación pueden realizar más de una función. El polímero formador de película puede seleccionarse entre polisacáridos naturales, proteínas o hidrocoloides sintéticos y está presente, por lo general, en el intervalo de 0,01 a 99 % en peso, más típicamente en el intervalo de

30 a 80 % en peso. Otros ingredientes posibles incluyen antioxidantes, colorantes, aromatizantes y potenciadores del sabor, conservantes, agentes estimulantes de la saliva, agentes de enfriamiento, co-disolventes (incluidos los aceites), emolientes, agentes de aumentadores de volumen, agentes antiespumantes, tensioactivos y agentes de enmascaramiento del sabor. Las películas según la invención se preparan, por lo general, por secado evaporativo de películas acuosas delgadas recubiertas sobre un soporte o papel de refuerzo pelable. Esto se puede hacer en un horno o túnel de secado, por lo general, un secador lacador combinado, o por liofilización o aspiración.

Las formulaciones sólidas para la administración oral pueden formularse para ser de liberación inmediata y/o modificada. La liberación modificada incluye liberación retardada, sostenida, pulsada, controlada, dirigida y programada. Las formulaciones de liberación modificadas adecuadas a los efectos de la invención se describen en la patente de EE.UU. n.º 6.106.864. Los detalles de otras tecnologías de liberación adecuadas, como las dispersiones de alta energía y las partículas osmóticas y recubiertas, se encuentran en Pharmaceutical Technology On-line, 25(2), 1-14, de Verma et al (2001). El uso de goma de mascar para lograr la liberación controlada se describe en el documento WO-A-00/35298.

Los compuestos de la fórmula (I) también se pueden administrar directamente en el torrente sanguíneo, en el músculo o en un órgano interno. Dicha administración parenteral incluye administración intravenosa, intraarterial, intraperitoneal, intratecal, intraventricular, intrauretral, intrasternal, intracraneal, intramuscular y subcutánea. Los dispositivos adecuados para la administración parenteral incluyen inyectores de aguja (incluidas microagujas), inyectores sin agujas y técnicas de perfusión.

Los compuestos de la invención también se pueden administrar tópicamente a la piel o mucosa, es decir, dermalmente o transdermalmente.

Los compuestos de la fórmula (I) también se pueden administrar por vía intranasal o por inhalación, normalmente en forma de polvo seco (ya sea solo, como mezcla, por ejemplo, en una mezcla deshidratada con lactosa, o como una partícula de componente mezclada, por ejemplo, mezclada con fosfolípidos, como la fosfatidilcolina) a partir de un inhalador de polvo seco, como un pulverizador en aerosol desde un envase presurizado, bomba, pulverizador, atomizador (preferiblemente un atomizador que utiliza electrohidrodinámica para producir una niebla fina), o nebulizador, con o sin el uso de un propulsor adecuado, como 1,1,1,2-tetrafluoroetano o 1,1,1,2,3,3,3-heptafluoropropano, o como gotas nasales. Para uso intranasal, el polvo puede comprender un agente bioadhesivo, por ejemplo, quitosano o ciclodextrina.

El envase presurizado, la bomba, el pulverizador, el atomizador o el nebulizador contiene una solución o suspensión del compuesto de fórmula (I) que comprende, por ejemplo, etanol, etanol acuoso o un agente alternativo adecuado para dispersar, solubilizar o prolongar la liberación del compuesto, un propulsor como disolvente y un tensioactivo opcional, como el trioleato de sorbitano, ácido oleico o un ácido oligoláctico.

Antes de su uso en una formulación de polvo seco o suspensión, el producto fármaco se microniza a un tamaño adecuado para la administración por inhalación (normalmente menos de 5 micrometros). Esto puede lograrse mediante cualquier procedimiento de molienda apropiado, como molino de chorro en espiral, molino de chorro en lecho fluido, procesamiento de fluidos supercríticos para formar nanopartículas, homogeneización a alta presión o secado por pulverización.

Pueden formularse cápsulas (preparadas, por ejemplo, a partir de gelatina o hidroxipropilmetilcelulosa), blisters y cartuchos para su uso en un inhalador o insuflador para contener una mezcla en polvo del compuesto de la invención, una base de polvo adecuada como lactosa o almidón y un modificador de rendimiento como l-leucina, manitol o estearato de magnesio. La lactosa puede ser anhidra o en la forma del monohidrato, preferiblemente este último. Otros excipientes adecuados incluyen dextrano, glucosa, maltosa, sorbitol, xilitol, fructosa, sacarosa y trehalosa.

Una formulación de solución adecuada para su uso en un atomizador utilizando electrohidrodinámica para producir una niebla fina puede contener de 1 µg a 20 mg del compuesto de la invención por actuación y el volumen de actuación puede variar de 1 µl a 100 µl. Una formulación típica puede comprender un compuesto de fórmula (I), propilenglicol, agua estéril, etanol y cloruro de sodio. Los disolventes alternativos que se pueden utilizar en lugar de propilenglicol incluyen glicerol y polietilenglicol.

A las formulaciones de la invención destinadas a la administración intranasal pueden añadirse aromas adecuados, como mentol y levomentol, o edulcorantes, como la sacarina o la sacarina sódica. Las formulaciones para la administración intranasal pueden formularse para que sean de liberación inmediata y/o modificada utilizando, por ejemplo, PGLA. La liberación modificada incluye liberación retardada, sostenida, pulsada, controlada, dirigida y programada.

Los compuestos de la fórmula (I) se pueden administrar también directamente en el ojo o el oído, por lo general, en forma de gotas de una suspensión micronizada o solución en solución salina isotónica y estéril, ajustada en el pH.

Los compuestos de fórmula (I) se pueden combinar con entidades macromoleculares solubles, como la ciclodextrina y sus derivados adecuados o polímeros que contienen polietilenglicol, con el fin de mejorar su solubilidad, tasa de

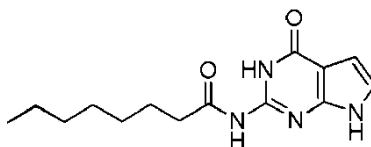
disolución, sabor, biodisponibilidad y/o estabilidad cuando se utiliza cualquiera de los modos de administración antes mencionados. Los complejos fármaco-ciclodextrina, por ejemplo, se encuentra que son generalmente útiles para la mayoría de las formas de dosificación y vías de administración. Se pueden utilizar complejos de inclusión y de no inclusión. Como alternativa a la complejación directa con el fármaco, la ciclodextrina se puede utilizar como un aditivo auxiliar, es decir, como portador, diluyente o solubilizante. Las más normalmente utilizadas para estos fines son alfa-, beta- y gamma-ciclodextrinas, ejemplos de las cuales se pueden encontrar en las publicaciones de patente internacional WO-A-91/11172, WO-A-94/02518 y WO-A-98/55148.

Parte experimental

A continuación, se describe la síntesis de varias moléculas adecuadas para su uso en la presente invención.

- 10 Todos los materiales de partida y reactivos están disponibles comercialmente y se obtuvieron de Aldrich con excepción de 2-amino-3*H*-pirrolo[2,3-*d*]pirimidin-4(7*H*)-ona que fue adquirido de Fluorochem.

Preparación 1: 2-octanoilamino-pirrolo[2,3-*d*]pirimidin-4-ona

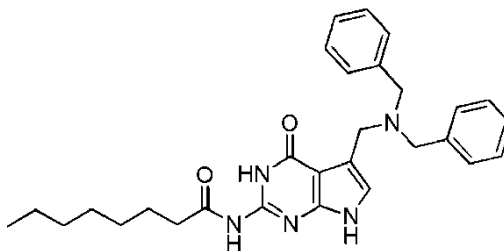


- 15 Un matraz de fondo redondo de 50 cm³ que contenía una barra de agitación se cargó con 2-amino-3*H*-pirrolo[2,3-*d*]pirimidin-4(7*H*)-ona (2,00 g, 13,33 mmol). El matraz estaba equipado con un septo y colocado bajo una atmósfera de Ar. Se añadió piridina recién destilada (20,00 cm³) mediante jeringa y la suspensión resultante se enfrió en hielo. Se dejó que la solución se equilibrara a esta temperatura (ca. 5 min) y después se añadió gota a gota cloruro de octanoílo (6,80 cm³, 39,99 mmol). La suspensión resultante se calentó a 85 °C durante 30 minutos. Después de enfriar a temperatura ambiente, se añadió una solución etanólica de amoníaco de 6,5 % (60 cm³) y la suspensión resultante se agitó a temperatura ambiente durante la noche. El precipitado del producto se retiró mediante filtración al vacío y se lavó con etanol seguido de éter dietílico para producir el producto deseado (2,56 g, 70 %) puro como un sólido de color amarillo, T_f (temp. de fusión) >300 °C (descomposición). Procedimiento basado en Akimoto et al. 1986 y Akimoto et al. 1988.

