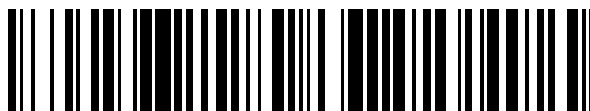


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 747 635**

51 Int. Cl.:

A61P 17/06 (2006.01)

A61K 31/546 (2006.01)

A61P 37/06 (2006.01)

A61P 19/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.09.2014** **PCT/IB2014/001940**

87 Fecha y número de publicación internacional: **02.04.2015** **WO15044762**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.09.2014** **E 14799527 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.07.2019** **EP 3068491**

54 Título: **Derivado de ácido 7-aminocefalosporánico como inhibidor de la actividad de IL-15 e IL-2**

30 Prioridad:

30.09.2013 PL 40550613

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
11.03.2020

73 Titular/es:

WARSZAWSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY
(100.0%)

Al. Zwirki i Wigury 61
02-091 Warszawa, PL

72 Inventor/es:

KOZIAK, KATARZYNA;
ZYZYNSKA-GRANICA, BARBARA;
FILIPEK, SLAWOMIR;
NIEWIECZERZAL, SZYMON;
TRZASKOWSKI, BARTOSZ;
ZEGROCKA-STENDEL, OLIWIA;
DUTKIEWICZ, MALGORZATA;
KRZECZYNSKI, PIOTR;
KACZMAREK, ELZBIETA y
WINIARSKA, MAGDALENA

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 747 635 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

Derivado de ácido 7-aminocefalosporánico como inhibidor de la actividad de IL-15 e IL-2

Campo de la invención

La presente invención se refiere al derivado del ácido 7-aminocefalosporánico cefazolina, para usar como el inhibidor de receptores de IL-15 e IL-2 en la prevención y/o tratamiento de las enfermedades relacionadas con la sobreproducción de interleuquina 15 e interleuquina 2, del grupo de la psoriasis, sarcoidosis, leucemias de células T y rechazo de trasplante.

Antecedentes de la invención

La interleuquina 15 (IL-15) es la citoquina que ejerce actividad pleiotrópica hacia las células del sistema inmunitario así como otros tipos de células. La IL-15 presenta una bioactividad de amplio espectro, por lo tanto está situada arriba de la cascada de citoquinas proinflamatorias. El deterioro de los mecanismos que regulan la expresión de la IL-15 da como resultado la sobreproducción de esta citoquina y contribuye directamente al desarrollo de patologías tales como procesos inflamatorios, enfermedades autoinmunitarias, infecciones y cambios neoplásicos. La IL-15 se considera una citoquina crucial en la etiología de la artritis reumatoide (McInnes I.B. et al., *Nat. Med.* 2, 175-82 (1996); McInnes I. B. et al., *Nat. Med.* 3, 189-95 (1007); McInnes I.B. et al., *Immunol Today* 19, 75-9 (1998), psoriasis (Villadsen L.S. et al., *J. Clin. Invest.* 112, 1571-80 (2003), enfermedad inflamatoria del intestino (Kirman I, Nielsen O.H., *Am. J. Gastroenterol* 91, 1789-1794 (1996); Sakai T. et al., *Gastroenterology* 114, 1237-1243 (1998)), sarcoidosis (Agostini C.T.L. et al., *J. Immunol.* 157, 910-8 (1996)) y leucemia de células T (Dobbeling U. et al., *Blood* 92, 252-8 (1998)). Se ha prestado mucha atención a la IL-15, debido a la participación de esta citoquina en el rechazo de trasplante (Baan C.C. et al., *Transplant Proc.* 31, 2726-8 (1999); Lewis E.C. et al., *Cytokine* 34, 106-13 (2006); Shi R. et al., *Transpl. Immunol.* 12, 103-8 (2004); Ferrari-Lacraz S. et al., *Transplantation* 82, 1510-7 (2006); Zheng X.X. et al., *Transplantation* 81, 109-16 (2006)).

La implicación significativa de la IL-15 en el desarrollo de las patologías mencionadas antes sugiere que dirigirse a esta ruta de señalización de citoquinas puede reducir o eliminar la aparición de trastornos relacionados con la IL-15. Esta estrategia se ha probado recientemente mediante una serie de ensayos biológicos. La reducción de las respuestas biológicas mediadas por IL-15, usando el receptor IL-15Ra soluble (Liew F.Y., McInnes I. B., *Ann. Rheum. Dis.* 61 Supl. 2, ii100-2 (2002); Ruchatz H. et al., *J Immunol.* 160, 5664-60 (1998); Smith X.G. et al., *J. Immunol.* 165, 3444-50 (2000); Wei X et al., *J. Immunol.* 167, 277-82 (2001)), anticuerpos que inhiben IL-2/receptor IL-15R β (Morris J.C., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103, 401-6 (2001); Tinubu S.A. et al., *J. Immunol.* 153, 4330-8 (1994), anticuerpos que inhiben la IL-15 (Villadsen L.S. et al. *J. Clin. Invest.* 112, 1571-80 (2003) o molécula de IL-15 modificada de actividad antagonista competitiva (Ferrari-Lacraz S. et al., *J. Immunol.* 173, 5818-26 (2004); Kim Y.S. et al., *J. Immunol.* 160, 5742-8 (1998)) siempre daba como resultado el alivio de los síntomas de la enfermedad. Las terapias experimentales demostraban una menor aparición de incidencia de artritis reumatoide inducida por colágeno en ratones (Ruchatz H. et al., *J Immunol.* 160, 5664-60 (1998); Ferrari-Lacraz S. et al., *J. Immunol.* 173, 5818-26 (2004); Kim Y.S. et al., *J. Immunol.* 160, 5742-8 (1998)) y primates (Liew F.Y., McInnes I.B., *Ann. Rheum. Dis.* 61 Supl. 2, ii100-2 (2002)), atenuación de síntomas de psoriasis en el modelo de ratón de la enfermedad (Villadsen L.S. et al., *J. Clin. Invest.* 112, 1571-80 (2003)), reducción de la inflamación inducida por carragenanos en ratones (Wei X et al., *J. Immunol.* 167, 277-82 (2001)) y también en ratones, supervivencia prolongada de alotrasplantes de corazón (Smith X.S. et al., *J. Immunol.* 165, 3444-50 (2000); Tinubu S.A. et al., *J. Immunol.* 153, 4330-8 (1994) e islotes de Langerhans (Ferrari-Lacraz S. et al., *J. Immunol.* 173, 5818-26 (2004)). Las estrategias adoptadas actualmente basadas en la inhibición de la IL-15 parece que son eficaces, pero ninguna de ellas se ha aprobado para uso clínico hasta ahora. Las más avanzadas y prometedoras, desde el punto de vista de la aplicación médica, son los ensayos dirigidos a la inhibición de la actividad de la IL-15 por anticuerpos anti-IL-15 humanos (HuMax-IL15, AMG-714) (Baslund B. et al. *Arthritis Rheum* 52, 2686-92 (2005)). Sin embargo, el tema de preocupación grave es el efecto de la "señalización inversa" (Budagian V. et al., *J. Biol. Chem.* (2004)). Se da por supuesto que el complejo de anticuerpo HuMax-IL15 e IL-15 puede producir el mismo una respuesta celular, limitando así la eficacia terapéutica de este anticuerpo dirigido hacia la neutralización de la IL-15 (Budagian V. et al. *Cytokine Growth Factor Rev.* 17, 259-80 (2006)).

