

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 822 987**

51 Int. Cl.:

C07D 403/12	(2006.01)	A61K 31/44	(2006.01)
C07D 401/14	(2006.01)	A61K 31/341	(2006.01)
C07D 413/14	(2006.01)	A61P 31/12	(2006.01)
C07D 413/12	(2006.01)		
C07D 213/69	(2006.01)		
C07D 307/60	(2006.01)		
A61K 31/4184	(2006.01)		
A61K 31/423	(2006.01)		
A61K 31/4427	(2006.01)		
A61K 31/497	(2006.01)		

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.03.2015 PCT/US2015/021417**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **28.04.2016 WO16064445**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.03.2015 E 15714352 (0)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.07.2020 EP 3209655**

54 Título: **Productos terapéuticos basados en la lantionina sintética 2 tipo C**

30 Prioridad:

24.10.2014 US 201462068322 P
08.01.2015 US 201562101164 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
05.05.2021

73 Titular/es:

LANDOS BIOPHARMA, INC. (100.0%)
1800 Kraft Drive, Suite 216
Blacksburg, VA 24060, US

72 Inventor/es:

BASSAGANYA-RIERA, JOSEP;
CARBO BARRIOS, ADRIA;
GANDOUR, RICHARD;
COOPER, JULIAN, D. y
HONTECILLAS, RAQUEL

74 Agente/Representante:

FERNÁNDEZ POU, Felipe

ES 2 822 987 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

Productos terapéuticos basados en la lantionina sintetasa 2 tipo C

5 Referencia cruzada a solicitudes relacionadas

Esta solicitud reivindica la prioridad bajo el 35 USC §119(e) para la solicitud de patente provisional de Estados Unidos 62/068,322 presentada el 24 de octubre de 2014, y la solicitud de patente provisional de Estados Unidos 62/101,164, presentada el 8 de enero de 2015.

10

Declaración con respecto a la investigación patrocinada federalmente

Esta invención se realizó parcialmente con el soporte del gobierno de los Estados Unidos a partir de los Institutos Nacionales de Salud de los Estados Unidos bajo la subvención SBIR 1R43DK097940-01A1 y la subvención STTR 1R41DK099027-01A1 otorgada a BioTherapeutics Inc. El gobierno de los Estados Unidos tiene ciertos derechos sobre la invención.

15

Campo de la invención

20 La presente invención se refiere al campo de los tratamientos médicos para enfermedades y trastornos. Más específicamente, la presente invención se refiere a clases de compuestos biológicamente activos que tratan y previenen enfermedades inflamatorias y mediadas por el sistema inmunitario tales como la enfermedad inflamatoria intestinal, la artritis reumatoide, la psoriasis, la esclerosis múltiple y la diabetes de tipo 1, así como también enfermedades y trastornos inflamatorios crónicos tales como la resistencia a la insulina, la tolerancia disminuida a la glucosa, la prediabetes, la diabetes de tipo 2 y la inflamación que se relaciona con la obesidad, entre otros.

25

Antecedentes

30 La proteína 2 tipo-C de lantionina (LANCL2) (también llamada "proteína 2 tipo-C de lantionina sintetasa" o "proteína 2 tipo componente C de la lantionina sintetasa") es una proteína de la vía de señalización que se expresa en las células inmunitarias, el tracto gastrointestinal, las neuronas, los testículos y el páncreas [1]. La activación de la vía LANCL2 aumenta la sensibilidad a la insulina y reduce la inflamación asociada con diversas afecciones autoinmunitarias, inflamatorias y metabólicas. Los resultados de las pruebas *in vivo* e *in vitro* en ratones mostraron que mediante el uso de compuestos que se dirigen a esta vía se reducen los niveles de glucosa 2x en las pruebas de tolerancia a la glucosa en comparación con los controles y proporcionó niveles equivalentes a los de AVANDIA® de prescripción (GlaxoSmithKline plc, Brentford, Inglaterra) - un tratamiento efectivo pero con efectos secundarios significativos. Dirigirse a la vía LANCL2 también reduce la inflamación intestinal en un 90 % con una reducción correspondiente de 4 veces en el número de lesiones. Los resultados de esta prueba y otras validaciones de la vía se publican en 12 artículos de revistas revisados por pares [2-13].

40

Dentro de la categoría de inflamación que se relaciona con la autoinmunidad, actualmente existe una pandemia global de trastornos autoinmunitarios como la enfermedad inflamatoria intestinal (IBD), el lupus sistémico, la artritis reumatoide, la diabetes de tipo 1, la psoriasis, la esclerosis múltiple. También hay una pandemia de enfermedades inflamatorias metabólicas crónicas que incluyen el síndrome metabólico, la obesidad, la prediabetes, las enfermedades cardiovasculares y la diabetes de tipo 2. Los tratamientos actuales son moderadamente efectivos pero costosos y tienen efectos secundarios graves. La ruta de administración de los tratamientos más efectivos para las enfermedades autoinmunitarias, tales como los anticuerpos anti-TNF, es por vía intravenosa o subcutánea, lo que requiere visitas a clínicas/cirugías y un monitoreo frecuente. El modo de acción único de la LANCL2 proporciona productos terapéuticos que se administran oralmente que son tan efectivas como los anticuerpos anti-TNF pero sin los efectos secundarios y el alto costo. Dada la epidemia de enfermedades inflamatorias y autoinmunitarias en su conjunto, la vía LANCL2 tiene el potencial de impactar significativamente a millones de pacientes.

45

El ácido abscísico ("ABA") es uno de los compuestos naturales que se encuentran en el proceso de selección original que se une a la LANCL2.

55

50 Existe un número enorme de compuestos que se describen en el campo de la química orgánica sintética. Las siguientes referencias proporcionan varios compuestos: WO1997/036866 de objetivo y otros, WO 2006/053109 de Sun y otros, WO 2006/080821 de Kim y otros, WO 2007/019417 de Nunes y otros, WO 2009/067600 y WO 2009/067621 de Singh y otros, WO 2008/079277 de Adams y otros, JP 2008/056615 de Urasoe y otros, WO 2011/066898 de Stoessel y otros, US 2013/0142825 de Bassaganya-Riera y otros y La patente de Estados Unidos 7.741.367 de Bassaganya-Riera y otros. Se sabe que algunos de los compuestos que se describen en estas referencias activan la vía LANCL2 y otros no.

60

La US 2011/0275558 describe las proteínas de tipo componente c de lantionina sintetasa como objetivos moleculares para prevenir y tratar enfermedades y trastornos.

65

Existe la necesidad de desarrollar ligandos novedosos de la vía LANCL2 para permitir que los tratamientos se adapten específicamente a enfermedades individuales y para maximizar potencialmente su eficacia.

5 Por lo tanto, esta solicitud describe una serie de clases de compuestos que se han desarrollado mediante nuevos enfoques de química médica y se han examinado mediante el uso de técnicas *in silico*, *in vitro* e *in vivo*, para maximizar su capacidad de unirse a la proteína LANCL2 y así efectuar una respuesta beneficiosa en diversas afecciones de enfermedades, que incluyen pero no se limitan a, enfermedades autoinmunitarias, inflamatorias crónicas, metabólicas e infecciosas.

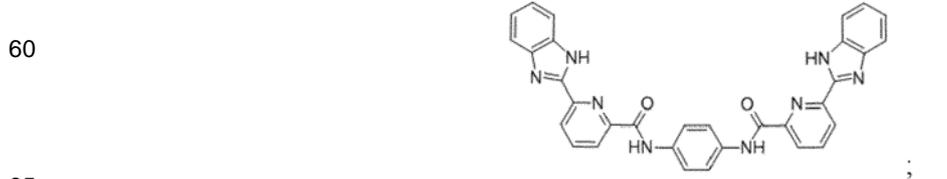
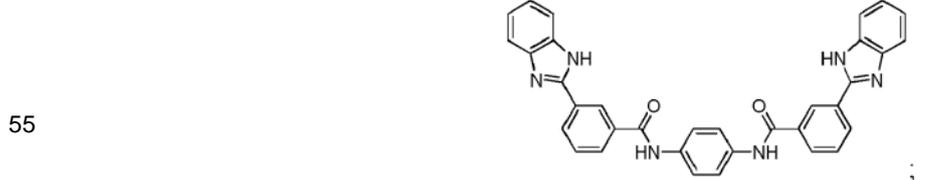
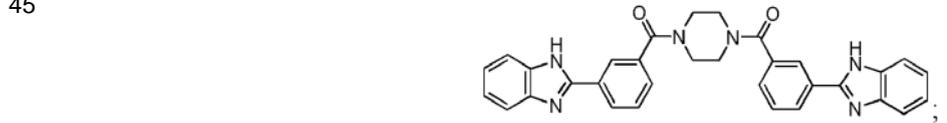
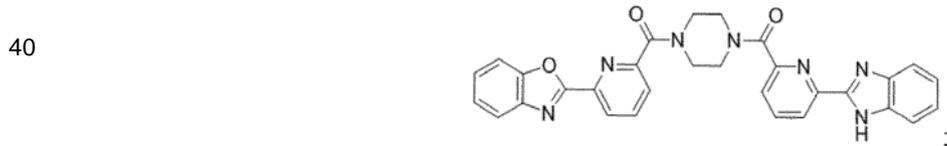
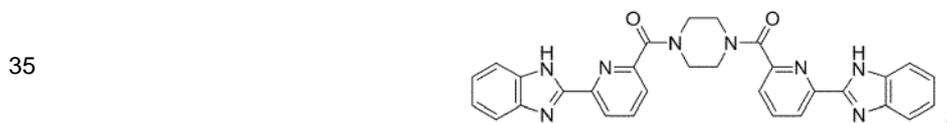
10 Resumen de la invención

De acuerdo con un aspecto de la presente invención, se proporciona un compuesto como se especifica en la reivindicación 1.

15 En algunos compuestos, uno o ambos de A₁ y A₁' es N. En algunos compuestos, uno o ambos de A₂ y A₂' es CH, A₃ es NH, A₄ es N, A₅ es CH y A₆ es CH. En algunos compuestos, uno o ambos de A₂ y A₂' es CH, uno o ambos de A₃ y A₃' es NH, uno o ambos de A₄ y A₄' es N, uno o ambos de A₅ y A₅' es CH, y uno o ambos de A₅ y A₆' es CH. En algunos compuestos, Q es piperazina-1,4-diilo; 2,5-diazabicyclo[2.2.1]heptano-2,5-diilo; 2,5-diazabicyclo[2.2.2]octano-2,5-diilo; 1,4-diazepano-1,4-diilo; N¹,N²-dialquiletano-1,2-diamina-N¹,N²-diilo; N¹,N³-dialquilpropano-1,3-diamina-N¹,N³-diilo; 1,4-diaminoantraceno-9,10-diona-1,4-diilo; C₆ areno-1,4-diamina-N¹,N⁴-diilo en donde el areno está sustituido con uno a cuatro sustituyentes en las posiciones 2, 3, 5 o 6 y cada sustituyente se selecciona independientemente del grupo que consiste en - C(O)O(C₁ a C₆)alquilo, OH, O (C₁ a C₆) alquilo, (C₁ a C₆) alquilo, CF₃, F, Cl y Br; o piperazina-1,4-diilo sustituido en donde la piperazina está sustituida con uno a ocho sustituyentes en las posiciones 2, 3, 5 o 6 y cada sustituyente se selecciona independientemente del grupo que consiste en (C₁ a C₆)alquilo, arilo, arilo(C₁ a C₆)alquilo, C(O)OH y C(O)O(C₁ a C₆)alquilo.

25 En algunos compuestos, los miembros de uno o más pares seleccionados del grupo que consiste en A₁ y A₁', A₂ y A₂', A₃ y A₃', A₄ y A₄', A₅ y A₅', A₆ y A₆', R₁ y R₁', R₂ y R₂', R₃ y R₃', y R₄ y R₄' son lo mismo. En algunos compuestos, los miembros de cada par seleccionados del grupo que consiste en A₁ y A₁', A₂ y A₂', A₃ y A₃', A₄ y A₄', A₅ y A₅', A₆ y A₆', R₁ y R₁', R₂ y R₂', R₃ y R₃', y R₄ y R₄' son lo mismo.

30 Algunos compuestos de la invención tienen la estructura de:



o sales de estos.

También se describen métodos para tratar una afección en un animal con uno cualquiera o más de los compuestos que se describen en la presente descripción. Los métodos comprenden administrar una cantidad efectiva de uno o más de los compuestos que se describen en la presente descripción al animal. La afección puede seleccionarse del grupo que consiste en una enfermedad infecciosa, una enfermedad autoinmunitaria, diabetes y una enfermedad inflamatoria crónica. En algunos métodos, la enfermedad infecciosa comprende una enfermedad viral, como una infección por influenza. En algunos métodos, la enfermedad autoinmunitaria comprende una enfermedad inflamatoria autoinmunitaria, como la enfermedad inflamatoria intestinal, que incluye la colitis ulcerosa y/o la enfermedad de Crohn. En algunos métodos, la diabetes se selecciona del grupo que consiste en la diabetes de tipo 1 y la diabetes de tipo 2. En algunos métodos, la enfermedad inflamatoria crónica comprende el síndrome metabólico. En algunos métodos, los métodos comprenden administrar una cantidad de un compuesto efectivo para aumentar la actividad de la LANCL2, disminuir la inflamación y/o aumentar los efectos antiinflamatorios.

De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se proporciona un compuesto como se especifica anteriormente para usar en un método de tratamiento de una condición como se especifica en la reivindicación 9. El uso puede comprender administrar una cantidad efectiva de uno o más de los compuestos que se describen en la presente descripción al animal, en donde la afección se selecciona del grupo que consiste en una enfermedad infecciosa, una enfermedad autoinmunitaria, diabetes y una enfermedad inflamatoria crónica. En algunas versiones, la enfermedad infecciosa comprende una enfermedad viral, como la influenza. En algunas versiones, la enfermedad autoinmunitaria comprende una enfermedad inflamatoria autoinmunitaria, como la enfermedad inflamatoria intestinal, que incluye la colitis ulcerosa y/o la enfermedad de Crohn. En algunas versiones, la diabetes se selecciona del grupo que consiste en la diabetes de tipo 1 y la diabetes de tipo 2. En algunas versiones, la enfermedad inflamatoria crónica comprende el síndrome metabólico. En algunas versiones, el compuesto es efectivo para aumentar la actividad de la LANCL2, disminuir la inflamación y/o aumentar los efectos antiinflamatorios.