δ_H (400 MHz, DMSO-*d*₆): 0,86 (3H, t, J 5,1), 1,26 (8H, m), 1,58 (2H, app. quintete), 2,01 (1H, br s, NH), 2,43 (2H, t, J 5,1), 6,40 (1H, d, J 2,0), 7,01 (1H, d, J 2,0), 11,43 (1H, br s, NH), 11,67 (1H, br s, NH)

HRMS (*m/z* ESI⁺): Encontrado: 275,1517 ([M-H]⁺ C₁₄H₁₉N₄O₂; requerido: 275,1508)

Preparación 2: 2-octanoilamino-5-((dibenzil)amino)metil-pirrolo[2,3-*d*]pirimidin-4-ona

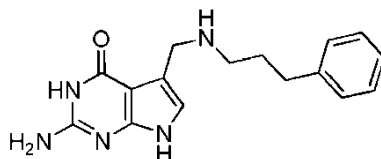


- 30 Un recipiente de reacción de 50 cm³ que contenía una barra de agitación se cargó con 2-octanoilamino-pirrolo[2,3-*d*]pirimidin-4-ona (1,00 g, 3,60 mmol), dibenzilamina (2,00 cm³, 10,80 mmol), formalina (349,00 µl, 12,60 mmol) y ácido acético acuoso al 80 % (36 cm³). La suspensión resultante se calentó a 60 °C durante 20 h, se enfrió a temperatura ambiente, se diluyó con HCl 0,5 M (36 cm³) y se agitó a temperatura ambiente durante 30 min. La mezcla fue neutralizada con amoníaco ac. conc. (36 cm³) y extraída con cloroformo (3 × 50 cm³). Los extractos orgánicos se combinaron, se secaron (MgSO₄) y se evaporaron hasta sequedad. El residuo crudo fue purificado por cromatografía de columna (diclorometano:MeOH, 9:1 – diclorometano:MeOH 7:3) para dar el compuesto deseado (1,45 g, 84 %) como polvo de color amarillo y T_f >300 °C (descomposición). Procedimiento basado en Akimoto et al. 1986 y Akimoto et al. 1988.

- 40 δ_H (400 MHz, DMSO-*d*₆): 0,86 (3H, t, J 7,1), 1,25 (8H, m), 1,57 (2H, m), 2,42 (2H, t, J 7,1), 3,57 (4H, s), 3,76 (2H, s), 6,88 (1H, s), 7,23 (2H, t, J 7,3), 7,31 (4H, app. t), 7,41 (4H, d, J 7,3), 11,34 (1H, s, NH), 11,57 (1H, s, NH), 11,68 (1H, s, NH)

HRMS (m/z ESI⁺): Encontrado: 486,2863 ($[M+H]^+$ C₂₉H₃₆N₅O₂; requerido: 486,2869)

Ejemplo 1: 2-amino-5-(((3-fenilpropil)amino)metil)pirrolo[2,3-*d*]pirimidin-4-ona



Un tubo grande de carrusel que contiene una barra de agitación se cargó con 2-octanoilamino-5-((dibencil)amino)metil-pirrolo[2,3-*d*]pirimidin-4-ona (100,0 mg, 0,21 mmol), 3-fenilpropilamina (146,00 μ l, 1,03 mmol) y 1:1 THF-metanol (2,00 cm³). La suspensión fue desgasificada y el recipiente de reacción fue sellado. La suspensión se calentó a 75 °C durante 24 h, se enfrió a temperatura ambiente y se trató con KOH 5 M (146,00 μ l) y se agitó a temperatura ambiente durante 65 h. La solución se concentró *in vacuo* y el residuo en crudo se purificó por cromatografía de columna (9:0,9:0,1 diclorometano-MeOH-NH₄OH). El sólido resultante se lavó con hexano de grado HPLC y después con éter dietílico con el fin de eliminar las impurezas de trazas. Esto dio el compuesto deseado (28 mg, 46 %) como un polvo anaranjado, T_f >300 °C (descomposición). Procedimiento basado en Akimoto et al. 1986 y Akimoto et al. 1988.

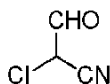
δ_H (600 MHz, DMSO-*d*₆): 1,24 (1H, br s, NH), 1,66 (2H, app. quintete), 1,91 (1H, s, NH), 2,44 (2H, t, J 6,9), 2,57 (2H, t, J 6,9), 3,59 (2H, s), 6,15 (2H, br s), 6,45 (1H, s), 7,15 (1H, t, J 7,4), 7,16 (3H, m), 7,25 (2H, app. t), 10,70 (1H, br s)

δ_C (600 MHz, DMSO-*d*₆): 30,6, 32,9, 45,2, 47,5, 48,6, 79,2, 98,7 (q), 113,6 (q), 125,5, 128,2, 128,3, 142,3 (q), 152,2 (q), 160,5 (C=O)

$\nu_{\text{máx}}$ (película)/cm⁻¹: 697, 748, 749, 1.080, 1.420, 1.596, 2.927

HRMS (m/z ESI⁺): Encontrado: 298,1662 ($[M+H]^+$ C₁₆H₂₀N₅O; requerido: 298,1668)

Preparación 3: 2-cloro-3-oxopropanonitrilo

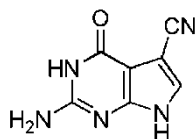


En un matraz de fondo redondo seco bajo una presión positiva de argón, una suspensión de NaOMe (7,14 g, 0,13 mol) en THF seco (90 ml) se enfrió a -5 °C. El formato de metilo (9 ml, 0,15 mol) se añadió gota a gota durante 1 minuto con jeringa y la agitación continuó a -5 °C durante 20 min. A continuación, se añadió cloroacetoneitrilo (8,33 ml, 0,13 mol) gota a gota a través de un embudo de goteo durante 45 minutos. La mezcla se volvió de blanco a amarillo y se agitó durante 2 h más a -5 °C, momento en el que la mezcla de reacción fue naranja. El baño se retiró y se dejó que la reacción se calentara a temperatura ambiente. Una alícuota de la mezcla de reacción se trató con una gota de HCl concentrado y se analizó por TLC que indicaba la presencia del producto deseado con R_f = 0,45, eluyendo con 100 % de EtOAc. La mezcla se enfrió a 0 °C y se añadió HCl concentrado (12 ml) gota a gota en cuyo tiempo la reacción de la mezcla se volvió rojo cereza. La suspensión resultante se filtró a través de una almohadilla de celite, y la celite se lavó con EtOAc hasta que el filtrado se volvió incoloro. Los filtrados recogidos se concentraron a presión reducida con el baño de agua a una temperatura no superior a 40 °C para dar cloro(formil)acetoneitrilo¹ como aceite negro, de rendimiento cuantitativo, que se utilizó sin purificación adicional. Procedimiento basado en Brooks 2012.

δ_H (400 MHz, CDCl₃) 9,38 (s, 1H).

δ_C RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 168,2, 126,6, 67,8.