Además, los resultados no publicados de los autores de la invención demuestran una actividad angiogénica significativa de la IL-15. La participación de la IL-15 en la angiogénesis in vivo ya se ha descrito (Angiolillo A.L. et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 233, 231-7 (1997); Kuniyasu H. et al., *Pathobiology* 69, 86-95 (2001)), pero los recientes resultados de los autores de la invención también han mostrado proliferación y migración inducida por la IL-15 de células endoteliales. La identificación de otro factor angiogénico no era sorprendente, porque su presencia ya se había detectado en la artritis reumatoide, donde se considera que el mecanismo deteriorado de la angiogénesis es la principal patogénesis de esta enfermedad.

La artritis reumatoide (RA) es la enfermedad sistémica más común del tejido conjuntivo, que afecta como media a aproximadamente 1% de la población mundial. Estimaciones recientes han mostrado mayor prevalencia en mujeres que en hombres (3:1), y la mayor prevalencia de la RA se ha descrito en el intervalo de 30-60 años de edad. Se supone que aproximadamente 30% de las personas afectadas de RA padecen síntomas graves, que son las causas

- principales de discapacidades en el plazo de varios años. La esperanza de vida de las personas que padecen RA es aproximadamente 10 años más corta, según los datos estadísticos. Se cree que la aparición de la RA es resultado de la combinación compleja de muchos factores, tales como predisposición genética, respuesta inmunitaria innata y adquirida deteriorada, así como componentes ambientales. El tratamiento farmacológico de la RA disponible
- 5 actualmente en el mercado médico, no elimina la causa de la enfermedad. Los fármacos antiinflamatorios no esteroideos (NSAID) son medicamentos que ayudan a gestionar el dolor crónico (efecto analgésico) y reducen la inflamación, cuando se usan a lo largo de un periodo de tiempo. Suprimen los síntomas de la enfermedad, pero no detienen la evolución de la enfermedad.
- Entre los fármacos antirreumáticos modificadores de la enfermedad (DMARD), el tratamiento de primera línea en la
- 10 RA es el metotrexato. Los otros DMARD sintéticos son leflunomida, sulfasalazina, hidroxicloroquina, D-penicilamina, sales de oro, azatioprina, ciclosporina y ciclofosfamida. Sin embargo, incluso en pacientes que responden al tratamiento, la enfermedad evoluciona y se observa una menor eficacia clínica después del tratamiento a largo plazo.
- Las otras clases de DMARD son los productos médicos biológicos. Entre los fármacos disponibles en el mercado
- 15 farmacéutico, hay que mencionar los inhibidores del factor de necrosis tumoral (TNF):
- infliximab (anticuerpo monoclonal anti-TNF quimérico);
 - etanercept (proteína de fusión que consiste en el dominio del receptor extracelular p75 para TNF y el fragmento Fc del anticuerpo humano IgG1);
 - adalimumab (anticuerpo monoclonal anti-TNF humano),
- 20 así como los inhibidores de otras proteínas:
- anakinra, antagonista del receptor de IL-1;
 - abatacept, proteína de fusión compuesta de la región Fc de la inmunoglobulina IgG1 fusionada con el dominio extracelular de CTLA-4. Mediante la unión de las moléculas coestimuladoras B7-1 y B7-2 situadas sobre las células presentadoras de antígeno, inhibe la transducción de señales coestimuladoras por CD28 en células T;
- 25 - rituximab, anticuerpo monoclonal quimérico contra la proteína CD20 encontrada principalmente en la superficie de células B maduras que actúan eliminando células B.
- Tocilizumab, anticuerpo monoclonal humanizado contra el receptor de interleuquina 6, ha sido aprobado por el mercado farmacéutico europeo como el primer inhibidor de IL-6.
- Los resultados positivos de ensayos clínicos en fase II llevados a cabo por la empresa Amgen con AMG-714
- 30 (previamente HuMax-IL15), anticuerpo monoclonal humano que se dirige a la IL-15, se describieron en 2004 (McInnes, I., et al.). Sin embargo, hasta la fecha no hay información disponible sobre los ensayos clínicos en fase III.
- La introducción de los productos médicos biológicos en la terapia de la artritis reumatoide se considera un gran avance en el tratamiento de la RA, pero estos productos biológicos (normalmente usados en combinación con el metotrexato de propiedades citostáticas e inmunosupresoras) solo son eficaces para limitar los síntomas de la
- 35 enfermedad y retrasar la degradación de las articulaciones en aproximadamente 30% de los pacientes tratados.
- Debido a los efectos terapéuticos limitados y altos costes de producción de los productos médicos biológicos actualmente disponibles, sigue siendo válida la demanda de un fármaco anti-RA eficaz de nueva generación. La investigación en curso se dirige al descubrimiento de nuevos mecanismos moleculares para terapias dirigidas.
- También se han propuesto péptidos de secuencias modificadas que imitan la IL-15 (puestos de manifiesto, entre
- 40 otros en los documentos WO 2006/029578 y WO 2010/037351) como potenciales productos farmacéuticos en el tratamiento de la artritis reumatoide. Se supone que estos péptidos se unen a la subunidad del receptor IL-15R α , lo que debería dar como resultado la inhibición de la proliferación de células T, menor inducción de TNF- α así como expresión de IL-8 e IL-6. Hasta la fecha la eficacia de estos nuevos compuestos no se ha probado en estudios clínicos.
- Hay otras citoquinas, que participan en la patogénesis de enfermedades inflamatorias, inducidas por la sobreproducción de interleuquina 15.
- 45 En la compleja red de los mediadores inmunitarios, la interleuquina 2 (IL-2) se considera la citoquina principal que controla la proliferación y diferenciación de las células inmunitarias. La IL-2 activa, entre otros, la proliferación y diferenciación de linfocitos T, diferenciación de linfocitos T hacia linfocitos T citotóxicos, crecimiento y diferenciación de linfocitos B, activación y proliferación de células NK y activación de macrófagos. En condiciones fisiológicas la IL-2 no se detecta en un suero sanguíneo. Debido a su contribución a la activación y estimulación de la función efectora de las células inmunitarias, esta citoquina se considera uno de los principales mediadores inflamatorios en las enfermedades autoinmunitarias. La IL-2 es liberada predominantemente por linfocitos T cooperadores (CD4+)
- 50