Los objetos y ventajas de la invención aparecerán más completamente a partir de la siguiente descripción detallada de la modalidad preferida de la invención realizada junto con los dibujos adjuntos.

Breve descripción de los dibujos

Figuras 1A y 1B. Predicción computacional de la unión de los compuestos a la LANCL2 y validación experimental bioquímica mediante el uso de SPR.

Figura 2. Histograma de agrupamiento para los cinco grupos principales de NSC6160. Se realizaron cien recorridos de acoplamiento con el NSC6160 acoplado a la LANCL2 mediante el uso de las Herramientas AutoDock. La tolerancia del grupo RMSD fue de 2 Å. Las energías de unión se enumeran en kJ/mol.

Figura 3. Histograma de agrupamiento para los cinco grupos principales de ABA. Se realizaron cien recorridos de acoplamiento con el ABA acoplado a la LANCL2 mediante el uso de las Herramientas AutoDock. La tolerancia del grupo RMSD fue de 2 Å. Las energías de unión se enumeran en kJ/mol.

Figura 4. Histograma de agrupamiento para los cinco grupos principales de BT-11. Se realizaron cien recorridos de acoplamiento con BT-11 acoplado a LANCL2 mediante el uso de las Herramientas AutoDock. La tolerancia del grupo RMSD fue de 2 Å. Las energías de unión se enumeran en kJ/mol.

Figura 5. Histograma de agrupamiento para los cinco grupos principales de BT-6. Se realizaron cien recorridos de acoplamiento con BT-6 acoplado a LANCL2 mediante el uso de las Herramientas AutoDock. La tolerancia del grupo RMSD fue de 2 Å. Las energías de unión se enumeran en kJ/mol.

Figura 6. Histograma de agrupamiento para los cinco grupos principales de BT-15. Se realizaron cien recorridos de acoplamiento con BT-15 acoplado a LANCL2 mediante el uso de las Herramientas AutoDock. La tolerancia del grupo RMSD fue de 2 Å. Las energías de unión se enumeran en kJ/mol.

Figura 7. Histograma de agrupamiento para los cinco grupos principales de BT-ABA-5a. Se realizaron cien recorridos de acoplamiento con BT-ABA-5a acoplado a LANCL2 mediante el uso de las Herramientas AutoDock. La tolerancia del grupo RMSD fue de 2 Å. Las energías de unión se enumeran en kJ/mol.

Figura 8. Cinética de unión de la proteína 2 tipo C de lantionina sintetasa C (LANCL2) con BT-11 y BT-15. Los paneles A y C muestran los sensorgramas de resonancia de plasmón superficial (SPR) para la unión de concentraciones variables de BT-11 (A) y BT-15 (C) a la LANCL2 inmovilizada. Los paneles B y D muestran gráficos de la unidad de resonancia máxima (RU) respecto a la concentración de BT-11 (B) y BT-15 (D). Se indican las constantes de disociación en estado estacionario (K_D) que usan un modelo de unión 1:1.

Figuras 9A y 9B. Cinética de unión de la proteína 2 tipo C de lantionina sintetasa (LANCL2) con el BT-6 (**Figura 9A**) y el BT-ABA-5a (**Figura 9B**). Se muestran los sensorgramas de resonancia de plasmón de superficie (SPR) para la unión de concentraciones variables del BT-6 y el BT-ABA-5a a la LANCL2 inmovilizada.

5 **Figura 10.** Efecto de la administración oral sobre la actividad de la enfermedad y la patología macroscópica de ratones con colitis por sulfato de dextrano sódico (DSS). El panel A muestra las puntuaciones del índice de actividad de la enfermedad en ratones tratados con BT-11 o solo con el vehículo. Los paneles BC muestran las puntuaciones de la patología macroscópica del (B) bazo, (C) los ganglios linfáticos mesentéricos (MLN) y (D) el colon en ratones tratados con vehículo o BT-11. Las diferencias estadísticamente significativas ($P<0,05$) se indican con un asterisco ($n=10$).

10 **Figura 11.** Efecto de la administración oral del BT-11 sobre las lesiones inflamatorias del colon en ratones con colitis por DSS. Se muestran micrografías representativas de (A,D) ratones control (B,E) con DSS y (C,F) con DSS tratados con el BT-11. Las lesiones histopatológicas se evaluaron en base a (G) la infiltración leucocítica, (H) la erosión epitelial y (I) el engrosamiento de la mucosa. Las diferencias estadísticamente significativas ($P<0,05$) se indican con un asterisco ($n=10$).

15 **Figura 12.** Efecto de dosis-respuesta de la administración oral de BT-11 sobre las lesiones inflamatorias del colon en ratones con colitis por DSS. Las lesiones histopatológicas se evaluaron en base a (A) la infiltración leucocítica, (B) el engrosamiento de la mucosa, y (C) la erosión epitelial. Las diferencias estadísticamente significativas ($P<0,05$) se indican con un asterisco ($n=10$).

20 **Figura 13.** Análisis de expresión génica colónica del TNF α , la interleucina 10 (IL-10) y la LANCL2. Se muestra la expresión del gen colónico para evaluar los niveles del (A) TNF α pro-inflamatorio, (B) la IL-10 y (C) la LANCL2. Las diferencias estadísticamente significativas ($P<0,05$) se indican con un asterisco ($n=10$).

25 **Figura 14.** Efecto de dosis-respuesta de la administración oral del BT-11 en sub-conjuntos de células inmunes pro-inflamatorias y antiinflamatorias del colon en ratones con colitis por DSS. Se usaron análisis de citometría de flujo para medir (A) las células TNF α +, (B) las células T IL-10+ CD4+ y (C) las células T FOXP3+ CD4+ en la mucosa colónica.

30 **Figura 15.** Efecto de la administración oral del BT-11 sobre las lesiones patológicas macroscópicas de los tejidos en ratones de tipo salvaje y LANCL2-/- con colitis por DSS. El panel A muestra las puntuaciones del índice de actividad de la enfermedad en ratones de tipo salvaje respecto a los LANCL2-/- tratados con BT-11 o sólo con vehículo. Los paneles B-D muestran las puntuaciones de patología macroscópica del colon (B), (C) los ganglios linfáticos mesentéricos (MLN) y (D) del bazo en ratones de tipo salvaje y LANCL2-/- tratados con vehículo o BT-11. Las diferencias estadísticamente significativas ($P<0,05$) se indican con un asterisco ($n=10$).

35 **Figura 16.** Efecto de la administración oral del BT-11 sobre las lesiones inflamatorias del colon en ratones de tipo salvaje y LANCL2-/- con colitis por DSS. Las lesiones histopatológicas se evaluaron en base a (A) la infiltración leucocítica, (B) el engrosamiento de la mucosa y (C) la erosión epitelial. Las diferencias estadísticamente significativas entre los grupos ($P<0,05$) se indican con un asterisco.

40 **Figura 17.** Efecto de la administración oral del BT-11 en sub-conjuntos de células inmunes que infiltran la lámina propia del colon, el bazo y los ganglios linfáticos mesentéricos (MLN) de ratones de tipo salvaje y LANCL2-/- con colitis crónica. Se usó la citometría de flujo para analizar los niveles de (A) las células MCP1+ CD45+ colónicas, (B) las células MCP1+ CD45+ en los MLN, (C) las células TNF α + CD45+ colónicas, (D) los granulocitos MHC-II+ CD11c+ colónicos, (E) las células IL-10+ CD45+ colónicas y (F) los esplenocitos IL-10+ CD45+ después del tratamiento con BT-11. Las diferencias estadísticamente significativas entre los grupos ($P<0,05$) se indican con un asterisco.

45 **Figura 18.** Efecto de la administración oral del BT-11 sobre las puntuaciones del índice de actividad de la enfermedad (DAI) en ratones IL-10-/- con colitis crónica. Puntuaciones de DAI en ratones sin IL-10 que desarrollaron colitis espontánea y tratados diariamente con vehículo solo o con 20, 40 y 80 mg de BT-11/kg de peso corporal ($n=10$). Las diferencias estadísticamente significativas entre los grupos ($P<0,05$) se indican con un asterisco.

50 **Figura 19.** Efecto de la administración oral del BT-11 sobre la puntuación de tejido macroscópico en un modelo crónico de colitis después del tratamiento con BT-11. Puntuaciones macroscópicas en (A) el bazo, (B) los ganglios linfáticos mesentéricos (MLN) y (C) el colon de ratones tratados con vehículo o BT-11 en tres concentraciones diferentes (20, 40 y 80 mg/kg). Las diferencias estadísticamente significativas entre los grupos ($P<0,05$) se indican con un asterisco.

55 **Figura 20.** Efecto de la administración oral del BT-11 sobre las lesiones histopatológicas del colon en el modelo IL-10-/- crónico de IBD. Las lesiones histopatológicas se evaluaron en base a (A) la infiltración leucocítica, (B) la erosión epitelial y (C) el engrosamiento de la mucosa. Las diferencias estadísticamente significativas entre los grupos ($P<0,05$) se indican con un asterisco.

60 **Figura 21.** Efecto de la administración oral del BT-11 en sub-conjuntos de células inmunes que infiltran la lámina propia del colon de IL-10-/- con colitis crónica. Se usó la citometría de flujo para analizar los niveles de (A) los macrófagos F4/80+, (B) las células dendríticas (DC) MHC-II+ CD11c+, (C) los linfocitos T reguladores CD4+ FOXP3+ y (D) las células T colaboradoras de tipo 1 (Th1) en el LP colónico después del tratamiento con BT-11. Las diferencias estadísticamente significativas entre los grupos ($P<0,05$) se indican con un asterisco.

65

Figura 22. Efecto de la administración oral del BT-11 sobre sub-conjuntos de células inmunes que infiltran el bazo y los ganglios linfáticos mesentéricos de IL-10^{-/-} con colitis crónica. Se usó la citometría de flujo para analizar los niveles de (A) las células T CD4⁺ RORgt⁺, (B) las células T CD4⁺ FOXP3⁺, (C) las células T reguladoras CD4⁺ CD45⁺ FOXP3⁺ y (D) las células T colaboradoras de tipo 1 (Th1) después del tratamiento con BT-11. Las diferencias estadísticamente significativas entre los grupos ($P < 0,05$) se indican con un asterisco.

Figura 23. Efecto del tratamiento oral con BT-11 sobre la expresión colónica de la LANCL2 y el TNF α . Se usó la expresión génica del colon para evaluar los niveles de (A) la LANCL2 y (B) el TNF α . Las diferencias estadísticamente significativas entre los grupos ($P < 0,05$) se indican con un asterisco.

Figura 24. Efecto de la administración oral del BT-11 sobre las puntuaciones del índice de actividad de la enfermedad en el vehículo respecto a los ratones tratados en un modelo de transferencia adoptiva de colitis crónica. Se trataron ratones RAG2^{-/-} con vehículo o BT-11 después de la transferencia intraperitoneal de 400.000 células T CD4⁺ vírgenes. Las diferencias estadísticamente significativas entre los grupos ($P < 0,05$) se indican con un asterisco.

Figura 25. Efecto de la administración oral del BT-11 sobre las puntuaciones del índice de actividad de la enfermedad en los ratones vehículo respecto a los tratados de tipo salvaje respecto a los transferidos LANCL2^{-/-} en un modelo de transferencia adoptiva de colitis crónica. Se trataron ratones RAG2^{-/-} con vehículo o BT-11 después de la transferencia intraperitoneal de 400.000 células T CD4⁺ vírgenes de donantes de tipo salvaje o de LANCL2^{-/-}. Las diferencias estadísticamente significativas entre los grupos ($P < 0,05$) se indican con un asterisco.

Figura 26. Efecto de la administración oral del BT-11 sobre la pérdida de peso en el modelo de IBD crónica de colitis inducida por CD4⁺. Se pesaron los ratones y se calculó el porcentaje de pérdida de peso. Las diferencias estadísticamente significativas entre los grupos ($P < 0,05$) se indican con un asterisco.

Figura 27. Efecto de la administración oral del BT-11 sobre la puntuación de tejido macroscópico en un modelo crónico de colitis inducida por células T CD4⁺ después del tratamiento con BT-11. Se muestran las puntuaciones macroscópicas en (A) el bazo, (B) los MLN, (C) el colon y (D) el íleon de ratones tratados con vehículo o BT-11 a 80 mg/kg. Las diferencias estadísticamente significativas entre los grupos ($P < 0,05$) se indican con un asterisco.

Figura 28. Efecto de la administración oral del BT-11 sobre la puntuación de tejido macroscópico en un modelo crónico de colitis inducida por células T CD4⁺ con ratones de tipo salvaje y LANCL2^{-/-} después del tratamiento con BT-11. Se muestran las puntuaciones macroscópicas en (A) el colon, (B) los MLN y (C) el bazo de ratones de tipo salvaje y LANCL2^{-/-} tratados con vehículo o BT-11 a 80 mg/kg. Las diferencias estadísticamente significativas entre los grupos ($P < 0,05$) se indican con un asterisco.

Figura 29. Efecto de la administración oral del BT-11 sobre la histopatología colónica e ileal en el vehículo respecto a los ratones tratados en un modelo de transferencia adoptiva de colitis crónica. Las lesiones histopatológicas en el colon (A, C, E) e íleon (B, D, F) se evaluaron en base a (A, B) la infiltración leucocítica, (C, D) la erosión epitelial y (E, F) el engrosamiento de la mucosa. Las diferencias estadísticamente significativas entre los grupos ($P < 0,05$) se indican con un asterisco.

Figura 30. Efecto de la administración oral del BT-11 sobre la histopatología colónica en el vehículo respecto a los ratones tratados transferidos con células T CD4⁺ de tipo salvaje o LANCL2^{-/-} en un modelo de transferencia adoptiva de colitis crónica. Las lesiones histopatológicas se evaluaron en base a (A) la infiltración leucocítica, (B) el engrosamiento de la mucosa, y (C) la erosión epitelial. Las diferencias estadísticamente significativas entre los grupos ($P < 0,05$) se indican con un asterisco.

Figura 31. Efecto de la administración oral del BT-11 sobre las puntuaciones del índice de actividad de la enfermedad en el vehículo respecto a los ratones tratados en un modelo de transferencia adoptiva de colitis crónica. Se usó la citometría de flujo para analizar los niveles de (A) macrófagos F4/80⁺ CD11b⁺, (B) células CD45⁺ IFN γ ⁺, (C) células T reguladoras CD4⁺ FOXP3⁺ y (D) células antiinflamatorias CD4⁺ IL-10⁺ después del tratamiento con BT-11. Las diferencias estadísticamente significativas entre los grupos ($P < 0,05$) se indican con un asterisco.