Preparación 4: 2-amino-4,7-dihidro-4-oxo-3H-pirrolo[2,3-*d*]pirimidina-5-carbonitrilo



Se añadió 2,4-diamino-6-hidroxipirimidina (3,00 g, 24 mmol) a una solución de acetato de sodio (6,4 g, 76 mmol) en agua de Millipore (90 ml) y se agitó a 50 °C durante 1 hora. Mientras aún está a 50 °C, se añadió una solución de cloro(formil)acetoneitrilo crudo (3,00 g, 32 mmol) en agua mQ (44 ml) gota a gota con un embudo de goteo, durante cuyo tiempo la reacción se volvió beige y el calentamiento continuó durante 18 h a 50 °C, después de cuyo tiempo la reacción se calentó a 100 °C durante 3 h. La mezcla de reacción se dejó enfriar a temperatura ambiente y el sólido

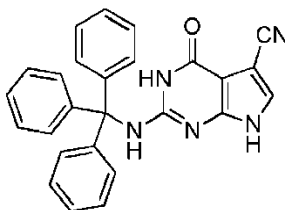
se retiró por filtración. El sólido se suspendió en EtOH y se añadió una solución de KOH acuosa 5M hasta que el sólido se disolvió. Se añadió carbón vegetal a la solución y la mezcla se agitó durante 30 minutos antes de retirar el sólido por filtración. El pH del filtrado se ajustó a pH=6 con solución acuosa concentrada de HCl durante cuyo tiempo se formó un precipitado y se recogió por filtración. Con el fin de eliminar las trazas finales de agua del sólido se disolvió en una mezcla de tolueno/metanol 1/1 y después se concentró a presión reducida. El sólido resultante se secó sobre P₂O₅ para dar el compuesto deseado (1,68 g, 9,6 mmol, 40 % de rendimiento) como sólido de color beige. Procedimiento basado en Brooks 2012.

δ_H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 11,98 (br s, 1H) 10,74 (br s, 1H), 7,59 (s, 1H), 6,43 (s, 2H).

δ_C (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ 158,0, 154,3, 152,1, 128,2, 116,4, 99,2, 86,0.

10 HRMS (*m/z* ESI⁺): C₇H₅N₅O [M-H]⁺ Encontrado 174,0415; requerido: 174,0416.

Preparación 5: 4,7-dihidro-4-oxo-2-[(trifenilmetil)amino]-3H-pirrolo[2,3-*d*]pirimidin-5-carbonitrilo



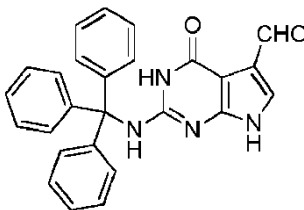
15 En un matraz de fondo redondo seco bajo una atmósfera de argón, se añadió cloruro de tritilo (1,20 g, 4,28 mmol) a una solución de 2-amino-4,7-dihidro-4-oxo-3H-pirrolo[2,3-*d*]pirimidin-5-carbonitrilo (0,50 g, 2,85 mmol) en piridina seca (29 ml). La reacción de la mezcla se calentó a 90 °C durante 48 h. La mezcla de reacción se concentró bajo presión reducida y luego se absorbió en gel de sílice y se purificó mediante cromatografía instantánea en gel de sílice eluyendo con diclorometano/MeOH con un gradiente que comenzaba en el 2 % de MeOH y subiendo al 10 %. El compuesto deseado se obtuvo como un sólido de color marrón (0,63 g, 1,5 mmol, 53 % de rendimiento).

Procedimiento basado en Ölgén 2008.

20 δ_H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 11,80 (br s, 1H); 10,64 (br s, 1H), 7,56 (s, 1H), 7,41(s, 1H), 7,29-7,28 (m, 12H), 7,23-7,17 (m, 3H), 5,73 (s, 1H).

HRMS (*m/z* ESI⁺): C₂₆H₁₈N₅O [M-H]⁺ Encontrado 416,1514; Requerido: 416,1511.

Preparación 6: 4,7-dihidro-4-oxo-2-[(trifenilmetil)amino]-3H-pirrolo[2,3-*d*]pirimidin-5-carboxaldehído

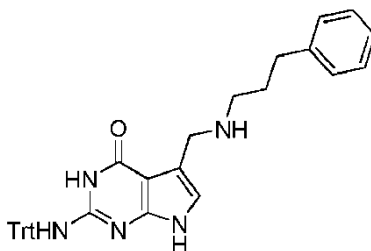


25 A una mezcla de 4,7-dihidro-4-oxo-2-[(trifenilmetil)amino]-3H-pirrolo[2,3-*d*]pirimidin-5-carbonitrilo (1,30 g, 3 mmol) se añadió HMDS (6 mmol, 1,3 ml) con sulfato de amonio (397 mg, 0,3 mmol) en tolueno seco (8 ml) en un matraz de fondo redondo. Se equipó un condensador de reflujo y el matraz se calentó a temperatura de reflujo durante la noche. La mezcla se enfrió a temperatura ambiente y se concentró a presión reducida. Bajo una presión positiva de argón, la mezcla de reacción en crudo se solubilizó en diclorometano seco (8 ml) y se enfrió a -78 °C. A esta temperatura, se añadió gota a gota DiBAL-H (4,5 ml, 1 M en diclorometano, 4,5 mmol). Después de 2 horas, el análisis por TLC (EtOAc 100 %) indicó que quedaba algún material de partida. Por ello, se añadió gota a gota una solución adicional de diBAL-H de 2 ml. Después de 1 hora, la reacción había terminado y se añadió una mezcla de H₂O/AcOH (9/1, 3,5 ml) a -78 °C. La mezcla de reacción se dejó calentar a temperatura ambiente lentamente. Se añadió una mezcla de EtOAc/H₂O (1/1, 300 ml) a la mezcla de reacción y la agitación continuó a temperatura ambiente durante 2 horas. Las capas fueron separadas y la capa orgánica se lavó con salmuera y las capas acuosas se extrajeron con EtOAc. Las fracciones orgánicas combinadas se secaron sobre MgSO₄, se filtraron y concentraron a presión reducida. El producto de reacción en crudo se filtró a través de una almohadilla de gel de sílice eluyendo con EtOAc para dar un sólido de color amarillo (1,01 g, 2,38 mmol, 76 %). Procedimiento basado en Brooks 2010 y Brooks 2012.

40 δ_H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 11,82 (s, 1H), 10,63 (s, 1H), 9,99 (s, 1H), 7,54 (s, 1H), 7,31-7,27 (m, 13H), 7,23-7,19 (m, 3H).

HRMS (m/z ESI⁻): C₂₆H₁₈N₄O₂ [M-H]⁻. Encontrado: 419,1508; requerido: 419,1508.

Preparación 7: 5-((3-fenilpropilamino)metil)-2-(tritolamino)-3H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4(7H)-ona



Procedimiento general A: A una suspensión de *N*-((4-oxo-2-(tritolamino)-4,7-dihidro-3H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-5-il)metil)formamida (200,0 mg, 0,48 mmol) y sulfato sódico (5,0 mg) en metanol (5 cm³) bajo atmósfera de argón se añadió 3-fenilpropilamina (74,00 µl, 0,52 mmol) y la suspensión resultante se agitó a temperatura ambiente durante 2 h. A continuación, se añadió borohidruro de sodio (55,00 mg, 1,43 mmol) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1 h más. Se añadió agua (5 cm³) y la suspensión resultante se agitó durante 10 minutos antes de ser extraída con diclorometano (3 × 5 cm³). Las capas orgánicas combinadas se secaron (MgSO₄) y se concentraron *in vacuo* para producir el producto en crudo que fue purificado por cromatografía instantánea (9:1 diclorometano-MeOH) para producir el compuesto deseado como un sólido de color blanco (210 mg, 41,8 %), T_f >300 °C (descomposición). Procedimiento basado en Brooks 2010 y Brooks 2012.

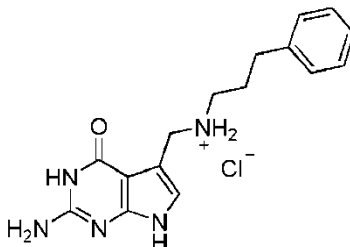
¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆): 1,73 (2H, quintete, *J* 7,8), 2,56 (4H, m), 3,74 (1H, s), 6,42 (1H, s, H-6), 7,19 (20H, m), 7,45 (1H, bs, NH), 10,78 (1H, bs, NH)

¹³C (400 MHz, DMSO-*d*₆): 31,7, 32,8, 45,4, 47,8, 70,4 (q), 99,7 (q), 114,9, 117,6 (q), 125,9, 126,0, 126,9, 128,0, 128,6, 129,0, 142,6 (q), 145,4 (q), 150,0 (q), 150,4 (q), 159,7 (C=O)

HRMS (m/z - ESI⁺): Encontrado: 540,2757 [M+H]⁺ C₃₅H₃₄N₅O. Requerido: 540,2765)

$\nu_{\text{máx.}}/\text{cm}^{-1}$: 1.542, 1.611, 1.670, 2.868, 2.951

Ejemplo 2: Cloruro de N-((2-amino-4-oxo-4,7-dihidro-3H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-5-il)metil)-3-fenilpropan-1-aminio



Procedimiento general B: Un recipiente de reacción de 5 cm³ conteniendo una barra de agitación se cargó con 5-((3-fenilpropilamino)metil)-2-(tritolamino)-3H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4(7H)-ona (210,0 mg, 0,39 mmol) y HCl metanólico 1,25 M (3 cm³). La solución resultante se agitó a temperatura ambiente durante 16 h. El producto precipitado se retiró mediante filtración en vacío y se lavó con diclorometano para producir el compuesto deseado como un polvo de color blanco (84 mg, 68 %), T_f >300 °C (descomposición). Procedimiento basado en Brooks 2010 y Brooks 2012.