activados, también es secretada por linfocitos T CD8+, células dendríticas y linfocitos derivados del timo (128). El efecto corriente abajo de la IL-2 se produce a través de su unión de alta afinidad al receptor IL-2R, que consiste en tres subunidades: La subunidad IL-2R α , que es específica de IL-2 y las subunidades IL-2R β e IL-2R γ , que son compartidas con la IL-15. La forma soluble en el suero del receptor de IL-2 (sIL-2R α , péptido Tac) es liberada en la circulación por las células inmunitarias. En condiciones fisiológicas su concentración en un suero sanguíneo está en un nivel muy bajo, pero es significativamente elevada en algunas patologías, por ejemplo en las enfermedades autoinmunitarias, inflamaciones, algunos tipos de leucemia y rechazos de trasplante alogénicos. Se ha observado que el nivel de sIL-2R α se correlaciona con la evolución de la RA, también hay evidencia de que induce la expresión de IL-15 ("Release of sIL-2R alpha from and activation of native human peripheral blood mononuclear cells by recombinant IL-15". Treiber-Held S, Stewart DM, Barraclough HA, Kurman CC, Nelson DL. *Clin Immunol Immunopathol.* Jul 1996;80(1):67-75).

Actualmente se usan en el tratamiento médico diferentes componentes del complejo de IL-2/IL-2R y/o sus antagonistas, por ejemplo, anticuerpos monoclonales murinos (anti-TAC-M) dirigidos contra el receptor sIL-2R α humano. Debido a su fuerte inmunogenicidad, recientemente se han modificado genéticamente anticuerpos monoclonales humanizados (anti-TAC-H) y se han introducido en la práctica clínica. "Anti-Tac (daclizumab, Zenapax) in the treatment of leukemia, autoimmune diseases, and in the prevention of allograft rejection: a 25-year personal odyssey", Waldmann TA. *J Clin Immunol.*, enero 2007; 27(1): 1-18. Los anticuerpos monoclonales previenen la unión de la IL-2, entre otros, a linfocitos T, obstaculizando así la respuesta de células mediada por IL-2 implicada en el proceso de rechazo de aloinjerto. (WWW.drugbank.ca/drugs/BTD00007).

La necesidad de diseñar un nuevo fármaco basado en una molécula sintética pequeña ha motivado a los autores de la presente invención a alterar el concepto del tratamiento de las enfermedades relacionadas con la sobreproducción de IL-15. Este planteamiento se refiere a la inhibición de la actividad biológica de la IL-15 por un compuesto que se une selectivamente al receptor IL-15R α . De acuerdo con el estado actual del conocimiento y los resultados no publicados de los autores de la invención, la estrategia, al implementarse, debería reducir la cascada proinflamatoria así como la angiogénesis causada por la citoquina proinflamatoria IL-15. La sinergia aditiva debe ser la explicación más probable del mecanismo, no reconocido hasta ahora, de la inhibición de la actividad biológica de la IL-15 por los productos biológicos.

Las moléculas químicas pequeñas conocidas de potencial aplicación en la artritis reumatoide, que interfieren con la interacción del receptor IL-15R α y su ligando (IL-15) son solo derivados de fenilpirazol-anilida, descritos por Ushio H. et al. en *Letters in Drug Design Discovery*, 5, 292-296 (2008). La molécula Y-320, que pertenece al grupo mencionado antes de compuestos de probada biodisponibilidad alta y actividad in vitro, inhibe la actividad de células T inducida por IL-15.

El objetivo de la presente invención era seleccionar una molécula, que inhibiera eficazmente la actividad biológica tanto de la IL-15 como la IL-2 por unión selectiva al receptor IL-15R α específico de IL-15 y bloqueo simultáneo de las subunidades del receptor IL-2R β así como IL-2R γ compartidas por estas dos citoquinas.

Los derivados de ácido 7-aminocefalosporánico, cefalosporinas, son del grupo de antibióticos β -lactámicos semisintéticos, caracterizados por un amplio espectro de actividad antibacteriana. Los antibióticos β -lactámicos ejercen su efecto interfiriendo con el entrecruzamiento estructural de peptidoglucanos (mureína) en paredes celulares bacterianas. Se unen de forma covalente a los sitios activos de D-alanil carboxipeptidasas y transpeptidasas, inhibiendo la actividad de estas enzimas bacterianas implicadas en la síntesis de la pared celular bacteriana.

En el documento US 4.891.370 se ha descrito el uso de derivados de ácido cefalosporánico como agentes antiinflamatorios, en particular de alta eficacia en la artritis reumatoide. Esta actividad antiinflamatoria se ha atribuido a la inhibición de la actividad de elastasa por las cefalosporinas. Los derivados de cefalosporina, descritos en el documento US 4.891.370, están sustituidos en la posición 3 con el radical orgánico o el grupo típico para las cefalosporinas y penem, mientras que el hidrógeno activo del grupo éster en la posición 2 del anillo de 6 miembros es el radical orgánico.

Resumen de la invención

La identificación de un compuesto químico que se acople al receptor IL-15R α se facilitó debido a la evaluación de la estructura del dominio del receptor, que es de importancia fundamental al unirse a la IL-15 (Wei X. et al., *J. Immunol.* 167, 277-82 (2001)). La búsqueda de moléculas químicas pequeñas que se acoplen en el receptor específico de IL-15 se llevó a cabo basándose en el modelo de la estructura de complejo [IL-15R α - IL-15], elaborada basándose en la estructura cristalina del fragmento de complejo (código 2Z3Q del Banco de Datos de Proteínas). La asignación de sitios de unión del receptor farmacóforos, al considerar interacciones específicas con la IL-15, fue posible debido a la determinación de la estructura 3D del complejo de [IL-15R α - IL-15]. Le siguió la búsqueda en la base de datos de moléculas pequeñas ZINC, que abarca aproximadamente 20 millones de compuestos químicos, para encontrar moléculas que puedan cumplir los requisitos estructurales para los farmacóforos. El cribado incluía más de 10 mil compuestos que cumplían los criterios establecidos. También se llevaron a cabo los cálculos con el fin de predecir teóricamente la afinidad de unión y fuerza de los compuestos seleccionados y el sitio activo del receptor. El

acoplamiento molecular de las moléculas elegidas se llevó a cabo usando el software GLIDE. En el acoplamiento, el sitio de unión de la IL-15 del receptor permanecía rígido, pero la molécula podía experimentar cambios conformacionales debido a las modificaciones de rotación de enlaces químicos. El acoplamiento adicional llevado a cabo para las 500 moléculas preseleccionadas permitió el ajuste por inducción de las dos parejas de interacción (receptor de proteína y molécula pequeña).