Figura 32. Efecto de la administración oral del BT-11 sobre las puntuaciones del índice de actividad de la enfermedad en el vehículo respecto a los ratones tratados en un modelo de transferencia adoptiva de colitis crónica. Se usó la citometría de flujo para analizar los niveles de (A) linfocitos T CD4⁺ FOXP3⁺, (B) linfocitos T CD4⁺ IL-10⁺, (C) linfocitos CD45⁺ IFN γ ⁺ en los MLN y (D) linfocitos T CD4⁺ FOXP3⁺, (E) células T CD4⁺ IL-10⁺, (F) células CD45⁺ IFN γ ⁺ en el bazo después del tratamiento con BT-11. Las diferencias estadísticamente significativas entre los grupos ($P < 0,05$) se indican con un asterisco.

Figura 33. Efecto de la administración oral del BT-11 sobre las puntuaciones del índice de actividad de la enfermedad en el vehículo respecto a los ratones tratados de tipo salvaje respecto a los ratones transferidos con PPAR γ ^{-/-} en un modelo de transferencia adoptiva de colitis crónica. Se trataron ratones RAG2^{-/-} con vehículo o BT-11 después de la transferencia intraperitoneal de 400.000 células T CD4⁺ vírgenes de donantes de tipo salvaje o PPAR γ ^{-/-}. (A) Se muestran las puntuaciones del índice de actividad de la enfermedad respecto al tiempo posterior a la transferencia.

Las lesiones histopatológicas en el colon se evaluaron en base a (B) la infiltración leucocítica, (C) el engrosamiento de la mucosa y (D) la erosión epitelial. Las diferencias estadísticamente significativas entre los grupos ($P < 0,05$) se indican con un asterisco.

5 **Figura 34.** Efecto de la administración oral del BT-11 sobre los niveles de insulina y glucosa en sangre en ayunas en ratones NOD con diabetes. (A) Los niveles de glucosa en ayunas se evaluaron en las semanas 0, 1, 3, 4, 5, 10 y 11 de tratamiento con vehículo o BT-11 (80 mg/kg/d). (B) Los niveles de insulina sérica en ayunas se evaluaron en la semana 5 de tratamiento con vehículo o BT-11 (80 mg/kg/d). Las diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$) se indican con un asterisco ($n=10$).

10 **Figura 35.** Efecto de la administración oral del BT-11 en la formación de lesiones en el páncreas de ratones diabéticos tipo 1. Las lesiones histopatológicas se evaluaron en base a la infiltración leucocítica, la formación de lesiones y la erosión tisular. Las diferencias estadísticamente significativas entre los grupos ($P < 0,05$) se indican con un asterisco.

15 **Figura 36.** Efecto de la administración oral del BT-11 sobre (A) los niveles de glucosa en sangre en ayunas y (B) la prueba de tolerancia a la glucosa. (A) Los ratones se mantuvieron en ayunas durante 12 horas y se evaluaron los niveles de glucosa en sangre en las semanas 2 y 12 después de la configuración del experimento. (B) Los ratones también se expusieron a una inyección de glucosa IP (2 g/kg) y se midió la glucosa. Las diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$) se indican con un asterisco.

20 **Figura 37.** Efecto de la administración oral del BT-11 sobre poblaciones pro-inflamatorias que se infiltran en el tejido adiposo blanco (WAT). El WAT se extirpó y se digirió y los resultados de inmunofenotipificación se evaluaron mediante citometría de flujo. Se muestran los niveles de (A) macrófagos infiltrantes y (B) células infiltrantes Ly6c^{alto} GR1+. Las diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$) se indican con un asterisco.

25 **Figura 38.** Efecto de la administración oral del BT-11 sobre la homeostasis de la glucosa en un modelo db/db de diabetes. (A) Se muestran las concentraciones de glucosa en sangre en ayunas (FBG) de ratones deficientes en el receptor de leptina (db/db) tratados con BT-11 o con vehículo en las semanas 1 y 3 después de la configuración del experimento. (B) Se muestran los niveles de glucosa en plasma después de la prueba de glucosa intraperitoneal (1 g/kg de peso corporal). La sangre se recogió antes (0), después de 15, 30, 60, 90, 120, 180, 220 y 265 minutos de la carga de glucosa. Las diferencias estadísticamente significativas entre los grupos ($P < 0,05$) se indican con un asterisco.

30 **Figura 39.** Efecto de la administración oral del BT-11 sobre la expresión de LANCL2, TNF α y MCP-1 en el tejido adiposo blanco (WAT) de ratones con obesidad inducida por la dieta. Se evaluó el análisis de la expresión génica de la LANCL2, el TNF α y la MCP-1 en comparación con los ratones no tratados. La línea en cero representa la línea basal de los ratones que recibieron solo vehículo.

35 **Figura 40.** Efecto de la administración oral del BT-11 sobre las puntuaciones clínicas y la morbilidad de ratones infectados con el virus de la influenza. Los ratones se infectaron con el virus de la influenza y se puntuaron clínicamente durante todo el experimento. Se anotaron las puntuaciones clínicas para (A) la actividad y (B) la apariencia física. (C) Se trazó el porcentaje de ratones que perdieron más del 15 % del peso corporal para mostrar los cambios en la morbilidad. Las diferencias estadísticamente significativas entre los grupos ($P < 0,05$) se indican con un asterisco.

40 Descripción detallada de la invención

45 **Definiciones Generales**

A menos que se indique de cualquier otra manera, las siguientes definiciones se usan en toda la presente solicitud:

50 **Análisis de varianza (ANOVA):** Proceso aritmético para dividir la variación general en conjuntos de datos en componentes específicos en base a las fuentes de variación. Se ha usado para determinar si las diferencias numéricas entre los grupos de tratamiento son estadísticamente significativas.

55 **Adipogénesis:** El proceso por el cual se generan nuevos adipocitos o células de almacenamiento de grasa.

Alelo: Uno de varios ADN viables que codifican el mismo gen.

Dieno conjugado: Una molécula que contiene dos enlaces dobles separados por un enlace sencillo.

60 **Ratones db/db:** Término usado para definir un tipo de ratón que carece de ambos alelos de una isoforma larga del receptor de leptina. Esta deficiencia resulta en una alta pre-disposición a desarrollar diabetes de tipo 2. Consulte los ejemplos más abajo para obtener más información sobre los ratones db/db.

65 **Enantiómero:** Isómero óptico; clasificación química de moléculas en base a su capacidad para rotar el plano de polarización en el sentido de las manecillas del reloj (+) o en contra de las manecillas del reloj (-).

Glucemia: Concentración de glucosa en sangre.

Hiperglucemia: Aumento de las concentraciones de glucosa en sangre más allá de los intervalos normales.

5 Hiperinsulinemia: Aumento de las concentraciones de insulina en sangre más allá de los intervalos normales.

Insulinemia: Concentración de insulina en sangre.

10 Resistencia a la insulina: Incapacidad de los tejidos para responder a la insulina y absorber glucosa de la sangre.

Sustancialmente puro: Tener una pureza de al menos 90 % en peso, preferentemente al menos 95 % en peso, tal como al menos 98 %, 99 % o aproximadamente 100 % en peso.

15 Diabetes de tipo 2 o diabetes mellitus no dependiente de insulina: Término que se refiere a un tipo común de diabetes causada por una falta de respuesta de las células a las acciones de la insulina. Si las células no responden a la insulina, no pueden absorber glucosa de la sangre, lo que produce glucotoxicidad. Adicionalmente, las células se ven privadas de la energía derivada de la oxidación de la glucosa.

20 IBD: La enfermedad inflamatoria intestinal (IBD) implica la inflamación crónica de todo o parte de su tracto digestivo. La IBD incluye principalmente la colitis ulcerosa y la enfermedad de Crohn. Ambas suelen implicar diarrea intensa, dolor, fatiga y pérdida de peso. La IBD puede ser debilitante y a veces conduce a complicaciones potencialmente mortales.

25 Colitis ulcerosa (UC): La UC es una IBD que causa inflamación y llagas (úlceras) de larga duración en el revestimiento más interno del intestino grueso (colon) y recto.

Enfermedad de Crohn: La enfermedad de Crohn es una IBD que causa inflamación del revestimiento de su tracto digestivo. En la enfermedad de Crohn, la inflamación a menudo se extiende profundamente a los tejidos afectados. La inflamación puede afectar diferentes áreas del tracto digestivo: el intestino grueso, el intestino delgado o ambos.

30 IL-10: La interleucina-10 (IL-10), también conocida como factor inhibidor de la síntesis de citocinas humanas (CSIF), es una citocina antiinflamatoria. En los seres humanos, la IL-10 se codifica por el gen IL10.

35 FOXP3: FOXP3 (forkhead box P3) también conocida como escurfina es una proteína que se involucra en las respuestas del sistema inmunológico. Un miembro de la familia de proteínas FOX, FOXP3 parece funcionar como un regulador maestro (factor de transcripción) en el desarrollo y función de las células T reguladoras.

40 TNF-alfa: El factor de necrosis tumoral (TNF, caquexina o caquectina, antes conocido como factor de necrosis tumoral alfa o TNF α) es una citocina que se involucra en la inflamación sistémica y es miembro de un grupo de citocinas que estimulan la reacción de fase aguda.

45 MCP1: Proteína 1 quimioatrayente de monocitos. Un término más antiguo para una citocina CC que es crítica para el desarrollo de lesiones ateroscleróticas, que se encuentra en células endoteliales, macrófagos y en células de músculo liso vascular de pacientes que se someten a procedimientos de derivación de arteria coronaria. El término oficialmente preferido es ahora ligando 2 de quimiocina (motivo C-C).

Interferón gamma: El interferón gamma es una citocina soluble dimerizada pro-inflamatoria que es el único miembro de la clase de interferones tipo II.

50 Diabetes de tipo 1: La diabetes de tipo 1, una vez conocida como diabetes juvenil o diabetes insulino-dependiente, es una afección crónica en la que el páncreas produce poca o ninguna insulina, una hormona necesaria para permitir que el azúcar (glucosa) ingrese a las células para producir energía.

55 Infiltración leucocítica: La infiltración de leucocitos se refiere al proceso de mover o infiltrar los leucocitos en el tejido lesionado para comenzar el proceso de reparación.

Definiciones químicas

60 El término "alquilo," por sí mismo o como parte de otro sustituyente, significa, a menos que se indique de cualquier otra manera, un radical hidrocarburo completamente saturado de cadena lineal, ramificada o cíclica, o sus combinaciones, y puede incluir radicales di y polivalentes, que tienen el número de átomos de carbono indicado (*por ejemplo*, C₁-C₁₀ significa de uno a diez carbonos, incluidos). Los ejemplos de grupos alquilo incluyen, sin limitación a, metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, t-butilo, isobutilo, sec-butilo, ciclohexilo, (ciclohexil)etilo, ciclopropilmetilo y los homólogos e isómeros de estos, por ejemplo, n-pentilo, n-hexilo, n-heptilo, n-octilo y similares. El término "alquilo", a menos que se indique de cualquier otra manera, incluye también los derivados de alquilo definidos con más detalle más abajo, como "heteroalquilo" y "cicloalquilo".

El término "alquenilo" significa un grupo alquilo como se definió anteriormente excepto que contiene uno o más dobles enlaces. Los ejemplos de grupos alquenilo incluyen vinilo, 2-propenilo, crotilo, 2-isopentenilo, 2-(butadienilo), 2,4-pentadienilo, 3-(1,4-pentadienilo), etcétera, y los homólogos e isómeros superiores.

5 El término "alquinilo" significa un grupo alquilo o alquenilo como se definió anteriormente excepto que contiene uno o más triples enlaces. Los ejemplos de grupos alquinilo incluyen etinilo, 1- y 3-propinilo, 3-butinilo, y similares, que incluyen los homólogos e isómeros superiores.

10 Los términos "alquileno", "alquenileno" y "alquinileno", solos o como parte de otro sustituyente, significan un radical divalente derivado de un grupo alquilo, alquenilo o alquinilo, respectivamente, como se ejemplifica por $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$.

15 Típicamente, los grupos alquilo, alquenilo, alquinilo, alquileno, alquenileno y alquinileno tendrán de 1 a 24 átomos de carbono. En la presente invención se prefieren los grupos que tienen 10 o menos átomos de carbono. El término "inferior" cuando se aplica a cualquiera de estos grupos, como en "alquilo inferior" o "alquileno inferior", designa un grupo que tiene 10 o menos átomos de carbono.

20 "Sustituido" se refiere a un grupo químico como se describe en la presente descripción que incluye además uno o más sustituyentes, tales como alquilo inferior, arilo, acilo, halógeno (por ejemplo, alquilhalos tales como CF_3), hidroxilo, amino, alcoxi, alquilamino, acilamino, tioamido, aciloxi, ariloxi, ariloxialquilo, mercapto, tia, aza, oxo, hidrocarburos cíclicos saturados e insaturados, heterociclos y similares. Estos grupos pueden unirse a cualquier carbono o sustituyente de los restos alquilo, alquenilo, alquinilo, alquileno, alquenileno y alquinileno. Adicionalmente, estos grupos pueden ser colgantes de, o integrales con, la cadena carbonada en sí misma.

25 El término "arilo" se usa en la presente descripción para referirse a un sustituyente aromático, que puede ser un solo anillo aromático o múltiples anillos aromáticos que se fusionan juntos, se enlazan covalentemente, o se enlazan a un grupo común tal como una porción diazo, metileno o etileno. El grupo de enlace común puede ser además un carbonilo como en la benzofenona. El(los) anillo(s) aromático(s) puede(n) incluir, por ejemplo fenilo, naftilo, bifenilo, difenilmetilo y benzofenona, entre otros. El término "arilo" abarca "arilalquilo" y "arilo sustituido". Para los grupos fenilo, el anillo arilo puede estar mono-, di-, tri-, tetra- o penta-sustituido. Los anillos más grandes pueden no sustituirse o tener uno o más sustituyentes.