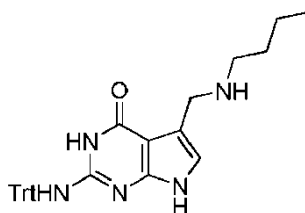
δ_{H} (600 MHz, DMSO-*d*₆): 1,90 (2H, app. quintete), 2,63 (2H, t, *J* 7,8), 2,90 (2H, m), 4,13 (2H, t, *J* 5,2), 6,57 (2H, bs), 6,80 (1H, d, *J* 2,3), 7,16 (3H, m), 7,26 (2H, t, *J* 7,0), 9,11 (2H, bs), 11,05 (1H, m, NH), 11,31 (1H, doblete amplio, NH)

δ_{C} (125 MHz, DMSO-*d*₆): 27,6, 32,1, 42,9, 45,6, 48,9, 98,6, 108,7 (q), 117,9 (q), 126,4, 128,6, 128,7, 140,9 (q), 152,9 (q), 160,5 (C=O)

HRMS (m/z ESI⁺): Encontrado: 298,1662 (M⁺C₁₆H₂₀N₅O; requerido: 298,1664)

$\nu_{\text{máx.}}$ (película)/cm⁻¹: 1.456, 1.625, 2.443, 2.713, 2.756, 2.873, 2.933, 3.184

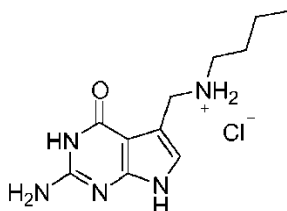
Preparación 8: 5-((3-butilamino)metil)-2-(tritolamino)-3H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4(7H)-ona



Preparado según el procedimiento general A utilizando *N*-((4-oxo-2-(tritylamino)-4,7-dihidro-3*H*-pirrolo[2,3-*d*]pirimidin-5-il)metil)formamida (200,00 mg, 0,48 mmol), *n*-butilamina (95,00 μ l, 0,95 mmol) y NaBH₄ (55 mg, 1,43 mmol) para producir el producto deseado como un polvo de color blanco (200 mg, 88 %), *T_f* >300 °C (descomposición).

- 5 δ_H (400 MHz, DMSO-*d*₆): 0,84 (3H, t, J 7,3), 1,30 (2H, app. sextete), 1,51 (2H, app. quintete), 2,82 (2H, t, J 7,3), 4,01 (2H, s), 6,62 (1H, s), 7,24 (15H, m), 7,57 (1H, bs), 11,07 (1H, bs)
- δ_C (400 MHz, DMSO-*d*₆): 13,9, 19,6, 28,0, 42,9, 46,0, 70,6 (q), 99,4 (q), 108,9, 118,0 (q), 127,0, 128,1, 129,0, 145,2 (q), 150,5 (q), 150,6 (q), 160,3 (C=O)
- $\nu_{\max}$ (película)/cm⁻¹: 1.545, 1.613, 1.672, 2.870, 2.956
- 10 HRMS (*m/z* ESI⁺): Encontrado: 478,2600 ([M+H]⁺ C₃₀H₃₂N₅O; requerido: 478,2607)

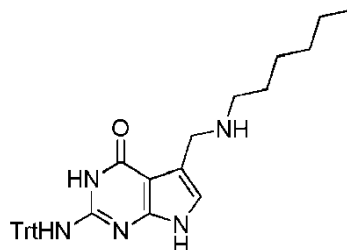
Ejemplo 3: Cloruro de *N*-((2-amino-4-oxo-4,7-dihidro-3*H*-pirrolo[2,3-*d*]pirimidin-5-il)metil)butan-1-aminio



Preparado según el procedimiento general B utilizando 5-((butilamino)metil)-2-(tritylamino)-3*H*-pirrolo[2,3-*d*]pirimidin-4(7*H*)-ona (108 mg, 0,39 mmol) y HCl metanólico 1,25 M (3 cm³) para producir el producto deseado como un polvo de color blanco (72 mg, 67 %), *T_f* >300 °C (descomposición).

- 15 δ_H (400 MHz, DMSO-*d*₆): 0,86 (3H, t, J 7,4), 1,31 (2H, app. sextete), 1,57 (2H, app. quintete), 2,90 (2H, m), 4,12 (2H, t, J 5,3), 6,49 (2H, bs), 6,81 (1H, s), 9,01 (2H, bs), 10,98 (2H, bs), 11,29 (1H, bs)
- δ_C (400 MHz, DMSO-*d*₆): 18,7, 24,7, 32,7, 47,4, 50,6, 103,6 (q), 114,0, 123,2 (q), 153,3 (q), 157,6 (q), 164,7 (C=O)
- HRMS (*m/z* ESI⁺): Encontrado: 236,1518 (M⁺ C₁₁H₁₈N₅O); requerido: 236,1511)
- 20 $\nu_{\max}$ (película)/cm⁻¹: 1.456, 1.625, 1.668, 2.443, 2.713, 2.756, 2.873, 2.933, 3.184

Preparación 9: 5-((3-hexilamino)metil)-2-(tritylamino)-3*H*-pirrolo[2,3-*d*]pirimidin-4(7*H*)-ona



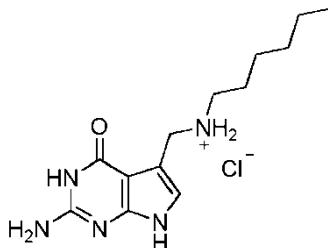
Preparado según el procedimiento general A utilizando *N*-(4-oxo-2-(tritylamino)-4,7-dihidro-3*H*-pirrolo[2,3-*d*]pirimidin-5-il)metil)formamida (200,0 mg, 0,48 mmol), *n*-hexilamina (125,00 μ l, 0,95 mmol) y borohidruro de sodio (55 mg, 1,43 mmol) para dar el producto deseado como un polvo de color blanco (200 mg, 83,0 %), *T_f* >300 °C (descomposición).

- 25 δ_H (400 MHz, DMSO-*d*₆): 0,82 (3H, t, J 7,4), 1,20 (6H, m), 1,34 (2H, app. quintete), 2,40 (2H, t, J 7,4), 3,60 (2H, s), 6,30 (1H, s), 7,23 (15H, m), 7,37 (1H, bs), 10,62 (1H, bs)
- 30 δ_C (400 MHz, DMSO-*d*₆): 14,4, 22,5, 26,8, 31,6, 29,6, 45,2, 48,3, 70,4 (q), 99,7 (q), 115,2, 116,7 (q), 127,0, 128,1, 129,0, 145,4 (q), 150,1 (q), 150,5 (q), 159,7 (C=O)

$\nu_{\text{máx}}$ (película)/ cm^{-1} : 1.552, 1.648, 1.734, 2.856, 2.928

HRMS (m/z ESI⁻): Encontrado: 504,2769 ([$M-H$]⁻ $\text{C}_{32}\text{H}_{34}\text{N}_5\text{O}$; requerido: 504,2763)

Ejemplo 4: Cloruro de *N*-((2-amino-4-oxo-4,7-dihidro-3*H*-pirrolo[2,3-*d*]pirimidin-5-il)metil)hexan-1-aminio



- 5 Preparado según el procedimiento general B utilizando 5-((hexilamino)metil)-2-(tritolamino)-3*H*-pirrolo[2,3-*d*]pirimidin-4(7*H*)-ona (190 mg, 0,39 mmol) y HCl metanólico 1,25 M (3 cm^3) para dar el producto deseado como un polvo de color blanco (70 mg, 64,8 %), $T_f > 300$ °C.