Usando los métodos de cribado descritos antes, el compuesto específico se ha seleccionado con eficacia en la inhibición de las respuestas celulares inducidas por IL-15 e IL-2 in vitro.

El compuesto específico es el derivado de ácido 7-aminocefalosporánico, ácido (6R,7R)-7-[[2-amino-2-fenilacetil]amino]-3-metil-8-oxo-5-tia-1-azabicyclo[4.2.0]oct-2-en-2-carboxílico, conocido con el nombre común internacional (INN) cefazolina.

La presente invención proporciona el derivado del ácido 7-aminocefalosporánico, cefazolina, para usar como el inhibidor de las subunidades de receptores IL-15R α específica de IL-15 y IL-2R β y IL-2R γ , compartidas por IL-15 e IL-2, en la prevención y tratamiento de enfermedades relacionadas con la sobreproducción de IL-15 e IL-2 del grupo que consiste en psoriasis, sarcoidosis, leucemias de células T y rechazo de trasplante.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra el efecto de la cefazolina en diferente concentración en la proliferación de PBMC estimulada por IL-15.

La Figura 2 muestra el efecto de la cefazolina en diferente concentración en la proliferación de PBMC estimulada por IL-2.

La Figura 3 muestra el efecto de la cefazolina en la síntesis de TNF- α inducida por IL-15 en PBMC.

La Figura 4 muestra el efecto de la cefazolina en la síntesis de TNF- α inducida por IL-2 en PBMC.

La Figura 5 muestra el efecto de la cefazolina en la síntesis de IL-17 inducida por IL-15 en PBMC.

La Figura 6 muestra el efecto de la cefazolina en la síntesis de IL-17 inducida por IL-2 en PBMC.

Descripción de la invención

La cefazolina es una cefalosporina de primera generación de actividad antimicrobiana de amplio espectro. La potente actividad bactericida contra bacterias Gram positivas es la razón de las frecuentes indicaciones de este antibiótico en la práctica clínica. El espectro de la actividad antibacteriana de la cefazolina comprende: estafilococos, estreptococos, que incluyen *Streptococcus pneumoniae* (solo susceptible a la penicilina), *Haemophilus influenzae*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae*, cocos anaerobios.

La cefalosporina se administra lo más frecuentemente en el tratamiento de infecciones graves, tales como, por ejemplo, infección del tracto respiratorio (en particular las partes inferiores del tracto respiratorio) debido a: *S. pneumoniae*, estreptococos del grupo A β -hemolíticos, *Klebsiella spp.*, *H. influenzae*, *S. aureus*, infecciones del tracto urinario y genital debidas a: *E. coli*, *P. mirabilis*, *Klebsiella spp.*, infecciones de la piel y tejidos blandos debidas a: *S. aureus*, estreptococos del grupo A β -hemolíticos y otras cepas de estreptococos; infecciones del tracto biliar debidas a *E. coli* y enterococos, *P. mirabili*, *Klebsiella spp.* y *S. aureus*; infecciones de huesos y articulaciones debidas a *S. aureus*, septicemia debida a *S. pneumoniae*, *P. mirabilis*, *E. coli*, *Klebsiella spp.*; endocarditis debida a *S. aureus* y estreptococos del grupo A β -hemolíticos; así como en profilaxis perioperatoria (según las indicaciones generales del producto farmacéutico).

La cefazolina es muy poco absorbida del tracto gastrointestinal, por lo tanto se debe administrar por vía parenteral, i.m. o i.v. Tiene una buena biodisponibilidad en la cavidad pleural, cavidad peritoneal, líquido sinovial, bilis, huesos y tacto urinario, pero no atraviesa la barrera hematoencefálica. La cefazolina no es metabolizada. Es excretada en la orina debido al mecanismo de filtración glomerular (en menor medida por la secreción tubular) de la estructura inalterada en 90% de la cantidad excretada.

Donde quiera que se use el término "cefazolina" en lo sucesivo, se refiere al ácido (6R,7R)-7-[[2-amino-2-fenilacetil]amino)-3-metil-8-oxo-5-tia-1-azabicyclo[4.2.0]oct-2-en-2-carboxílico o sus sales farmacéuticamente aceptables, en particular la sal de sodio.

La actividad biológica de la cefazolina con respecto al uso según la invención, se ha probado in vitro. Los resultados de los estudios confirman que la cefazolina suprime la proliferación celular inducida por IL-15 e inhibe la síntesis inducida por la IL-15 del TNF- α e IL-17. Se ha observado la misma actividad inhibidora cuando las células eran estimuladas con IL-2.

Estos descubrimientos indican que la cefazolina se puede usar para dificultar las respuestas celulares excesivas inducidas por la IL-15 e IL-2, debido al bloqueo del receptor IL-15R α específico de IL-15 y subunidades de receptor IL-2R β y IL-2R γ , compartidas por estas dos citoquinas.

- 5 En particular, como se describe en la presente memoria, la cefazolina se puede usar para prevenir y tratar enfermedades del grupo que comprende artritis reumatoide, psoriasis, enfermedad inflamatoria del intestino, sarcoidosis, leucemias de células T y rechazo de trasplante.

La cefazolina se puede administrar a un individuo que necesite dicho tratamiento, en particular a un ser humano, en una dosis terapéuticamente eficaz.

- 10 El término "tratamiento" se refiere a la supresión de un estado, un trastorno o una enfermedad, lo que significa inhibición, reducción o retraso del desarrollo de la enfermedad, recaída de la enfermedad o al menos uno de sus síntomas, o recuperación, que significa la remisión de un estado, un trastorno o una enfermedad o al menos uno de sus síntomas.

- 15 La expresión "dosis terapéuticamente eficaz" se refiere a la cantidad del compuesto suficiente para producir una respuesta terapéutica cuando se administra a un individuo con el fin de curar un estado, un trastorno o una enfermedad. La "dosis terapéuticamente eficaz" variará dependiendo de la naturaleza del compuesto seleccionado y de la vía de administración, la clase de una enfermedad y su estado, edad, peso corporal, condición física, susceptibilidad al tratamiento, y puede ser recomendada por un médico basándose en su experiencia y los resultados de ensayos clínicos.