35 "Arilo sustituido" se refiere a arilo como se acaba de describir que incluye uno o más grupos funcionales tales como alquilo inferior, acilo, halógeno, alquilhalo (*por ejemplo*, CF_3), hidroxilo, amino, alcoxi, alquilamino, acilamino, aciloxi, fenoxi, mercapto e hidrocarburos cíclicos tanto saturados como insaturados que están fusionados al anillo o anillos aromáticos, enlazados covalentemente o enlazados a un grupo común tal como una porción diazo, metileno o etileno. El grupo de enlace puede además ser un carbonilo tal como ciclohexil fenil cetona. El término "arilo sustituido" abarca "arilalquilo sustituido."

40 El término "halógeno" o "halo" se usa en la presente descripción para referirse a átomos de flúor, bromo, cloro y yodo.

El término "hidroxilo" se usa en la presente descripción para referirse al grupo $-\text{OH}$.

45 El término "amino" se usa para designar NRR' , en donde R y R' son independientemente

H, alquilo, alquenilo, alquinilo, arilo o análogos sustituidos de estos. "Amino" abarca "alquilamino", que denota aminas secundarias y terciarias, y "acilamino" que describe el grupo $\text{RC(O)NR}'$.

Administración

50 En el curso de los métodos de la presente invención, puede administrarse una cantidad terapéuticamente efectiva de los compuestos de la invención a un animal, que incluye mamíferos y seres humanos, de muchas formas. Mientras que en la modalidad preferida, los compuestos de la invención se administran por vía oral o parenteral, también se contemplan otras formas de administración tales como a través de compuestos médicos o aerosoles.

55 Para la administración oral, la cantidad efectiva de los compuestos puede administrarse, por ejemplo, en estado sólido, semisólido, líquido o gaseoso. Los ejemplos específicos incluyen comprimidos, cápsulas, polvos, gránulos, soluciones, suspensiones, jarabes y agentes elixires. Sin embargo, los compuestos no se limitan a estas formas.

60 Para formular los compuestos de la invención en comprimidos, cápsulas, polvos, gránulos, soluciones o suspensiones, el compuesto se mezcla preferentemente con un aglutinante, un agente desintegrante y/o un lubricante. Si es necesario, la composición resultante puede mezclarse con un diluyente, un tampón, un agente infiltrante, un conservante y/o un aroma, mediante el uso de métodos conocidos. Los ejemplos de aglutinante incluyen celulosa cristalina, derivados de celulosa, almidón de maíz, ciclodextrinas y gelatina. Los ejemplos de agente desintegrante incluyen almidón de maíz, almidón de patata y carboximetilcelulosa de sodio. Los ejemplos de lubricante incluyen talco

y estearato de magnesio. Además, también pueden usarse los aditivos que se han usado convencionalmente, tales como lactosa y manitol.

5 Para la administración parenteral, los compuestos de la presente invención pueden administrarse por vía rectal o por inyección. Para la administración rectal, puede usarse un supositorio. El supositorio puede prepararse al mezclar los compuestos de la presente invención con un excipiente farmacéuticamente adecuado que se funde a la temperatura corporal pero permanece sólido a temperatura ambiente. Los ejemplos incluyen pero no se limitan a manteca de cacao, cera de carbono y polietilenglicol. La composición resultante puede moldearse en cualquier forma deseada mediante el uso de los métodos conocidos en el campo.

10 Para la administración por inyección, los compuestos de la presente invención pueden inyectarse por vía hipodérmica, intracutánea, intravenosa o intramuscular. Los fármacos para dicha inyección pueden prepararse al disolver, suspender o emulsionar los compuestos de la invención en un solvente acuoso o no acuoso, tal como aceite vegetal, glicérido de ácido de resina sintética, éster de ácido graso superior o propilenglicol por un método conocido. Si se desea, también pueden añadirse aditivos tales como un agente solubilizante, un agente osmorregulador, un emulsionante, un estabilizador o un conservante, que se han usado convencionalmente. Aunque no es necesario, se prefiere que la composición sea estéril o esterilizada.

15 Para formular los compuestos de la invención en suspensiones, jarabes o elixires, puede usarse un solvente farmacéuticamente adecuado. Entre ellos se incluye el ejemplo no limitante del agua.

20 Los compuestos de la invención también pueden usarse junto con un compuesto adicional que tenga otra actividad farmacéuticamente adecuada para preparar un fármaco. Puede usarse un fármaco, que contiene un compuesto de la invención como compuesto independiente o como parte de una composición, en el tratamiento de sujetos que necesiten de estos.

25 Los compuestos de la invención también pueden administrarse en forma de aerosol o inhalante que se prepara al cargar los compuestos en forma de líquido o polvo fino, junto con un agente de pulverización gaseoso o líquido y, si es necesario, un agente auxiliar que se conoce como agente de inflado, en un contenedor no presurizado, como un contenedor de aerosol o un nebulizador. Puede usarse como agente de pulverización un gas presurizado de, por ejemplo, diclorofluorometano, propano o nitrógeno.

30 Los compuestos de la invención pueden administrarse a un animal, que incluye los mamíferos y los seres humanos, que necesiten de estos como una composición farmacéutica, como comprimidos, cápsulas, soluciones o emulsiones. La administración de otras formas de los compuestos que se describen en esta invención, que incluye pero no se limitan a ésteres de éstos, sales farmacéuticamente adecuadas de éstos, metabolitos de éstos, compuestos estructuralmente relacionados a éstos, análogos de éstos y sus combinaciones, en una dosis única o en una dosis múltiple, también se contemplan por la presente invención.

35 Los compuestos de la invención también pueden administrarse a un animal que necesite de éstos como aditivo nutricional, ya sea como alimento o como suplemento nutracéutico.

40 Los términos "prevenir", "tratar" o "mejorar" y los términos similares usados en la presente descripción, incluyen la profilaxis y el tratamiento total o parcial. Los términos también pueden incluir la reducción de síntomas, la mejora de los síntomas, la reducción de la gravedad de los síntomas, la reducción de la incidencia de la enfermedad o cualquier otro cambio en la condición del paciente que mejore el resultado terapéutico.

45 Los compuestos que se describen en esta invención se usan y/o administran preferentemente en forma de composición. Las composiciones adecuadas son, preferentemente, una composición farmacéutica, un producto alimenticio o un complemento alimenticio. Estas composiciones proporcionan una forma conveniente para suministrar los compuestos. Las composiciones de la invención pueden comprender un antioxidante en una cantidad efectiva para aumentar la estabilidad de los compuestos con respecto a la oxidación o solubilidad.

50 La cantidad de compuesto que se administra en el método de la invención o que se administra para usar la invención es cualquier cantidad adecuada. Es preferentemente de aproximadamente 0,0001 g a aproximadamente 20 g (con mayor preferencia de 0,01 g a 1 g, tal como de 0,05 g a 0,5 g) de compuesto por día. En consecuencia, pueden formularse composiciones adecuadas. Los expertos en la técnica de la dosificación de agentes biológicamente activos podrán desarrollar regímenes de dosificación particulares para diversos sujetos en base a parámetros conocidos y bien entendidos.

55 Una composición preferida de acuerdo con la invención es una composición farmacéutica, tal como en forma de comprimidos, píldoras, cápsulas, comprimidos oblongos, multiparticulados (que incluye los gránulos, las perlas, bolitas y partículas microencapsuladas), polvos, elixires, jarabes, suspensiones y soluciones. Las composiciones farmacéuticas comprenderán típicamente un diluyente o portador farmacéuticamente aceptable. Las composiciones farmacéuticas se adaptan preferentemente para la administración por vía parenteral u oral. Las composiciones administrables por vía oral pueden estar en forma sólida o líquida y pueden tomar la forma de comprimidos, polvos,

suspensiones y jarabes, entre otras cosas. Opcionalmente, las composiciones comprenden uno o más saborizantes y/o colorantes. En general, las composiciones terapéuticas y nutricionales pueden comprender cualquier sustancia que no interfiera significativamente con la acción de los compuestos sobre el sujeto.

5 Los portadores farmacéuticamente aceptables adecuados para usar en tales composiciones se conocen bien en la técnica farmacéutica. Las composiciones de la invención pueden contener 0,01-99 % en peso de los compuestos de la invención. Las composiciones de la invención se preparan generalmente en forma de unidades de dosis. Preferentemente, la unidad de dosis de los compuestos que se describen en la presente invención es de 1 mg a 1000 mg (con mayor preferencia de 50 mg a 500 mg). Los excipientes usados en la preparación de estas composiciones son los excipientes que se conocen en la técnica.

10 Otros ejemplos de formas de producto para la composición son complementos alimenticios, como en forma de gel suave o cápsula dura que comprende un material encapsulante seleccionado del grupo que consiste en gelatina, almidón, almidón modificado, derivados del almidón como glucosa, sacarosa, lactosa y fructosa. El material encapsulante puede contener opcionalmente agentes de reticulación o polimerización, estabilizantes, antioxidantes, agentes absorbentes de luz para proteger rellenos sensibles a la luz, conservantes y similares. Preferentemente, la unidad de dosis de compuestos en los complementos alimenticios es de 1 mg a 1000 mg (con mayor preferencia de 50 mg a 500 mg).

15 En general, el término portador puede usarse en toda esta solicitud para representar una composición con la que pueden mezclarse los compuestos que se describen, ya sea un portador farmacéutico, un producto alimenticio, un suplemento nutricional o un auxiliar dietético. Los materiales que se describen anteriormente pueden considerarse portadores a los efectos de la invención. En determinadas modalidades de la invención, el portador tiene poca o ninguna actividad biológica sobre los compuestos de la invención.

20 Dosis: Los métodos de la presente invención pueden comprender administrar una cantidad terapéuticamente efectiva del compuesto a un animal que necesite de éste. La cantidad efectiva del compuesto depende de la forma del compuesto que se administra, la duración de la administración, la vía de administración (por ejemplo, oral o parenteral), la edad del animal y el estado del animal, que incluye mamíferos y seres humanos.

25 Por ejemplo, una cantidad de un compuesto efectivo para tratar o prevenir la diabetes de tipo 2, la pre-diabetes, la diabetes de tipo 1, la intolerancia a la glucosa, la resistencia a la insulina, la colitis ulcerosa o la enfermedad de Crohn, o cualquier otra afección que se describe en la presente descripción en un animal puede oscilar entre 0,1-10.000 mg/kg/día. Una cantidad efectiva preferida de compuesto es de 1 a 5.000 mg/kg/día, siendo una dosis más preferida de 2 a 100 mg/kg/día. El límite superior de la cantidad efectiva a administrar no es crítico, ya que los compuestos son relativamente no tóxicos como demuestran nuestros datos de toxicología. La cantidad efectiva de compuesto es más efectiva para tratar o prevenir la colitis ulcerosa, la enfermedad de Crohn, la diabetes de tipo 2, la diabetes de tipo 1, la pre-diabetes, el síndrome metabólico, la intolerancia a la glucosa y la resistencia a la insulina de un animal cuando se administra a un animal durante períodos que varían de aproximadamente 7 a 100 días, con un período preferido de 15 a 50 días y un período más preferido de 30 a 42 días.

La cantidad de compuesto más efectiva para prevenir la sobre-activación del sistema inmunológico puede variar entre 0,1 y 500 mg/kg/día, con una dosis preferida de 1 a 150 mg/kg/día.

45 Cuando la cantidad efectiva del compuesto de la presente invención se administra en una composición nutricional, terapéutica, médica o veterinaria, la dosis preferida varía de aproximadamente 0,01 a 2,0 % en peso al producto alimenticio o nutracéutico.

50 En ciertas otras modalidades, la presente invención proporciona el uso de compuestos de unión a la LANCL2 y también compuestos estructuralmente relacionados, como un compuesto que se selecciona del grupo que consiste en el compuesto, ésteres de éste, sales farmacéuticamente adecuadas de éste o sus combinaciones en el tratamiento y prevención de la IBD y la inflamación del tracto gastrointestinal.

55 Adicionalmente, en general, la presente invención se refiere a la inhibición de la inflamación en el tracto GI, en donde los componentes relevantes incluyen el estómago, el intestino delgado, el intestino grueso y el recto. El efecto resulta de la exposición del compuesto a varios tipos de células del cuerpo que induce un efecto biológico. Las células pueden incluir las de tejidos del tracto GI, células inmunes (es decir, macrófagos, monocitos, linfocitos) o células epiteliales. En determinadas modalidades, la invención proporciona el tratamiento de sujetos con un compuesto de la invención, por ejemplo, como un suplemento dietético, para reducir o prevenir la inflamación relacionada con la enfermedad inflamatoria intestinal, ya sea la enfermedad de Crohn o la colitis ulcerosa. La presente invención también contempla la administración de los compuestos de la invención al tracto GI para suprimir la expresión de moléculas de adhesión celular en el intestino.

65 Cuando se practican, los métodos de la invención pueden por medio de la administración de los compuestos a un sujeto mediante cualquier vía de administración aceptable mediante el uso de cualquier forma aceptable, como se describe anteriormente, y al permitir que el cuerpo del sujeto distribuya los compuestos a la célula objetivo a través de

procesos naturales. Como se describió anteriormente, la administración igualmente puede ser mediante inyección directa en un sitio (*por ejemplo*, un órgano, un tejido) que contiene una célula objetivo (*es decir*, una célula a tratar).

5 Además, la administración puede seguir cualquier número de regímenes. Por tanto, puede comprender una sola dosis o dosificación del compuesto experimental, o múltiples dosis o dosificaciones durante un período de tiempo. En consecuencia, el tratamiento puede comprender repetir la etapa de administración una o más veces hasta que se logre el resultado deseado. En determinadas modalidades, el tratamiento puede continuar durante periodos de tiempo extendidos, tales como semanas, meses o años. Los expertos en la técnica son completamente capaces de desarrollar fácilmente regímenes de dosificación adecuados para individuos en base a parámetros que se conocen en la técnica.
10 Las cantidades de dosificación para los compuestos de la invención pueden usarse en los métodos de estas modalidades de la invención. Para el tratamiento de la IBD, la inflamación del tracto GI o la supresión de la expresión de moléculas de adhesión celular en el intestino, se prefiere que los compuestos se administren en cantidades de aproximadamente 1 mg/día a 9.000 mg/día.