δ_H (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): 0,83 (3H, t, J 7,2), 1,25 (6H, m), 1,59 (2H, app. sextete, J 7,2), 2,87 (2H, m), 4,11 (2H, t, J 5,3), 6,71 (2H, bs), 6,84 (1H, d, J 3,6), 9,11 (2H, bs), 11,25 (1H, bs), 11,46 (1H, bs)

- 10 δ_C (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): 14,3, 22,3, 25,8, 25,9, 31,1, 42,6, 46,1, 98,9 (q), 109,3 (q), 118,5, 148,1 (q), 152,8 (q), 159,8 (C=O)

$\nu_{\text{máx}}$ (película)/ cm^{-1} : 1.578, 1.625, 1.669, 2.429, 2.712, 2.861, 2.930, 2.957, 3.266

HRMS (m/z ESI⁺): Encontrado: 264,1830 ([$M+H$]⁺ $\text{C}_{13}\text{H}_{22}\text{N}_5\text{O}$; requerido: 264,1824).

Todos los ejemplos descritos en este documento son sustratos de TGT.

- 15 Todos los ejemplos descritos en este documento no son inhibidores ni sustratos para HPRT

Para evaluar el potencial de estos compuestos *in vivo*, se indujo una enfermedad monofásica crónica de EAE en ratones antes del tratamiento con la nueva entidad química (NCE). La enfermedad de la EAE fue inducida en ratones hembra (C57BL/6) de 8-10 semanas de edad por inyección subcutánea (s.c.) de 200 μl de emulsión que contenía 150 μg de péptido MOG₃₃₋₅₅ (Genscript) en Adyuvante Completo de Freund (CFA; que contenía 5 mg/ml de tuberculosis de *Micobacterium* inactivada por calor). El mismo día, a los ratones se les administraron 500 ng de toxina de tos ferina (Kaketsuken, Japón) por vía intraperitoneal (i.p.) y de nuevo dos días después. La gravedad de la enfermedad se registró cada 24 horas: 0-Normal; 1: Cola flácida; 2: Movimiento inestable/tambaleante; 3: debilidad completa de las extremidades traseras; 4: parálisis de las extremidades traseras y de las extremidades anteriores; 5: estado moribundo/muerto. El protocolo se basa en Nature Protocols para la Inducción Activa de la encefalomiелitis alérgica experimental, que incluye la metodología de puntuación:

Stromnes IM, Goverman JM (2006) Active induction of experimental allergic encephalomyelitis. Nat Protoc. 1(4): 1810-9.

La Figura 5 muestra los resultados de las pruebas *in vivo* para la molécula de cloruro de *N*-((2-amino-4-oxo-4,7-dihidro-3*H*-pirrolo[2,3-*d*]pirimidin-5-il)metil)-3-fenilpropan-1-aminio (mostrado como Compuesto I). La puntuación EAE se refiere a una evaluación de la progresión de la enfermedad con respecto a problemas como la parálisis de la cola y la parálisis de las extremidades, una puntuación más alta es un peor estado. Una puntuación de 1 indica un tono de la cola disminuido, una puntuación de 2 indica debilidad en las patas traseras (paraparesia), una puntuación de 3 indica parálisis de las extremidades posteriores y/o incontinencia. Téngase en cuenta que los animales no tratados tienen un empeoramiento continuo y progresivo de la enfermedad. Por el contrario, los animales tratados con cloruro de *N*-((2-amino-4-oxo-4,7-dihidro-3*H*-pirrolo[2,3-*d*]pirimidina-5-il)metil)-3-fenilpropan-1-aminio (mostrado como Compuesto I) presentan una rápida inversión (dentro de las 24 horas) de los síntomas a la dosis más alta dada (30 mg/ kg, i.p.) y los animales fueron puntuados como libres de la enfermedad después de 4 tratamientos diarios. A dosis más bajas, los animales tuvieron una respuesta más lenta pero, en todos los casos, la progresión de la enfermedad se detuvo y se invirtió.

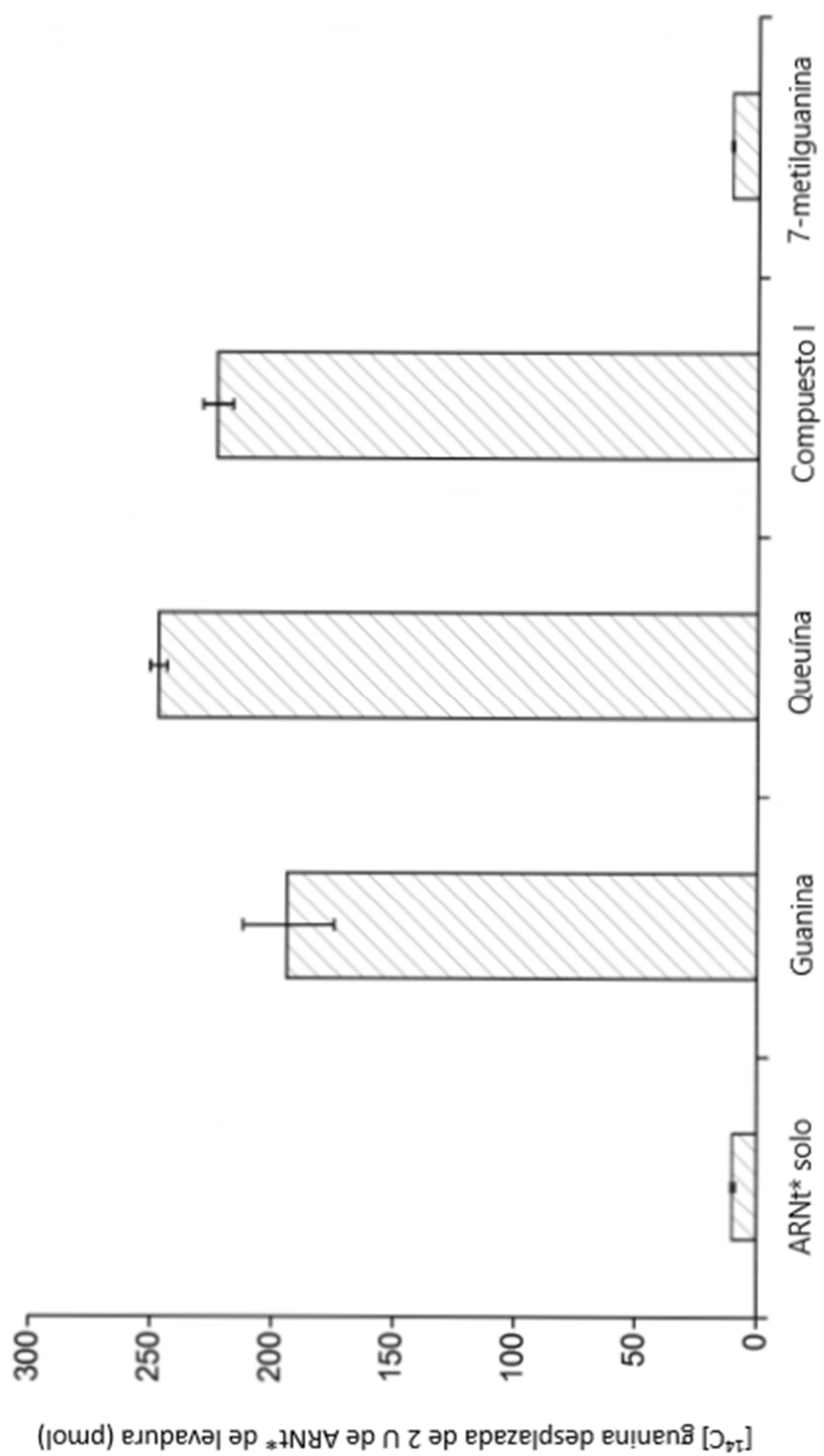
La Figura 6 muestra que, según las puntuaciones de discapacidad observadas, los animales tratados mostraron un retorno drástico al aumento de peso normal, alcanzando un nivel de peso del 96,6 % respecto a los controles (19,9 gramos frente a 20,6 gramos), a los 21 días posteriores a la inoculación (dpi). Esto contrasta con la caída constante del peso corporal de los animales enfermos de EAE no tratados hasta un nivel del 86,4 % respecto a los controles a 21 dpi (17,8 gramos frente a 20,6 gramos). La coordinación motora y la fuerza de las extremidades traseras también fueron evaluadas por la capacidad de los ratones para cruzar una barra horizontal (Figura 7). Los animales no enfermos cruzaron la barra con un tiempo promedio de $4,3 \pm 0,57$ segundos. A partir de 9 dpi, los ratones EAE

mostraron un rápido deterioro en el rendimiento y posteriormente fueron incapaces de mantener el agarre sobre el aparato. Sorprendentemente, el tratamiento con cloruro de *N*-((2-amino-4-oxo-4,7-dihidro-3*H*-pirrolo[2,3-*d*]pirimidin-5-il)metil)-3-fenilpropan-1-aminio (mostrado como Compuesto I) restableció completamente el comportamiento de los ratones enfermos de EAE en los niveles de control en el ámbito de los 4 tratamientos.