- 20 La dosis terapéutica de la cefazolina se puede administrar como una sola dosis o dosis divididas dadas en ciertos intervalos de tiempo, por ejemplo, como dos, tres, cuatro o más dosis diarias. La dosis diaria máxima de la cefazolina es 12 g.

La dosis diaria de cefazolina en el adulto puede estar en el intervalo de 250 a 500 mg, o puede ser incluso mayor, cuando se administra cada 8 o 12 h.

- 25 Aunque se puede considerar la administración de la cefazolina por sí misma, en general se usará como principio activo de la formulación farmacéutica, de la forma apropiada, adecuada para la vía de administración particular.

La otra realización de la presente invención se refiere a la formulación farmacéutica que comprende cefazolina como el principio activo y los vehículos y/o excipientes farmacéuticamente aceptables para usar en la prevención y/o tratamiento de enfermedades relacionadas con la sobreproducción de IL-15 e IL-2 del grupo que consiste en psoriasis, sarcoidosis, leucemias de células T y rechazo de trasplante

- 30 La formulación farmacéutica, excepto por el principio activo, puede contener vehículos y/o excipientes farmacéuticamente aceptables tradicionales que son inertes y no interaccionan con el principio activo.

La formulación farmacéutica, excepto por el principio activo, también puede contener vehículos y/o excipientes farmacéuticamente aceptables tradicionales que son inertes y no interaccionan con el principio activo.

- 35 La composición farmacéutica se puede formular en cualquier forma farmacéutica adecuada para la administración sistémica, por ejemplo, administración oral, tal como comprimidos y cápsulas, cápsulas de almidón, comprimidos recubiertos o comprimidos enterales; como polvos o gránulos; como una solución, una suspensión o una emulsión. Los comprimidos y cápsulas para administración oral pueden contener excipientes usados de forma rutinaria en la práctica farmacéutica, tales como aglutinantes, diluyentes, disgregantes o lubricantes. Los comprimidos se pueden recubrir por cualquier método conocido en la técnica. Las composiciones farmacéuticas líquidas para administración oral se pueden preparar, por ejemplo, como suspensiones acuosas u oleosas, soluciones, emulsiones, jarabes y elixires o se pueden producir como sustancias secas para la preparación extemporánea de soluciones o suspensiones con agua u otro diluyente adecuado. Las preparaciones farmacéuticas líquidas pueden contener excipientes usados de forma rutinaria en la práctica farmacéutica, tales como agentes de dispersión y emulsión, vehículos no acuosos (pueden comprender aceites comestibles) o conservantes. La selección y cantidad de los excipientes depende de la forma farmacéutica y la vía de administración del fármaco. La composición farmacéutica se puede formular en cualquier forma farmacéutica adecuada, por cualquier método conocido en la técnica, usando cualquier vehículo, diluyente, carga y otros excipientes farmacéuticamente aceptables.

- 40 Debido a la muy mala absorción cuando la cefazolina se administra por vía oral, se prefiere la vía de administración parenteral, es decir, intravenosa o intramuscular. La preparación farmacéutica adecuada para la administración parenteral, por ejemplo, para la administración intramuscular, subcutánea o intravenosa, se puede usar como una suspensión preparada, liofilizado, suspensión extemporánea o concentrado para infusiones intravenosas. Estas preparaciones se pueden formular como formas farmacéuticas unitarias en ampollas, jeringas inicialmente cargadas, infusiones de baja capacidad, o en recipientes de multidosis que consisten en conservantes y vehículos, diluyentes, estabilizantes y/o agentes de dispensación. Los vehículos adecuados para la administración intravenosa de la preparación farmacéutica comprenden, por ejemplo, soluciones acuosas estériles, tales como la solución de sal fisiológica, las soluciones de hidratos de carbono, por ejemplo, glucosa, manitol, dextrosa, lactosa y soluciones
- 55

acuosas de tampón, por ejemplo, tampones de fosfato. La composición farmacéutica puede contener también otros excipientes usados de forma rutinaria para mantener la isoosmoticidad, antioxidantes, conservantes y otros. Alternativamente, el principio activo se puede usar como el polvo obtenido debido al aislamiento de un compuesto sólido en condiciones sépticas o por liofilización del disolvente, para la preparación extemporánea de suspensiones en un diluyente adecuado, por ejemplo, agua estéril desprovista de sustancias pirógenas. La sustancia para infusiones intravenosas preparadas de forma análoga a las inyecciones intravenosas, se puede diluir con glucosa o solución de Ringer o con cloruro sódico acuoso al 0,9% y como tal se puede suministrar al cuerpo a través de una vena.

La actividad biológica de la cefazolina, que inhibe la respuesta de las células inducida por la IL-15 e IL-2, se ha probado durante los estudios in vitro. Los resultados también demostraban inhibición de la proliferación celular, así como la síntesis de TNF- α e IL-17, inducida por estas dos citoquinas. Cuando esta eficacia se prueba en estudios in vivo en modelos animales de las enfermedades, la cefazolina tendrá el potencial de usarse en la prevención y tratamiento de enfermedades relacionadas con la sobreproducción de IL-15 e inflamaciones, tales como artritis reumatoide, psoriasis, enfermedad inflamatoria del intestino, sarcoidosis, leucemias de células T y rechazo de trasplante.

Estudios biológicos

Estudios in vitro

Todos los experimentos se llevaron a cabo en células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de donantes sanos. Las células se aislaron según el protocolo estándar con respecto a la centrifugación por gradiente de densidad. De acuerdo con el protocolo general, se pusieron en una capa 6 ml de sangre sobre 3 ml de Lymphoprep (Axis-shield, Noruega), después se centrifugaron a 800 x g durante 15 min. La capa de PBMC se recogió, las células se lavaron dos veces con solución salina tamponada con fosfato (PBS) (BIOMED-LUBLIN, Polonia) y se suspendieron en medio RPMI1640 (Gibco, Gran Bretaña), que contenía HEPES 10 mM (Sigma, EE.UU.), suero de ternero fetal al 10% (BIOMEDLUBLIN, Polonia) y antibiótico (sulfato de estreptomicina, penicilina G de sodio, anfotericina B, PAA, Austria).

La cefazolina se seleccionó inicialmente en la etapa de cribado, basándose en la estructura tridimensional del modelo de complejo de proteínas [IL-15R $\alpha\beta\gamma$ - IL-15]. La cefazolina se usó como sal de sodio, disponible en el mercado como liofilizado para preparar suspensiones para las inyecciones (Biofazolin, de ZF Polpharma SA)..