15 La cantidad a administrar variará en dependencia del sujeto, la etapa de la enfermedad o trastorno, la edad del sujeto, la salud general del sujeto y varios otros parámetros que se conocen y se toman en consideración rutinariamente por los expertos en la técnica médica. Como cuestión general, se administrará una cantidad suficiente de compuesto para realizar un cambio detectable en la cantidad de inflamación en el tracto GI, que con la IBD a menudo se relaciona con la cantidad de dolor que experimenta un individuo. Con pacientes que actualmente no experimentan síntomas de IBD,
20 el cambio que uno podría buscar puede involucrar parámetros de células inmunes como la expresión de TNF α en células inmunes o el por ciento de células T reguladoras en la sangre. Las cantidades adecuadas se describen en la presente descripción, y los expertos en la técnica pueden identificar las cantidades adecuadas adicionales sin una experimentación excesiva o indebida, en base a las cantidades que se describen en la presente descripción.

25 En un aspecto, la invención proporciona un método para tratar o prevenir que un sujeto que padece IBD, o de cualquier otra manera individuos sanos, quizás con una pre-disposición genética a la enfermedad de Crohn o a la colitis ulcerosa, desarrolle la IBD. El método también puede implicar el tratamiento de personas con una forma remitiva de IBD. De acuerdo con la invención, el término "un sujeto que padece IBD" se usa para referirse a un sujeto (*por ejemplo*, animal, humano) que tiene una enfermedad o trastorno que muestra uno o más signos clínicos que son típicos de IBD. En general, el método de tratamiento o prevención de acuerdo con este aspecto de la invención comprende administrar al sujeto una cantidad de terapia compuesta que sea efectiva para tratar o prevenir uno o más síntomas o manifestaciones clínicas de la IBD, o para prevenir el desarrollo de dicho síntoma(s) o manifestación(es).

35 Por tanto, de acuerdo con los métodos de la invención, la invención puede proporcionar métodos de tratamiento de la IBD, la inflamación asociada con infección entérica y la inflamación asociada con enfermedades autoinmunitarias. Los métodos de tratamiento pueden ser métodos profilácticos. En determinadas modalidades, el método es un método para tratar la IBD, la inflamación asociada con la infección entérica y la inflamación asociada con las enfermedades autoinmunitarias. En otras modalidades, el método es un método para prevenir la IBD. En las modalidades, el método es un método para evitar que una forma remitiva de IBD se vuelva activa. En otras modalidades más, el método es un método para mejorar el estado de salud de un sujeto que padece de IBD, de inflamación asociada con infección entérica y de inflamación asociada con enfermedades autoinmunitarias. Los organismos que causan infecciones gastroentéricas incluyen pero no se limitan a: *Escherichia coli*, *Shigella*, *Salmonella*, los patógenos *Vibrios*, *Campylobacter jejuni*, *Yersina enterocolitica*, *Toxoplasma gondii*, *Entamoeba histolytica* y *Giardia lamblia*. En consecuencia, en ciertas modalidades, la invención proporciona un método para proteger la salud, los órganos y/o tejidos de un sujeto que padece de IBD, de inflamación asociada con infección entérica y de inflamación asociada con enfermedades autoinmunitarias o en riesgo de desarrollar la IBD, la inflamación asociada con infección y la inflamación entérica asociada con enfermedades autoinmunitarias.

50 En una modalidad de la invención, el método para tratar la IBD comprende tratar la IBD sin causar efectos secundarios discernibles, tales como un aumento de peso significativo, inmunosupresión sistémica, apariencia cushingoide, osteopenia/osteoporosis o pancreatitis que es común en los tratamientos disponibles actualmente para la IBD (*es decir*, corticosteroides, inhibidores del factor de necrosis tumoral alfa). *Es decir*, se ha encontrado que el método de tratamiento de acuerdo con la presente invención, que proporciona el efecto del tratamiento, al menos en parte, al afectar la expresión y/o activación de la LANC2 en algunas células, proporciona el efecto beneficioso sin causar una ganancia significativa de peso, *por ejemplo* por retención de fluidos, en el sujeto que está siendo tratado, en comparación con otros sujetos similares que no recibieron el tratamiento.

60 Como tal, los métodos de la presente invención pueden proporcionar métodos para reducir la inflamación. Los métodos pueden reducir la inflamación sistémicamente (*es decir*, en todo el cuerpo del sujeto) o localmente (*por ejemplo*, en el sitio de administración o en el sitio de las células inflamatorias, que incluye pero no se limita a, células T y macrófagos). Al tratar o prevenir la inflamación de acuerdo con los métodos de la presente invención, un efecto que puede observarse es la disminución del número de monocitos o macrófagos y linfocitos sanguíneos que se infiltran en el intestino. Otro puede ser el aumento de las poblaciones de células inmunitarias reguladoras, como las células T reguladoras CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺, o un aumento en las propiedades reguladoras de linfocitos o macrófagos (*por ejemplo*, un aumento de interleucina 4 (IL-4) o IL-10 o una disminución de TNF- α e IL-6). Otro puede ser la presencia disminuida de genes inflamatorios y/o moléculas de adhesión. Por tanto, los métodos también pueden considerarse

métodos para afectar o alterar la respuesta inmunitaria de un sujeto al que se administra la terapia con compuestos. El sujeto puede tener una enfermedad inflamatoria intestinal u otra afección en la que la inmunomodulación de las células T o la regulación negativa de las moléculas de adhesión celular es un resultado deseado.

- 5 La invención también proporciona métodos para tratar una enfermedad infecciosa con los compuestos que se describen en la presente descripción. Los ejemplos no limitantes de tales enfermedades infecciosas incluyen las infecciones virales, las infecciones bacterianas y las infecciones fúngicas.

10 Los ejemplos no limitativos de infecciones virales incluyen infecciones por virus de la familia adenoviridae, tales como adenovirus; virus de la familia herpesviridae tales como herpes simplex, de tipo 1, herpes simplex, de tipo 2, virus varicela-zoster, virus epstein-barr, citomegalovirus humano, herpesvirus humano y de tipo 8; virus de la familia papillomaviridae tales como el virus del papiloma humano; virus de la familia poliomaviridae tales como virus BK y virus JC; virus de la familia poxviridae como la viruela; virus de la familia hepadnaviridae tales como virus de la hepatitis B; virus de la familia parvoviridae tales como bocavirus humano y parvovirus B19; virus de la familia de los astroviridae
15 como el astrovirus humano; virus de la familia calciviridae tales como virus norwalk; virus de la familia picornaviridae tales como coxsackievirus, virus de la hepatitis A, poliovirus y rinovirus; virus de la familia coronaviridae tales como virus del síndrome respiratorio agudo; virus de la familia flaviviridae tales como virus de la hepatitis C, virus de la fiebre amarilla, virus del dengue y virus del Nilo Occidental, virus de la familia togaviridae tales como virus de la rubéola; virus de la familia de los hepeviridae como el virus de la hepatitis E; virus de la familia retroviridae tales como virus de inmunodeficiencia humana (VIH); virus de la familia de los ortomixoviridos como el virus de la influenza; virus de la familia arenaviridae tales como virus guaranito, virus junin, virus lassa, virus machupo y virus sabiá; virus de la familia bunyaviridae tales como el virus de la fiebre hemorrágica de Crimea-Congo; virus de la familia filoviridae tales como virus ébola y virus marburg; virus de la familia paramyxoviridae tales como virus del sarampión, virus de las paperas, virus de la parainfluenza, virus sincitial respiratorio, metapneumovirus humano, virus hendra y virus nipah; virus de la familia rhabdoviridae tales como virus de la rabia; virus no asignados como el virus de la hepatitis D; y virus de la familia de los reoviridae como rotavirus, orbivirus, coltivirus y virus banna, entre otros.

20 Los ejemplos no limitativos de infecciones bacterianas incluyen infecciones con las bacterias que se describen anteriormente, y las adicionales *Bacillus Anthracis*, *Bacillus cereus*, *Bordetella pertussis*, *Borrelia burgdorferi*, *Brucella abortus*, *Brucella canis*, *Brucella melitensis*, *Brucella suis* *Campylobacter jejuni* *Chlamydia pneumoniae*, *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydomphila psittaci*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium difficile*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium tetani*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Escherichia coli*, *Francisella tularensis*, *Haemophilus influenzae*, *Helicobacter pylori*, *Legionella pneumophila*, *Leptospira interrogans*, *Listeria monocytogenes*, *Mycobacterium leprae*, *Tuberculosis micobacteriana*, *Mycobacterium ulcerans*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Rickettsia rickettsii*, *Salmonella typhi*, *Salmonella typhimurium*, *Shigella sonnei*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Streptococcus agalactiae*, *steotococos neumonia*, *Streptococcus pyogenes*, *Treponema pallidum*, *Vibrio cholerae*, *Yersinia pestis*, *Yersinia enterocolitica*, *Yersinia pseudotuberculosis*, y otras especies de los géneros de los organismos que se mencionan anteriormente.

30 Los ejemplos no limitantes de infecciones fúngicas incluyen la infección por hongos del género *Aspergilo*, como *Aspergillus fumigatus*, que causan aspergilosis; hongos del género *Blastomyces*, como *Blastomyces dermatitidis*, que causan blastomicosis; hongos del género *Candida*, como *Candida albicans*, que causan candidiasis; hongos del género *Coccidioides*, que causan coccidioidomicosis (fiebre del valle); hongos del género *Cryptococcus*, como
35 *Cryptococcus neoformans* y *Cryptococcus gattii*, que causan criptococosis; hongos dermatofitos, que causan la tiña; hongos que causan queratitis fúngica, como las especies *Fusarium*, las especies *Aspergilo*, y las especies *Candida*; hongos del género *Histoplasma*, como *Histoplasma capsulatum*, que causan histoplasmosis; hongos del orden Mucorales, que causan mucormicosis; hongos del género *Saccharomyces*, como *Saccharomyces cerevisiae*; hongos del género *Pneumocystis*, como *Pneumocystis jirovecii*, que causan neumonía por pneumocystis; y hongos del género *Sporothrix*, como *Sporothrix schenckii*, que causan esporotricosis.

40 La invención también proporciona métodos para tratar una enfermedad inflamatoria autoinmunitaria con los compuestos que se describen en la presente descripción. Los ejemplos no limitantes de enfermedades inflamatorias autoinmunitarias incluyen la enfermedad inflamatoria intestinal (IBD), el lupus sistémico, la artritis reumatoide, la diabetes de tipo 1, psoriasis y la esclerosis múltiple, entre otras.

45 La invención también proporciona métodos para tratar enfermedades inflamatorias crónicas con los compuestos que se describen en la presente descripción. Los ejemplos no limitantes de enfermedades inflamatorias crónicas incluyen el síndrome metabólico, la obesidad, la pre-diabetes, la enfermedad cardiovascular y la diabetes de tipo 2, entre otros.

50 La invención también proporciona métodos para tratar la diabetes con los compuestos que se describen en la presente descripción, que incluyen la diabetes de tipo 1, la diabetes de tipo 2 y otros tipos de diabetes. El término "diabetes" o "diabetes mellitus" se usan para abarcar trastornos metabólicos en los que un sujeto tiene niveles elevados de azúcar en sangre (es decir, hiperglucemia). Las condiciones hiperglucémicas tienen diversas etiologías, como que el páncreas no produce suficiente insulina o las células no responden a la insulina que se produce. Hay varios sub-tipos reconocidos de diabetes. La diabetes de tipo 1 se caracteriza por el fracaso total del cuerpo para producir insulina o

el fracaso del cuerpo para producir suficiente insulina. La diabetes de tipo 2 generalmente es el resultado de la resistencia a la insulina, una afección en la que las células no usan la insulina correctamente. La diabetes de tipo 2 a veces se presenta junto con una deficiencia de insulina. La diabetes gestacional ocurre cuando las mujeres embarazadas sin un diagnóstico previo de diabetes desarrollan hiperglucemia. Las formas menos comunes de diabetes incluyen la diabetes congénita (debido a defectos genéticos con relación a la secreción de insulina), la diabetes relacionada con la fibrosis quística, la diabetes esteroidea inducida por dosis altas de glucocorticoides y varias formas de diabetes monogénica (que incluye la diabetes de madurez en los jóvenes). La diabetes monogénica abarca varias formas hereditarias de diabetes causadas por mutaciones en un solo gen autosómico dominante (en contraste con etiologías poligénicas más complejas que dan como resultado hiperglucemia).

En vista de los métodos anteriores, debería ser evidente que la presente invención proporciona una terapia con compuestos de unión a la LANCL2 para usar en células en contacto, como en el tratamiento de células de un sujeto. La discusión anterior se centra en el uso de los compuestos de la presente invención como parte de una composición para usar en lo que generalmente podría considerarse un entorno farmacéutico o médico.

Los compuestos que se describen en esta invención para el tratamiento de la IBD, la inflamación del tracto gastrointestinal y otras afecciones que se describen pueden formularse como una composición farmacéutica, nutricional, una composición alimentaria funcional o ayuda dietética, como se describe con mayor detalle anteriormente.

Los elementos y las etapas del método que se describen en la presente descripción pueden usarse en cualquier combinación, ya sea que se describan explícitamente o no.

Cualquier combinación de etapas de métodos o procesos como se usa en la presente descripción puede realizarse en cualquier orden, a menos que se especifique de cualquier otra manera o quede implícito claramente en el contexto en el cual se realiza la combinación referida.

Como se usa en la presente descripción, las formas singulares "un", "uno/una" y "el/la" incluyen los referentes plurales a menos que el contexto indique claramente de cualquier otra manera.

Los intervalos numéricos, como se usan en la presente descripción, pretenden incluir cada número y sub-conjunto de números contenidos dentro de ese intervalo, ya sea que se describa específicamente o no. Además, estos intervalos numéricos deben interpretarse como que proporciona un soporte para una reivindicación que se dirige a cualquier número o sub-conjunto de números en ese intervalo. Por ejemplo, una descripción de 1 a 10 debe interpretarse como que soporta un intervalo de 2 a 8, de 3 a 7, de 5 a 6, de 1 a 9, de 3,6 a 4,6, de 3,5 a 9,9, etcétera.

Se entiende que la invención no se limita a la construcción y arreglo particulares de las partes que se ilustran y describen en la presente descripción, sino que abarca tales formas modificadas de estos que entran dentro del alcance de las reivindicaciones.