- 5 Además de los datos mostrados en las Figuras 5, 6 y 7, todas las moléculas descritas en este documento se probaron en el modelo de EAE crónica y se encontró que mostraban una mejora sustancial hasta e incluyendo la inversión de los síntomas a un estado libre de enfermedad en los sujetos.

REIVINDICACIONES

1. Una molécula capaz de actuar como sustrato para el complejo enzimático queuína-insertasa y donde dicha molécula no es sustrato de hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasa (HPRT) para su uso en el tratamiento de enfermedades autoinmunes.
- 5 2. Una molécula capaz de actuar como sustrato para el complejo enzimático queuína-insertasa, donde dicha molécula no es sustrato para HPRT y donde dicha molécula tiene el efecto de disminuir la producción de interferón gamma, para su uso en el tratamiento de enfermedades autoinmunes.
3. Una molécula para su uso en el tratamiento de enfermedades autoinmunes según cualquier reivindicación precedente, en donde la molécula tiene un desplazamiento ≥ 50 pmol en un ensayo de desplazamiento de guanina.
- 10 4. Una molécula para su uso en el tratamiento de enfermedades autoinmunes según cualquier reivindicación precedente, en donde la molécula produce el producto GMP en cantidades ≥ 60 % del control en el ensayo HPRT.
5. Una molécula para su uso en el tratamiento de enfermedades autoinmunes según cualquier reivindicación precedente, en donde la molécula disminuye la producción de interferón gamma en células de tipo salvaje a una concentración de 100 μ M.
- 15 6. Una molécula para su uso en el tratamiento de enfermedades autoinmunes según las reivindicaciones 1-5, en donde la enfermedad autoinmune se selecciona de artritis reumatoide, colitis ulcerosa, psoriasis, diabetes y enfermedad inflamatoria intestinal, incluida la enfermedad de Crohn; y como agentes para suprimir el rechazo al trasplante.
7. Una molécula para su uso en el tratamiento de enfermedades autoinmunes según las reivindicaciones 1-5, en donde la enfermedad autoinmune es la esclerosis múltiple.
- 20 8. Una molécula para su uso en el tratamiento de enfermedades autoinmunes según las reivindicaciones 1-7 en combinación con agentes terapéuticos adicionales.
9. Una molécula para su uso en el tratamiento de enfermedades autoinmunes según la reivindicación 8, donde los agentes terapéuticos son medicamentos para el tratamiento de los efectos del daño de la esclerosis múltiple en los
- 25 pacientes.