Se llevó a cabo el ensayo relacionado con la evaluación de la eficacia de la cefazolina.

En todos los experimentos in vitro se usaron PBMC no estimuladas como control. La eficacia de la inhibición se evaluó en relación con las células estimuladas con IL-15 o IL-2.

Ejemplo 1

Efecto de la cefazolina en la proliferación de PBMC inducida por interleuquina 15 o interleuquina 2.

La proliferación de PBMC se evaluó usando el ensayo de proliferación celular de BrdU disponible en el mercado (Calbiochem, Merck, Alemania). Se sembraron PBMC en una placa de 96 pocillos (25x10³ células en 200 μ l de medio de cultivo/pocillo). Al día siguiente, las células se trataron con el compuesto ensayado en las concentraciones finales: 20 μ M, 100 μ M y 300 μ M. Después de 30 min de incubación con cefazolina, las células se estimularon con IL-5 a la concentración final de 5 ng/ml o IL-2 en la concentración final de 5 ng/ml. Las células se incubaron durante 4 días, después durante las últimas 24 h se añadió bromodesoxiuridina (BrdU) al medio de cultivo en la concentración recomendada por el fabricante. Después de completarse la incubación, las células se centrifugaron (10 min, 160xg) y se fijaron. Se llevaron a cabo etapas experimentales adicionales de acuerdo con el protocolo del fabricante.

Los resultados del efecto de la cefazolina en diferentes concentraciones en la proliferación de PBMC inducida por IL-15 o IL-2 se presentan en la fig. 1 y fig. 2, respectivamente. Los resultados se expresan como el porcentaje de cambio de células que proliferan con respecto a las células de control estimuladas con IL-15 o IL-2.

Ejemplo 2

Efecto de la cefazolina en la síntesis de TNF- α inducida por IL-15 o IL-2 en PBMC

La evaluación de la síntesis de TNF- α en PBMC estimuladas con IL-15 se llevó a cabo usando el método de ELISA y ensayos disponibles en el mercado (R&D, EE.UU.). El experimento se llevó a cabo estrictamente de acuerdo con las recomendaciones del fabricante.

Las PBMC se sembraron en una placa de 24 pocillos (2x10⁶ células en 1 ml de medio de cultivo/pocillo) se trataron con el compuesto de ensayo y después de 30 min se estimularon con IL-15 (5 ng/ml) o IL-2 (5 ng/ml). Después de 48 h de incubación, se recogió el medio de cultivo de cada pocillo para determinar la concentración de TNF- α , las células se recogieron y se lisaron y se midió la concentración de proteínas total en los lisados celulares. Los valores

obtenidos de concentración de TNF- α se calcularon para 1 mg de proteína. Los resultados se expresan como el cambio de porcentaje de la concentración de TNF- α sintetizado en PBMC con respecto a las células de control estimuladas con IL-15.

- 5 El efecto de la cefazolina en diferentes concentraciones (20 μ M, 50 μ M, 100 μ M, 200 μ M, 400 μ M, 600 μ M, 1000 μ M) en la síntesis de TNF- α inducida por IL-15 en PBMC se representa en la Fig. 3. El efecto de la cefazolina en concentración 300 μ M en la síntesis de TNF- α inducida por IL-2 en PBMC se representa en la Fig. 4.

La cefazolina reduce significativamente la síntesis de TNF- α inducida por IL-15 o IL-2 en PBMC en comparación con las células de control estimuladas con IL-15 e IL-2.

Ejemplo 3

- 10 Efecto de la cefazolina en la síntesis de IL-17 inducida por IL-15 o IL-2 en PBMC

La evaluación de la síntesis del IL-17 en PBMC estimuladas con IL-15 o IL-2 se llevó a cabo usando el método de ELISA y ensayos disponibles en el mercado (R&D, EE.UU.). El experimento se llevó a cabo estrictamente de acuerdo con las recomendaciones del fabricante.

- 15 Las PBMC se sembraron en una placa de 24 pocillos (2x10⁶ células en 1 ml de medio de cultivo/pocillo), se trataron con el inhibidor, después de 30 min se estimularon con IL-15 (5 ng/ml) o IL-2 (5 ng/ml). Después de 48 h de incubación, se recogió el medio de cultivo de cada pocillo para determinar la concentración de IL-17, las células se recogieron y se lisaron y se midió la concentración de proteínas total en los lisados celulares. Los valores obtenidos de concentración de IL-17 se calcularon para 1 mg de proteína. Los resultados se expresan como el cambio de porcentaje de la concentración de IL-17 sintetizada en PBMC con respecto a las células de control estimuladas con IL-15 o IL-2.

El efecto de la cefazolina en diferentes concentraciones (20 μ M, 50 μ M, 100 μ M, 200 μ M, 300 μ M, 400 μ M, 600 μ M y 1000 μ M) en la síntesis de IL-17 inducida por IL-15 en PBMC se representa en la Fig. 5. El efecto de la cefazolina en concentración 300 μ M en la síntesis de IL-17 inducida por IL-2 en PBMC se representa en la Fig. 6.

- 25 La cefazolina reduce significativamente la síntesis de IL-17 inducida por IL-15 en PBMC en comparación con células de control estimuladas con IL-15. El aumento de la concentración de cefazolina de 200 μ M a 1000 μ M no afecta a la síntesis de IL-17 en gran medida. Se observa efecto inhibitor fuerte de la cefazolina en la síntesis de IL-17 en células estimuladas con IL-2.

Discusión

- 30 1. Estudios iniciales basados en la evaluación de la citotoxicidad de la cefazolina y la eficacia de la inhibición de la proliferación celular inducida por IL-15 o IL-2.