EJEMPLOS DE MODELACIÓN MOLECULAR

Ejemplo 1: Modelación molecular de la unión del ligando a la LANCL2

Introducción

Los agonistas establecidos de la LANCL2 como el ácido abscísico (ABA) y NSC61610 ejercen una actividad antiinflamatoria en un amplio intervalo de modelos de enfermedades que van desde la IBD hasta la diabetes y la influenza. El valor de la LANCL2 como nuevo objetivo terapéutico merece un esfuerzo para descubrir y desarrollar una nueva clase de fármacos activos por vía oral para el tratamiento de enfermedades infecciosas, inmunomediadas y metabólicas crónicas. Como se analiza en el presente ejemplo, se desarrollaron agonistas de la LANCL2 adicionales a través del diseño racional de fármacos que combina iterativamente la modelación computacional y la validación experimental. El presente ejemplo muestra enfoques para aumentar el diseño racional de fármacos y los esfuerzos de la química medicinal para aumentar la solubilidad, aumentar la unión a la LANCL2, reducir el costo y comprender la proteína LANCL2 en sí.

Métodos

Estructura de la LANCL2. No existe estructura cristalina para la LANCL2. Por lo tanto, para comprender la estructura y función de la LANCL2, se realizó una modelación de homología de la LANCL2 humana mediante el uso de la estructura cristalina de la LANCL1 como molde. Se evaluó la calidad del modelo y se realizaron mejoras mediante procedimientos de minimización de energía. La modelación de homología predice la estructura 3D de una proteína mediante la identificación de sus proteínas homólogas de otros miembros de la familia de proteínas cuyas estructuras se han resuelto experimentalmente [52]. Cuando las proteínas tienen más del 35 % de identidad de secuencia, es probable que sean homólogas. La LANCL1 comparte un 54 % de identificación de secuencia con la LANCL2 [15].

Generación de compuestos y estructura de ligandos. Se generaron estructuras de agonistas de la LANCL2 (Figuras 1A y 1B). Las SMILES de estos agonistas se generaron mediante el uso del Traductor y Convertidor SMILES en línea de los NIH [53]. Simultáneamente, se generaron y descargaron archivos .pdb de las estructurales individuales. Las herramientas AutoDock se usaban para convertir los archivos pdb en los .pdbqt necesarios para la detección virtual.

Cribado virtual. El acoplamiento de los archivos derivados generados se realizó con las herramientas AutoDock. Se definió un espacio de búsqueda, que incluye el centro del cuadro de red y las dimensiones x, y, z. El acoplamiento se aplicó a toda la proteína objetivo, con una red que cubre toda la superficie de la proteína. La red era un cuboide regular (77,8 Å x 77,8 Å x 77,8 Å) con puntos de red separados por 0,608 Å. Esta red se centró en el medio de la proteína. Estas dimensiones y separación permitieron que la red cubriera toda la superficie de la LANCL2. El algoritmo genético se usó en la optimización global estocástica. Las herramientas AutoDock generaron cien conformaciones unidas para cada compuesto. Las 100 poses resultantes de cada derivado se agruparon con una tolerancia del grupo RMSD de 2,0 Å.

Análisis de los resultados de la detección virtual. La búsqueda de la mejor manera de encajar cada compuesto en la LANCL2 mediante el uso de las herramientas AutoDock Vina resultó en archivos de registro de acoplamiento que contenían registros de acoplamiento, que incluye la energía de unión de cada modo de unión previsto para todos los compuestos. Las energías de unión representan la suma de la energía intermolecular total, la energía interna total y la energía libre de torsión menos la energía del sistema libre. Los compuestos se clasificaron según el valor energético más negativo. La pose de energía de unión más baja en el primer grupo se consideró como la pose de acoplamiento más favorable. Una energía libre de unión más baja indica un sistema proteína-ligando más estable y una mayor afinidad entre proteína y ligando. Los compuestos ilustrativos se validan adicionalmente mediante pruebas in vitro y estudios preclínicos mediante el uso de modelos de ratón de enfermedades humanas.

Resultados

Resumen de acoplamiento del NSC61610. En la Figura 2 se muestra un histograma de los cinco grupos principales del NSC61610 con la energía de la posición de energía más baja. El NSC61610 tiene una afinidad muy alta por la 'hendidura central.' Los dos grupos principales, que representan el 7 % del total de recorridos, cada uno se dirige a este sitio. Debido a la tolerancia de dos angstrom, es probable que otros grupos se dirijan a este sitio. Los siguientes dos grupos se dirigen a un "sitio alostérico" cerca de la hélice azul aleatoria.

Resumen de acoplamiento de ABA. En la Figura 3 se muestra un histograma de los cinco grupos principales de ABA con la energía de la posición de energía más baja. El ABA tiene una afinidad moderada pero una especificidad muy alta por el sitio "alostérico" entre la hélice verde claro y la espiral aleatoria verde claro. El 29 % de los recorridos se dirigió a este grupo superior. El segundo grupo también se dirigió a este sitio. Debido a la tolerancia de dos angstrom, es probable que haya otro grupo directo a este sitio. El cuarto grupo parece estar en la "hendidura central". Esto deja abierta la cuestión del verdadero sitio terapéutico de ABA.

Resumen de acoplamiento del BT-11. En la Figura 4 se muestra un histograma de los cinco grupos principales del BT-11 con la energía de la posición de energía más baja. Los dos primeros grupos del BT-11 se dirigen a la 'hendidura central', pero representan solo el 2 % de los recorridos. Sin embargo, debido a la tolerancia de dos angstrom, es probable que otros grupos se dirijan directamente a este sitio. El BT-11 tiene una afinidad ligeramente menor por este sitio que el NSC61610 pero más que el ABA. El BT-11 ha demostrado eficacia terapéutica (véanse los ejemplos más abajo).

Resumen de acoplamiento del BT-6. En la Figura 5 se muestra un histograma de los cinco grupos principales del BT-6 con la energía de la posición de energía más baja. El BT-6 tiene la mayor afinidad de todos los compuestos acoplados. Los dos primeros, quizás tres, grupos se dirigen a la 'hendidura central.' Debido a la tolerancia de dos angstrom, es probable que otros grupos se dirijan a este sitio. El grupo 4 se dirige al sitio 'alostérico' a lo largo de la hélice aleatoria azul.

Resumen de acoplamiento del BT-15. En la Figura 6 se muestra un histograma de los cinco grupos principales del BT-15 con la energía de la posición de energía más baja. El BT-15 no tiene la afinidad de unión del NSC61610 o BT-11. Si bien parece dirigirse hacia la 'hendidura central', este efecto no parece ser tan pronunciado como el de NSC61610 o BT-11.

Resumen de acoplamiento del BT-ABA-5a. En la Figura 7 se muestra un histograma de los cinco grupos principales del BT-ABA-5a con la energía de la posición de energía más baja. La mayor afinidad del BT-ABA-5a se encuentra en un lugar no visto en ningún acoplamiento anterior examinado. Sin embargo, los grupos 2 y 3 representan la gran mayoría de los recorridos, con un 32 %. El grupo 2 se dirige a un sitio alostérico en la parte posterior derecha. El grupo 3 se dirige al sitio "alostérico" del ABA. El grupo 4 también se dirige a este sitio. Debido a la tolerancia de dos angstrom, es probable que otros grupos se dirijan a este sitio.

Discusión

Tanto el ABA como el NSC61610 ejercen efectos inmunomoduladores, antiinflamatorios y anti-diabéticos dependientes de la LANCL2; sin embargo, las predicciones computacionales sugieren que se unen en diferentes sitios de la LANCL2. Como era de esperar, los ligandos diseñados racionalmente se dirigen principalmente a los sitios de unión primarios del ABA y del NSC61610. Los compuestos BT-ABA son de menor tamaño y tienen grupos funcionales -COOH; tiene sentido intuitivo que se dirijan hacia un bolsillo de superficie hidrófila. Los compuestos BT son mucho más hidrófobos; por lo tanto, tiene sentido intuitivo que se dirijan a la hendidura central más hidrofóbica rodeada de hélices alfa.

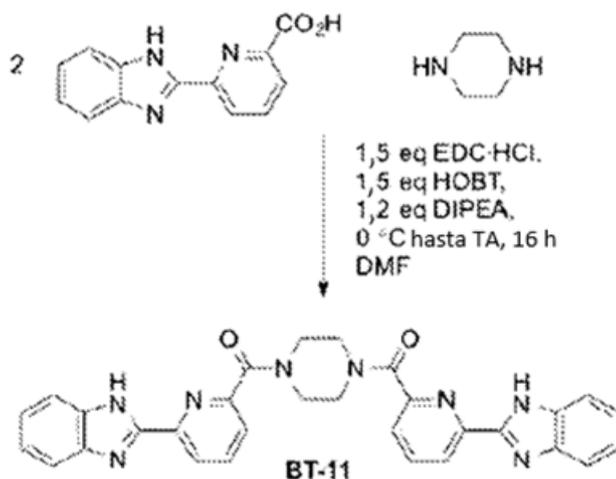
Las afinidades de unión tienen una correlación moderada con los datos de SPR (Figuras 1A y 1B; véanse los ejemplos más abajo). El dato SPR (con el valor de K_D) sugiere un orden de resistencia de unión del NSC61610 (2,3 y 6,3), BT-11 (6,3 y 7,7), BT-15 (11,4 y 21,4), BT-6 (18,2). Los datos de modelación (con el BE más bajo) sugieren un orden de resistencia de unión del BT-6 (-10,47), NSC61610 (-10,27), BT-11 (-9,39), BT-15 (-8,87). Además del cambio en BT-6 de peor a primero, los datos de SPR y los datos de modelación sugieren el mismo orden de resistencia de unión. Es probable que los datos de modelación molecular combinados con el diseño racional de fármacos produzcan una mejor comprensión de la proteína LANCL2, lo que permitirá un mayor desarrollo de análogos que se dirigen y activan la vía LANCL2 para explotar sus potentes propiedades anti-diabéticas y antiinflamatorias.

EJEMPLOS DE QUÍMICA MEDICINAL

Ejemplo 2: BT-11 y Sal

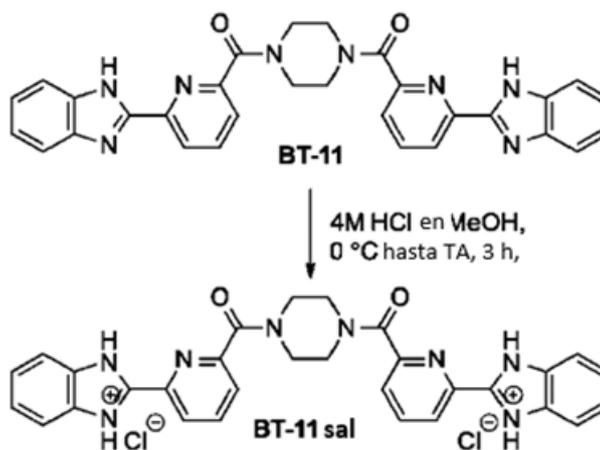
Como se muestra en el **Esquema 2-1**, una solución de ácido 6-(1*H*-bencimidazol-2-il) piridin-2-carboxílico (12 g) en DMF (100 ml) se enfrió a 0 °C, y después se añadió secuencialmente EDC•HCl (1,5 eq), HOBT (1,5 eq) y DIPEA (1,2 eq, tomados en volúmenes con densidad supuesta). La mezcla se agitó durante 10 min a 0 °C. Se añadió piperazina (0,5 eq) y la mezcla de reacción se dejó calentar a TA gradualmente y se agitó durante 16 h. Después de la terminación de la reacción (monitoreada por TLC, eluyente: MeOH al 10 % en DCM), la mezcla de reacción se vertió en agua helada (~300 ml), el sólido precipitado se filtró, se lavó con agua helada y se secó para obtener el BT-11 (10 g, 75 %) como un sólido marrón pálido. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 13,0 (s, 1H), 12,8 (s, 1H), 8,38 (dd, 2H), 8,13 (dt, 2H), 7,73 (dd, 2H), 7,67 (d, 2H), 7,57 (dd, 2H), 7,25 (m, 4H), 3,90 (bs, 2H), 3,80 (bdd, 2H), 3,65 (bdd, 2H), 3,56 (bs, 2H). LCMS-ES 529,44 [M+H]⁺, 265,46 [(M+2H)/2]⁺⁺.

Esquema 2-1



Como se muestra en el **Esquema 2-2**, una suspensión del BT-11 (1,0 eq) en una cantidad mínima de MeOH (5 mL) se enfrió a 0 °C, se añadió HCl metanólico 4M (exceso, 15 mL/1 g) gota a gota durante un período de 15-20 min. La mezcla se dejó calentar gradualmente a TA durante 3 h. Después de la terminación de la reacción (monitoreada por TLC, eluyente: MeOH al 10 % en CH₂Cl₂), los volátiles se evaporaron a presión reducida. El material crudo se lavó con MeOH al 10 % en CH₂Cl₂ y se liofilizó para obtener un sólido blanquecino (850 mg, 75 %). ¹NMR H (400 MHz, DMSO-*re*₆) δ 8,58 (dd, 2H), 8,29 (dt, 2H), 7,83 (m, 6H), 7,44 (bd, 4H), 3,91 (bs, 2H), 3,81 (bm, 2H), 3,64 (bm, 2H), 3,55 (sa, 2H). LCMS-ES 529,56 [M+H]⁺.

Esquema 2-2



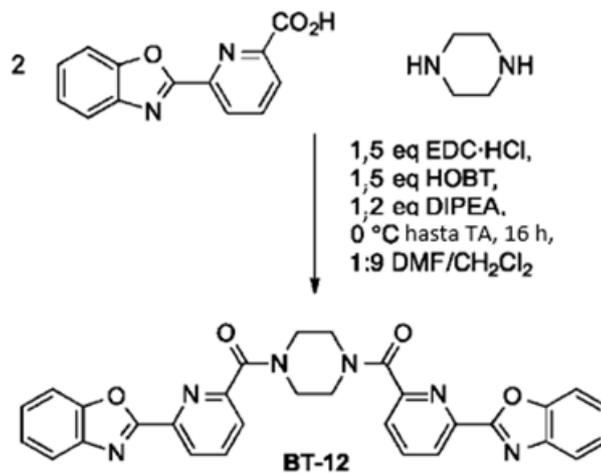
Ejemplo 3: BT-12

25

30

Como se muestra en el **Esquema 3-1**, una solución de ácido 6-(benzoxazol-2-il)piridin-2-carboxílico (4,05 g) en DMF al 10 % en CH₂Cl₂ se trató con EDC•HCl (1,5 eq), HOBT (1,5 eq) y DIPEA (1,2 eq, tomado en volúmenes con densidad supuesta) y 0,5 eq. de piperazina a 0 °C. La mezcla se dejó calentar a TA durante 16 h. Se formó un sólido marrón claro que se filtró en un embudo de vidrio sinterizado, se lavó con agua y se liofilizó para dar un sólido marrón claro (3,2 g). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃), δ 8,45 (dd, 2H), 8,05 (m, 2H), 7,9 (d, 2H), 7,8 (dd, 2H), 7,6 (dd, 2H), 7,4 (m, 2H), 7,35 (m, 2H), 4,0 (bm, 8H).