**FIG. 1**

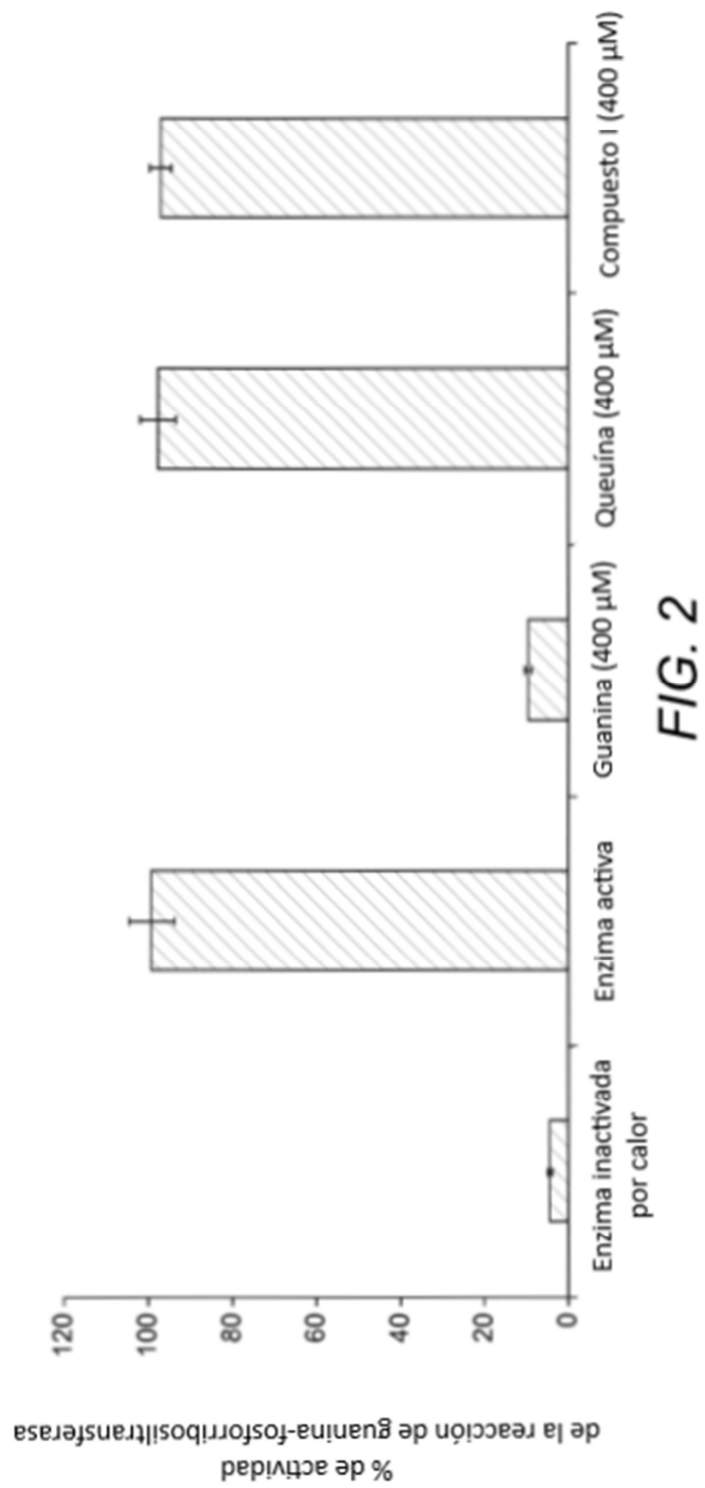


FIG. 2

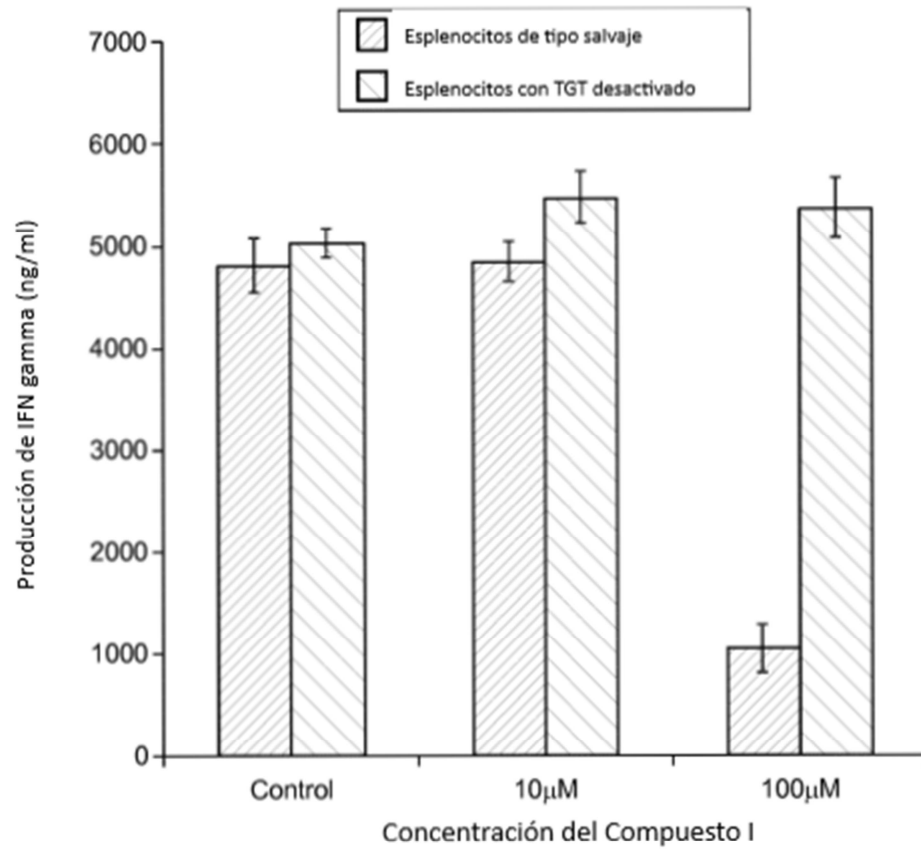


FIG. 3

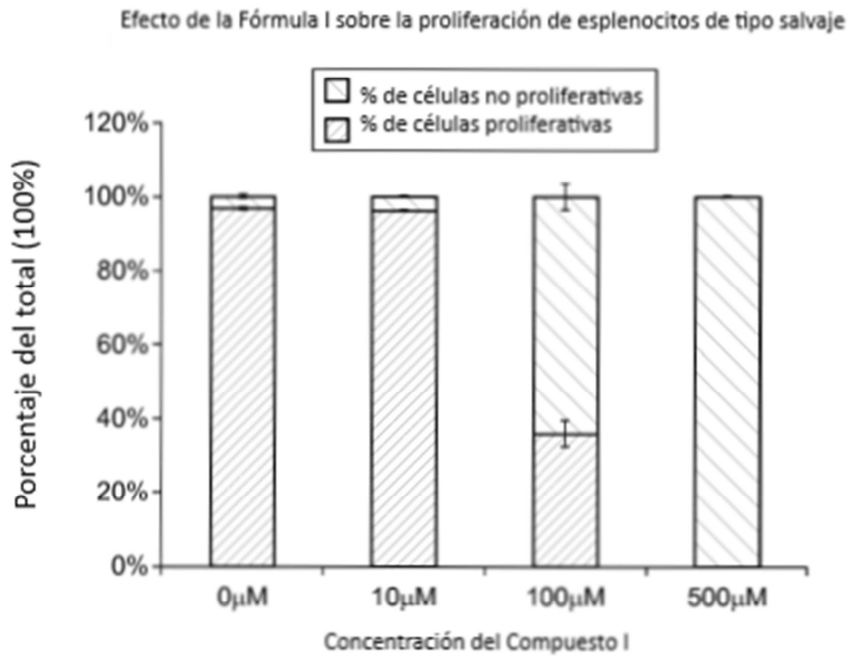


FIG. 4a

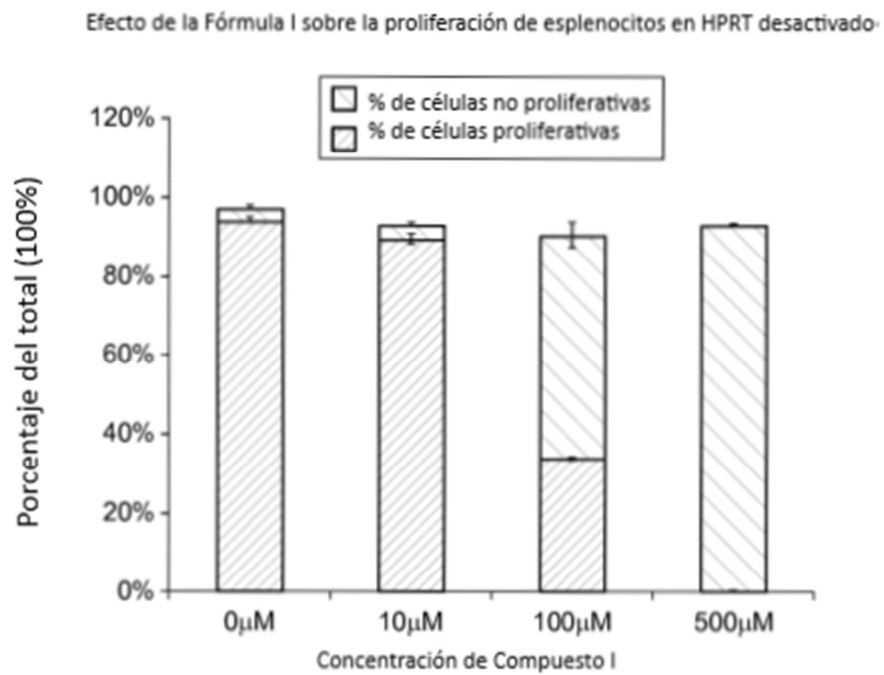