- La proliferación celular aumentada es una de las respuestas características a la estimulación con IL-15 o IL-2. El bloqueo selectivo del receptor IL-15R α específico de IL-15 así como las subunidades de receptor IL-2R β y IL-2R γ compartidas por IL-15 e IL-2, da como resultado la inhibición de la actividad biológica de dichas citoquinas. Como consecuencia, el aumento de la proliferación celular inducido por IL-15 o IL-2 no se produce. El efecto de la cefazolina en la proliferación de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) aisladas de sangre de donantes sanos se evaluó en el ensayo usando el colorante CFSE fluorescente (Molecular Dynamics, Gran Bretaña) y en el ensayo de incorporación de bromodesoxiuridina (BrdU) (Ensayo de proliferación celular de BrdU, Calbiochem, EE.UU.). La población de PBMC consiste en varios tipos de células, entre otros, hay linfocitos y monocitos. Debido a la expresión de receptores de IL-15 e IL-2 en la superficie de la membrana, se produce proliferación extensa de estas células en respuesta a la estimulación con interleuquina 15 o interleuquina 2. La inhibición de la proliferación celular en presencia del compuesto ensayado puede ser un signo visible de muerte de células causada por la actividad citotóxica o apoptótica del compuesto analizado. El efecto de la cefazolina en la viabilidad de las células se ensayó midiendo la concentración de lactato deshidrogenasa (LDH) en el medio de cultivo y células cultivadas (Ensayo de citotoxicidad no radiactivo CytoTox 96, Promega, EE.UU.). La LDH es una enzima citosólica que en condiciones fisiológicas no es liberada de las células. Sin embargo, cuando se produce daño de la membrana celular o muerte de la célula, la enzima LDH es liberada a la matriz. Una mayor actividad de la LDH en el medio de cultivo se correlaciona con el mayor número de células muertas que resultan del efecto citotóxico del compuesto ensayado. La actividad de la LDH medida en los lisados celulares se usa para la evaluación del número de células vivas. Los resultados del siguiente estudio han demostrado actividad biológica de la cefazolina que inhibe la proliferación de PBMC inducida por IL-15 o IL-2 y no activa la ruta apoptótica. Los experimentos se repitieron tres veces en PBMC de diferentes donantes.

2. Evaluación de la eficacia inhibidora de la cefazolina en la síntesis de TNF- α e IL-17 inducida por IL-15 e IL-2

Las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) responden a la estimulación con IL-15 o IL-2 no solo mediante una mayor proliferación, sino también sintetizando muchas citoquinas proinflamatorias, entre otras, por

ejemplo, TNF- α e IL-17. La inhibición de la actividad biológica de la IL-15 e IL-2 debería dar como resultado la proliferación celular reducida y menor síntesis de TNF- α e IL-17.

5 Se usó cefazolina en diferentes concentraciones para evaluar su efecto en la síntesis de otras citoquinas inducida por IL-15 e IL-2. La actividad biológica de la cefazolina se evaluó midiendo las concentraciones de TNF- α e IL-17 en el medio de cultivo recogidas después de completarse la incubación, usando ensayos inmunoenzimáticos de ELISA.

Los resultados de los ensayos prueban la inhibición de la síntesis de TNF- α e IL-17 y sirven como la siguiente prueba de la actividad biológica de la cefazolina.

REIVINDICACIONES

1. Derivado del ácido 7-aminocefalosporánico, cefazolina, para usar como inhibidor de receptores de IL-15 e IL-2 en la prevención y/o tratamiento de enfermedades relacionadas con la sobreproducción de IL-15 e IL-2 del grupo que consiste en psoriasis, sarcoidosis, leucemias de células T y rechazo de trasplante.
- 5 2. Cefazolina para usar según la reivindicación 1, en donde la enfermedad es la psoriasis.
3. Cefazolina para usar según la reivindicación 1, en donde la cefazolina es para ser administrada en una dosis terapéuticamente eficaz a un individuo que necesite dicho tratamiento.
4. Cefazolina para usar según la reivindicación 3, en donde la cefazolina es para ser administrada como una forma farmacéutica individual.
- 10 5. Formulación farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto como se especifica en la reivindicación 1 como el principio activo, y vehículos y/o excipientes farmacéuticamente aceptables, para usar en la prevención y/o tratamiento de enfermedades relacionadas con la sobreproducción de IL-15 e IL-2 del grupo que consiste en psoriasis, sarcoidosis, leucemias de células T y rechazo de trasplante.
- 15 6. Formulación farmacéutica para usar según la reivindicación 5, en una forma adecuada para la administración intravenosa o intramuscular.

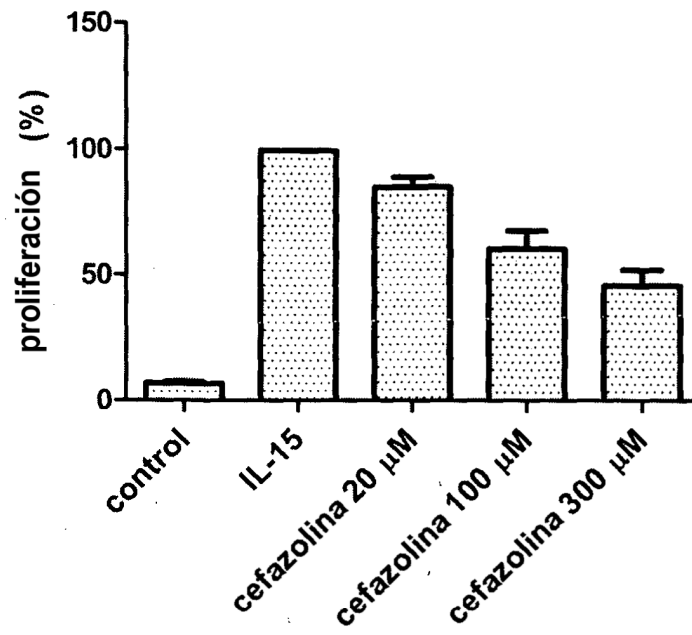


Fig. 1. Efecto de la cefazolina en diferentes concentraciones en la proliferación de PBMC estimuladas con IL-15.

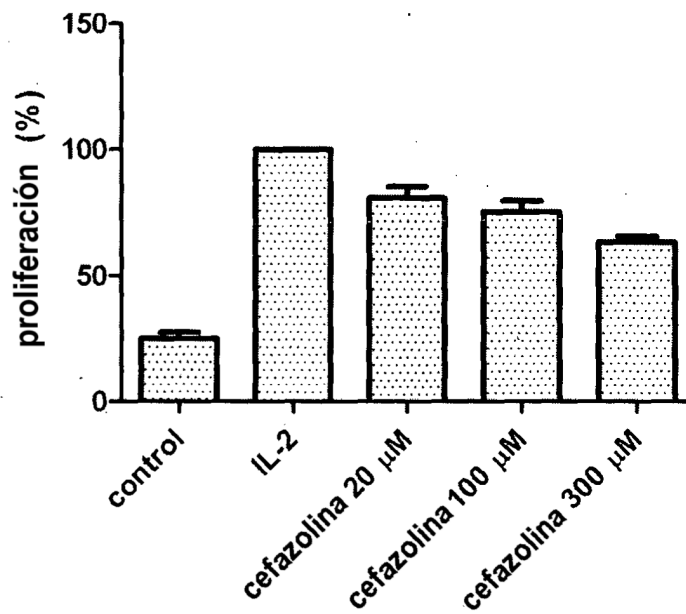


Fig. 2. Efecto de la cefazolina en diferentes concentraciones en la proliferación de PBMC estimuladas con IL-2.