Esquema 3-1



Ejemplo 4: BT-14 y Sal

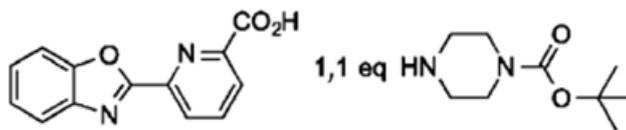
55

60

Como se muestra en el **Esquema 4-1**, se trató una solución de ácido 6-(benzoxazol-2-il)piridin-2-carboxílico (500 mg) en DMF (10 ml) con EDC•HCl (1,5 eq), HOBT (1,5 eq), DIPEA (3 eq) y piperazina-1-carboxilato de terc-butilo (1,1 eq) a 0 °C. La mezcla se dejó calentar a TA durante 16 h. Después de la evaporación del solvente, el residuo se extrajo en EtOAc y se lavó con agua. La capa orgánica se evaporó al vacío, el residuo bruto lavado con pentano dio un sólido marrón claro (120 mg, 48 %). ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆), δ 8,4 (d, 1H), 8,2 (t, 1H), 7,9 (t, 2H), 7,8 (d, 1H), 7,5 (dt, 2H), 3,7 (bm, 2H), 3,5 (bm, 4H), 3,4 (bm, 2H), 1,4 (s, 9H). LCMS-ES 409,49 [M+H]⁺, 431,37 [M+Na]⁺, 447,36 [M+K]⁺.

Esquema 4-1

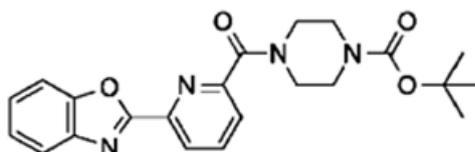
5



10

1,5 eq EDC·HCl,
1,5 eq HOBT,
3,0 eq DIPEA,
0 °C hasta TA, 16 h,
DMF

15



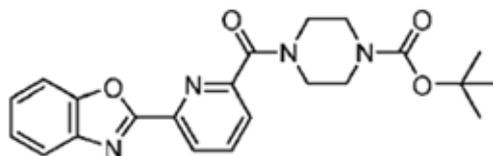
20

Como se muestra en el **Esquema 4-2**, el compuesto resultante del **Esquema 4-1** (200 mg) se trató con HCl metanólico (6 ml) a 0 °C. La mezcla se dejó calentar a TA durante 3 h. La evaporación del solvente y los lavados con pentano y éter dieron un sólido marrón claro (160 mg, cuant.). ¹NMR H (300 MHz, DMSO-*d*₆), δ 9,30 (bs, 2H), 8,45 (d, 1H), 8,25 (t, 1H), 7,9 (m, 3H), 7,5 (quin, 2H), 3,7 (bm, 2H), 3,5 (bm, 2H), 3,3 (m ancho, 4H), 1,4 (s, 9H). LCMS-ES 309,26 [M+H]⁺.

25

Esquema 4-2

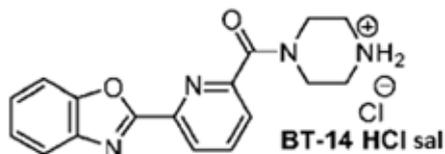
30



35

HCl en MeOH,
0 °C hasta TA, 3 h,

40



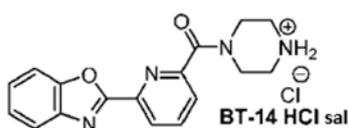
45

Como se muestra en el **Esquema 4-3**, la sal resultante (25 mg) del **Esquema 4-2** se neutralizó con satd. Se añadió NaHCO₃ seguido de secado en liofilizador para dar 20 mg/96 % de BT-14 en la mano. El rendimiento fue del 90 %. ¹NMR H (300 MHz, DMSO-*d*₆), δ 8,4 (d, 1H), 8,2 (t, 1H), 7,90 (t, 2H), 7,75 (d, 1H), 7,5 (quin, 2H), 3,95 (bm, 2H), 3,8 (bm, 2H), 3,3 (ancho, 2H), 3,2 (ancho, 2H); 309,37 LCMS-ES [M + H]⁺.

50

Esquema 4-3

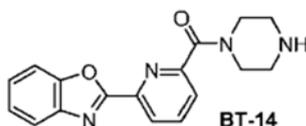
55



60

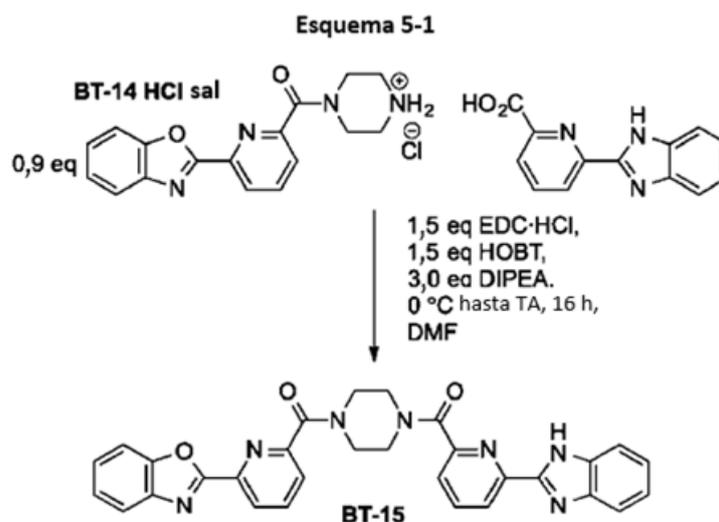
NaHCO₃ sat. ac. ↓

65



Ejemplo 5: BT-15

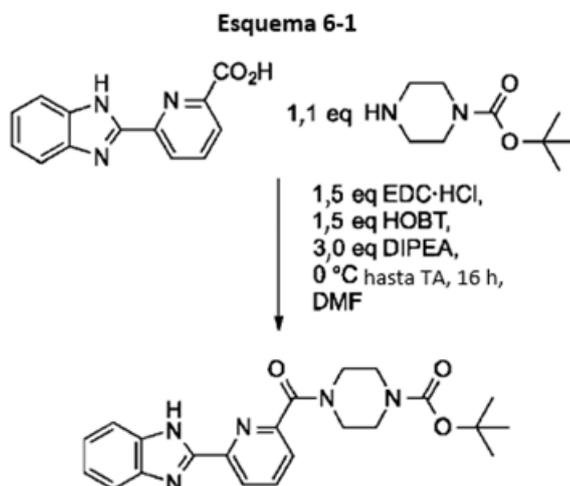
Como se muestra en el **Esquema 5-1**, 6-(1*H*-Benzimidazol-2-il) piridin-2-carboxílico (50 mg) en DMF (5 ml) se trató con EDC•HCl (1,5 eq), HOBT (1,5 eq), DIPEA (3 eq) y 0,9 eq. de sal BT-14 HCl a 0 °C. La mezcla se dejó calentar a TA durante 16 h. El filtrado sobre un embudo sinterizado seguido de lavado con agua y liofilización para eliminar la humedad dio 20 mg de BT-15. ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆), δ 12,93 (d, 1H), 8,44 (dd, 1H), 8,36 (t, 1H) 8,25 (t, 1H), 8,17 (m, 2H), 7,87 (m, 3H), 7,72 (m, 2H), 7,54 (m, 2H), 7,31 (m, 3H), 3,90 (s, 2H), 3,82 (bm, 2H), 3,67 (bm, 2H), 3,58 (bm, 2H). LCMS-ES 530,48 [M+H]⁺, 265,94 [(M+2H)/2]⁺⁺.



El BT-15 mostró su unión con la LANCL2 (**Figura 1A**). Su afinidad de unión predictiva a la LANCL2 es -9,9 y la afinidad confirmada por SPR tiene un valor de K_d de 21,4.

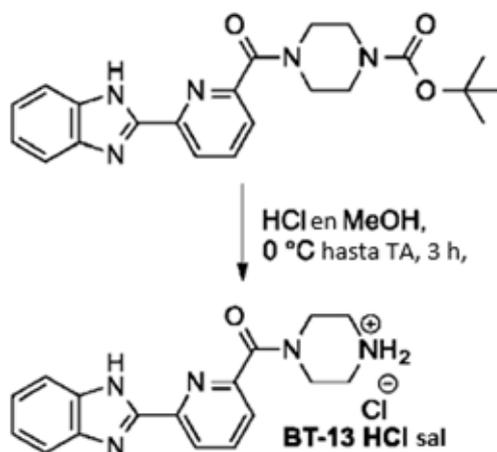
Ejemplo 6: Sal BT-13

Como se muestra en el **Esquema 6-1**, 6-(1*H*-Benzimidazol-2-il) piridina-2-carboxílico (500 mg) en DMF (10 ml) se trató con EDC•HCl (1,5 eq), HOBT (1,5 eq), DIPEA (3 eq) y terc-butil piperazina-1-carboxilato (1,1 eq) a 0 °C. La mezcla se dejó calentar a TA durante 16 h. Después de verter la mezcla de reacción en agua helada, el precipitado se filtró y se secó para dar un sólido marrón pálido (600 mg, 70 %). TLC (100 % acetato de etilo). Cumple con HNMR y LCMS. (Rendimiento: 70 %). ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆), δ 12,90 (s, 1H), 8,4 (d, 1H), 8,15 (t, 1H), 7,65 (td, 3H), 7,25 (quin, 2H), 3,7 (bm, 2H), 3,5 (bm, 2H), 3,3 (bm, 4H), 1,4 (s, 9H). LCMS-ES 408,35 [M+H]⁺.



Como se muestra en el **Esquema 6-2**, el compuesto resultante del **Esquema 6-1** (600 mg) se trató con HCl metanólico (6 ml) durante 3 h a 0 °C. La mezcla se dejó calentar gradualmente a TA durante 3 horas. La evaporación del exceso de HCl metanólico dio BT-13 HCl (500 mg) como un sólido marrón claro.

Esquema 6-2



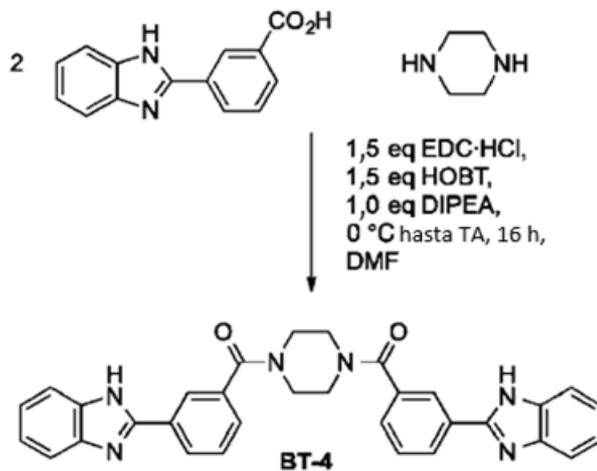
Ejemplo 7: BT-4 y Sal

25

30

Como se muestra en el **Esquema 7-1**, se trató ácido 3-(1H-benzimidazol-2-il) benzoico (100 mg) en DMF (6 ml) con EDC•HCl (1,5 eq), HOBT (1,5 eq), DIPEA (1 eq) y 0,5 eq. de piperazina a 0 °C. La mezcla se dejó calentar a TA durante 16 h. La TLC (metanol al 10 %: DCM) muestra la formación de una mancha no polar y la ausencia de material de partida. Después del tratamiento y los lavados con éter se aislaron 30 mg/95 % de BT-4. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆), δ 13,0 (s, 2H), 8,3 (bm, 4H), 7,75 (bm, 4H), 7,60 (bm, 4H), 7,2 (bm, 4H), 3,65 (bm, 8H). LCMS-ES 527,36 [M+H]⁺, 264,50 [(M+2H)/2]⁺⁺.

Esquema 7-1



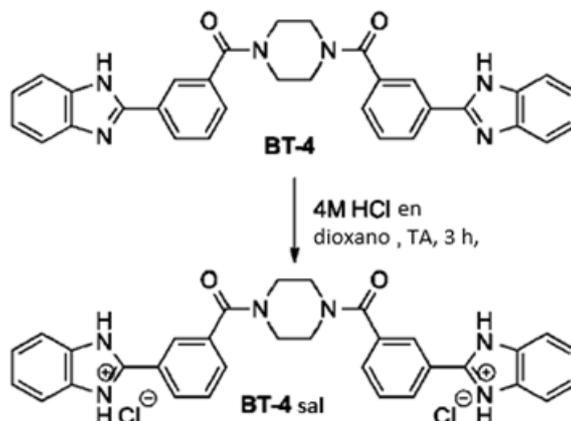
55

60

65

Como se muestra en el **Esquema 7-2**, se trataron 30 mg/95 % de BT-4 con HCl 4 M en dioxano durante 3 h. La evaporación del solvente y el lavado con éter dieron 10 mg/97 % de sal BT-4 HCl. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆), δ 8,45 (bm, 4H), 7,80 (bm, 8H), 7,50 (bm, 4H), 3,65 (bm, 8H). LCMS-ES 527,44 [M+H]⁺, 264,50 [(M+2H)/2]⁺⁺.