FIG. 4b

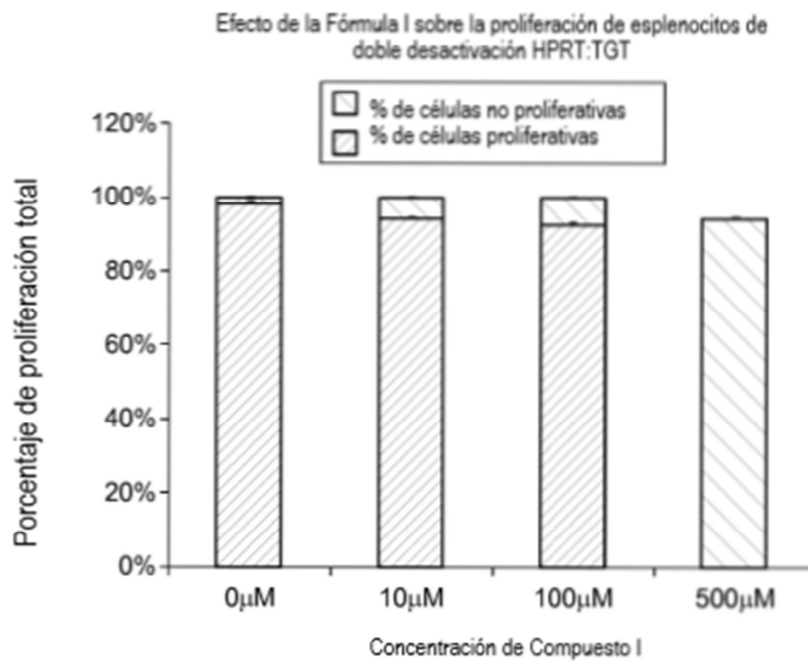


FIG. 4c

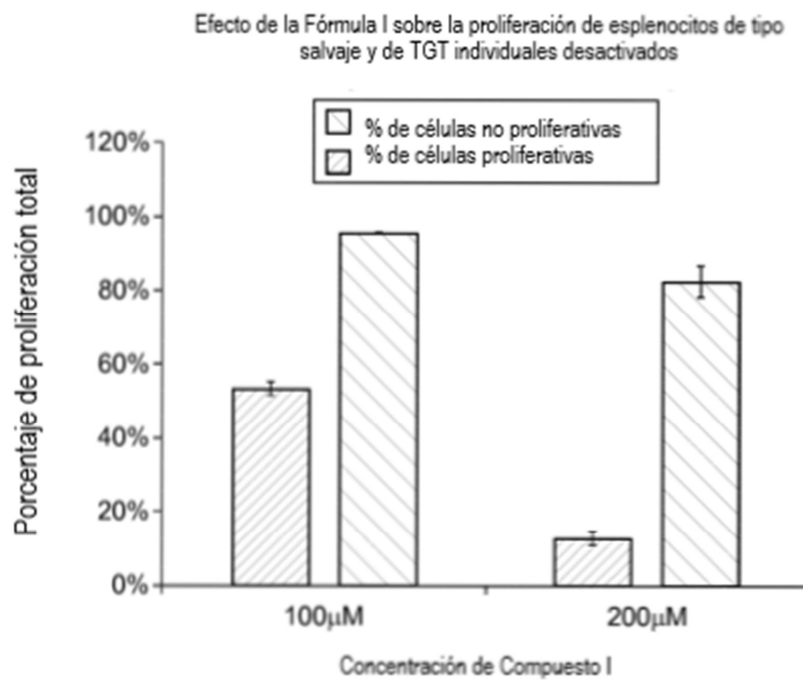


FIG. 4d

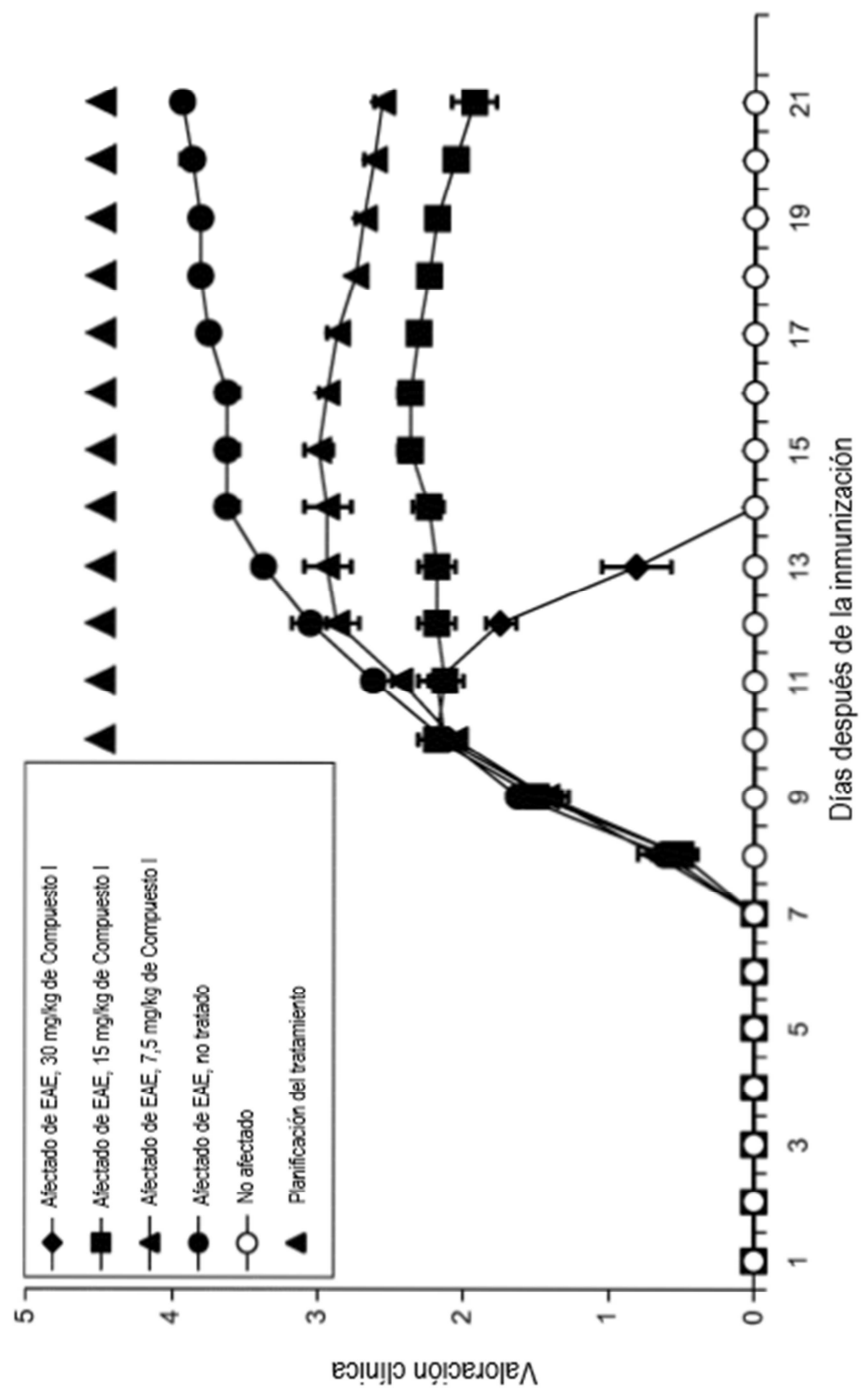


FIG. 5

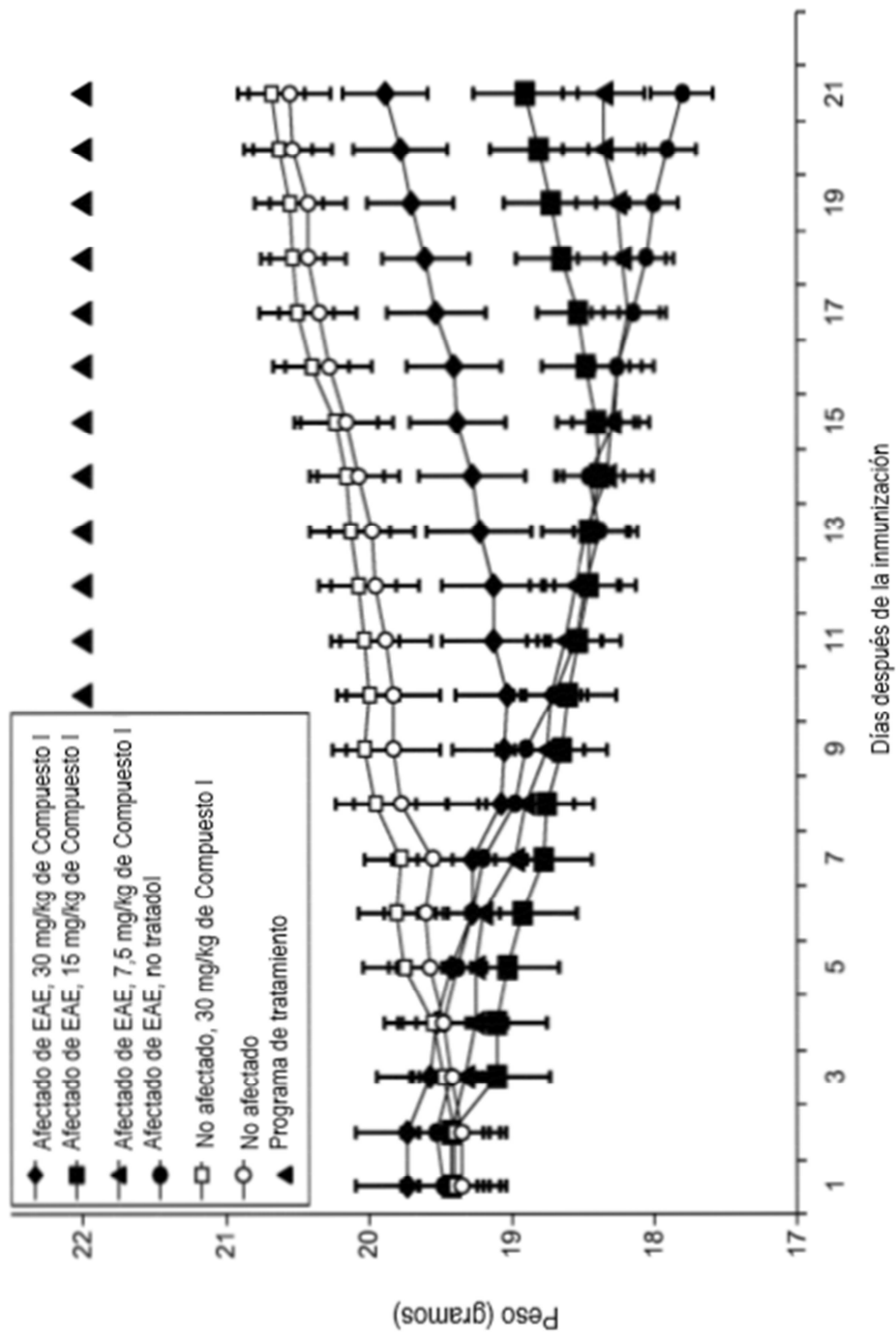


FIG. 6