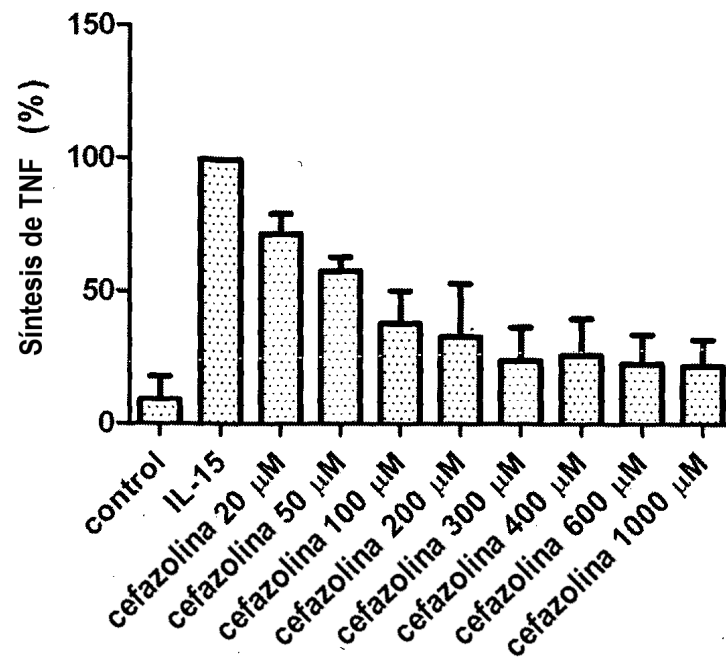


Fig. 3. Efecto de la cefazolina en la síntesis de TNF- α inducida por IL-15 en PBMC.

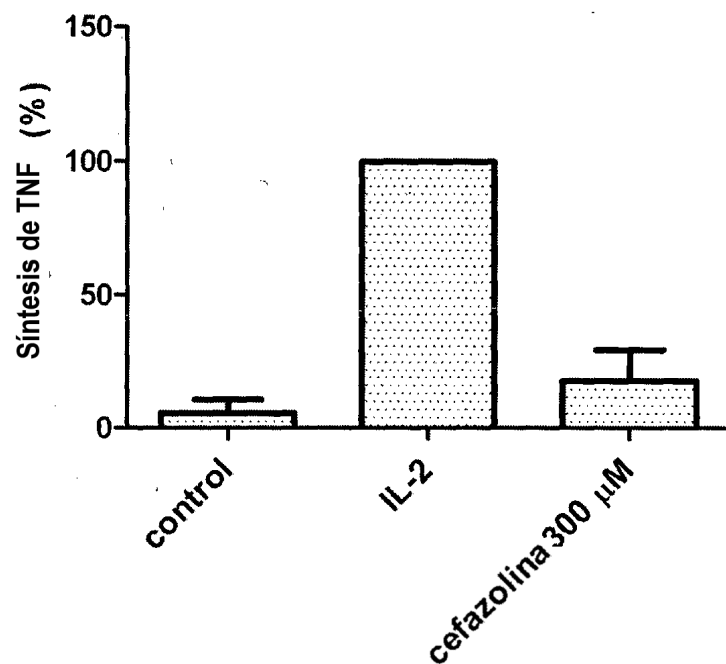


Fig. 4. Efecto de la cefazolina en la síntesis de TNF- α inducida por IL-2 en PBMC.

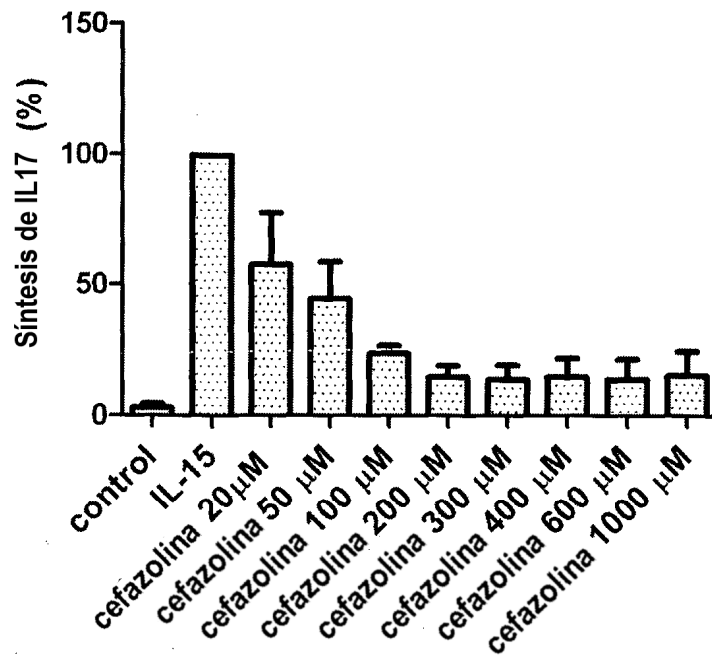


Fig. 5. Efecto de la cefazolina en la síntesis de IL-17 inducida por IL-15 en PBMC.

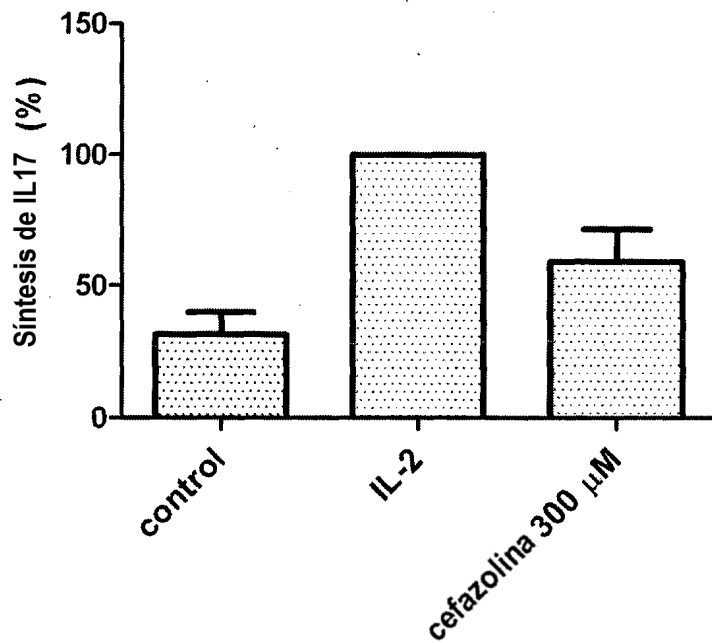


Fig. 6. Efecto de la cefazolina en la síntesis de IL-17 inducida por IL-2 en PBMC.