Esquema 7-2



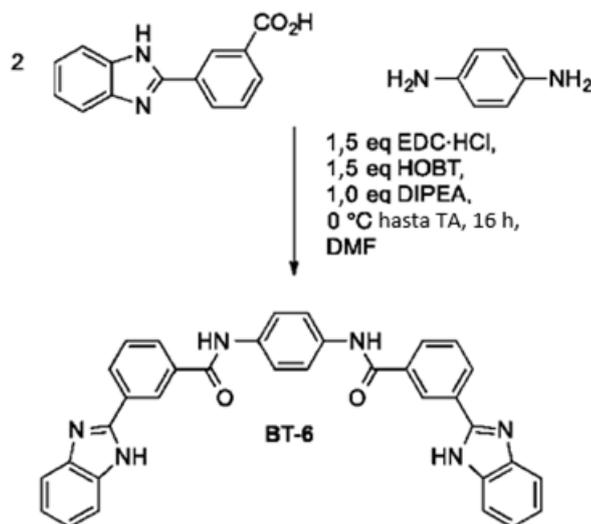
Ejemplo 8: BT-6 y Sal

20

25

Como se muestra en el **Esquema 8-1**, ácido 3-(1*H*-bencimidazol-2-il) benzoico (100 mg) en DMF (6 ml) se trató con EDC•HCl (1,5 eq), HOBT (1,5 eq), DIPEA (1 eq) y benceno-1,4-diamina (0,5 eq) a 0 °C. La mezcla se dejó calentar a TA durante 16 h. La TLC (metanol al 10 %: DCM) muestra la formación de una mancha no polar y la ausencia de material de partida. Después del tratamiento y los lavados con éter, se aisló un sólido marrón claro (60 mg). ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆), δ 13,1 (s, 2H), 10,45 (s, 2H), 8,75 (s, 2H), 8,40 (d, 2H), 8,05 (d, 2H), 7,85 (s, 4H), 7,70 (t, 4H), 7,55 (d, 2H) 7,25 (quin, 4H). LCMS-ES 549,0 [M+H]⁺ 275,1 [(M+2H)/2]⁺⁺.

Esquema 8-1



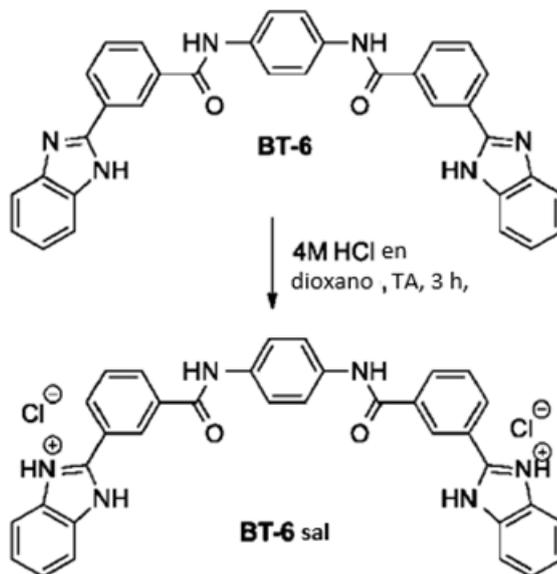
55

Como se muestra en el **Esquema 8-2**, se trataron 60 mg/98 % de BT-6 con HCl 4 M en dioxano durante 3 h. Después de la evaporación del solvente y el lavado con éter se obtuvieron 50 mg/96 % de sal BT-6 HCl. ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆), δ 10,60 (s, 2H), 9,00 (s, 2H), 8,55 (d, 2H), 8,30 (d, 2H), 7,90 (s, 4H), 7,85 m, 6H), 7,50 (m, 4H). LCMS-ES 549,3 [M+H]⁺ 275,3 [(M+2H)/2]⁺⁺.

60

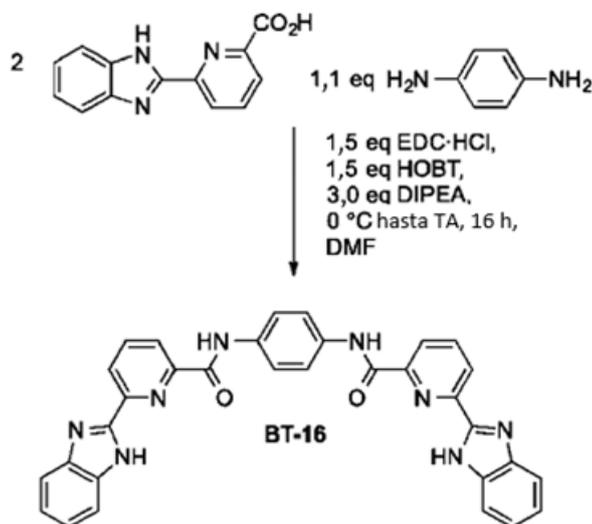
65

Esquema 8-2

**Ejemplo 9: BT-16 y Sal**

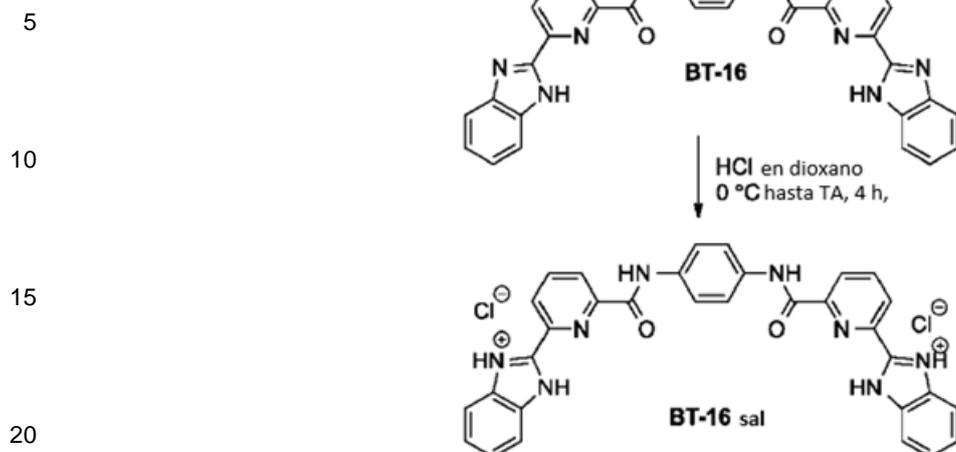
Como se muestra en el **Esquema 9-1**, se trató 6-(1H-benzimidazol-2-il) piridin-2-carboxílico (100 mg) en DMF (10 ml) con EDC·HCl (1,5 eq), HOBT (1,5 eq), DIPEA (3 eq), y benceno-1,4-diamina (0,5 eq) a 0 °C. La mezcla se dejó calentar a TA durante 16 h. Después de verter la mezcla de reacción en agua helada, el precipitado se filtró y se secó para dar un sólido marrón pálido (60 mg).

Esquema 9-1



Como se muestra en el **Esquema 9-2**, el compuesto BT-16 (50 mg) se trató con HCl en dioxano (3 ml) a 0 °C. La mezcla se dejó calentar a TA durante 4 h. La evaporación del dioxano HCl en exceso dio 30 mg de un sólido marrón (30 mg). ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆), δ 11,00 (s, 2H), 8,6 (bm, 2H), 8,35 (bm, 4H), 8,05 (s, 4H), 7,85 (bm, 4H), 7,40 (bm, 4H). LCMS-ES 551,84 [M+H]⁺.

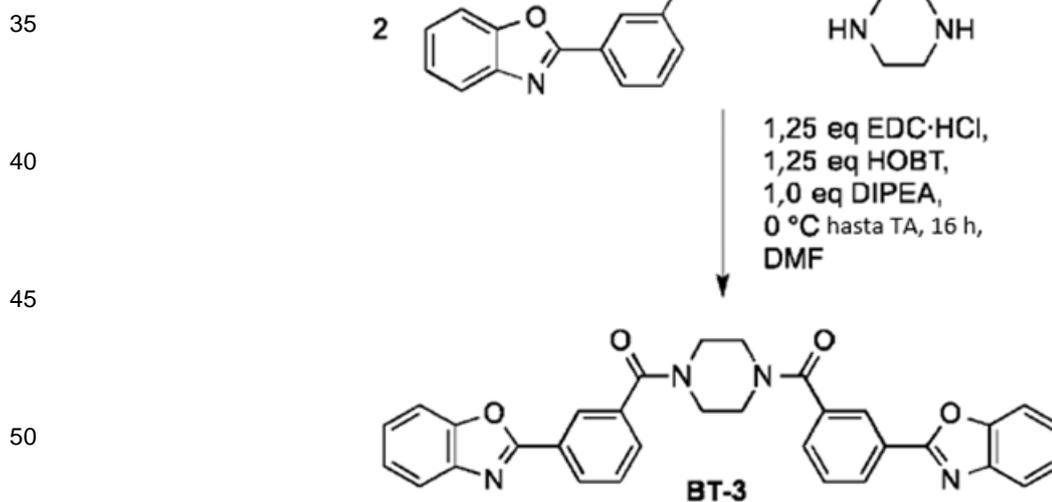
Esquema 9-2

**Ejemplo 10: BT-3 y Sal**

25 Como se muestra en el **Esquema 10-1**, se trató ácido 3-(2-benzoxazolil)benzoico (50 mg) en DMF (10 ml) con EDC•HCl (1,25 eq), HOBt (1,25 eq), DIPEA (1 eq) y piperazina (1 eq) a 0 °C. La mezcla se dejó calentar a TA durante 16 h. Después de diluir la mezcla de reacción con agua helada, se arrojó el sólido resultante, la filtración y el secado dieron 30 mg de BT-3. ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆), δ 8,2 (bm, 4H), 7,8 (bm, 4H), 7,7 (bm, 4H), 7,45 (bm, 4H), 3,6 (bm, 8H). LCMS-ES 529,32 [M+H]⁺.

30

Esquema 10-1



55 Como se muestra en el **Esquema 10-2**, el BT-3 (30 mg) se trató en HCl metanólico (5 ml) a 0 °C. La mezcla se dejó calentar a TA durante 4 h. Después de la evaporación del exceso de HCl metanólico al vacío, se formó un sólido marrón (15 mg).

60

65

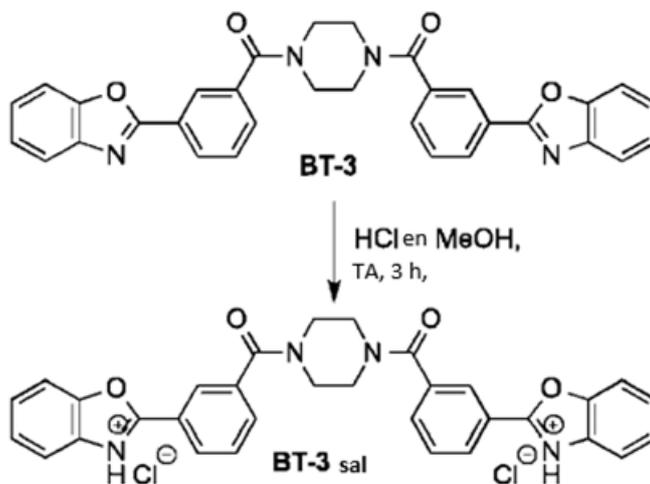
Esquema 10-2

5

10

15

20

**Ejemplo 11: BT-5 y Sal**

25

Como se muestra en el **Esquema 11-1**, se trató ácido 3-(2-benzoxazolil)benzoico (50 mg) en DMF (10 ml) con EDC•HCl (1,25 eq), HOBT (1,25 eq), DIPEA (1 eq) y benceno-1,4-diamina (0,5 eq) a 0 °C. La mezcla se dejó calentar a TA durante 16 h. La dilución de la mezcla de reacción con agua helada, la eliminación de los sólidos, la filtración y después el secado dio un sólido marrón claro (30 mg). ¹H NMR (300 MHz, TFA), δ 9,2 (bs, 2H), 8,8 (bm, 2H), 8,6 (bm, 2H), 7,9 (bm, 14H).

30

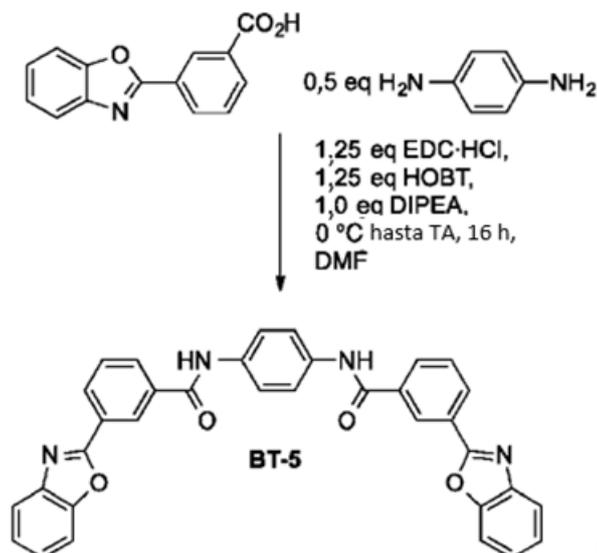
Esquema 11-1

35

40

45

50



55

Como se muestra en el **Esquema 11-2**, se trataron 35 mg de BT-5 en HCl dioxano (5 ml) a 0 °C. La mezcla se dejó calentar a TA durante 4 h. Después de la evaporación del dioxano en exceso al vacío, se formó un sólido marrón claro (15 mg). ¹H NMR (300 MHz, TFA), δ 9,3 (bs, 2H), 8,8 (bm, 2H), 8,6 (bm, 2H), 7,9 (bm, 14H).

60

65

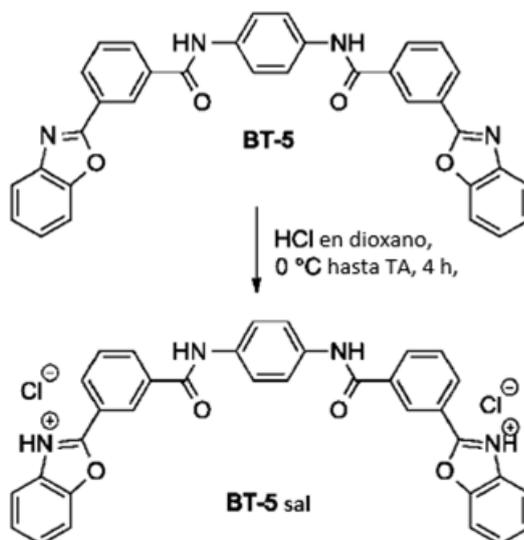
Esquema 11-2

5

10

15

20

**Ejemplo 12: BT-17 y Sal**

25

30

Como se muestra en el **Esquema 12-1**, se trató ácido 6-(benzoxazol-2-il)piridin-2-carboxílico (100 mg) en DMF (10 ml) con EDC•HCl (1,5 eq), HOBT (1,5 eq), DIPEA (1,2 eq) y benceno-1,4-diamina (0,5 eq) a 0 °C. La mezcla se dejó calentar a TA durante 16 h. La dilución de la mezcla de reacción con agua helada, la eliminación de los sólidos, la filtración y después el secado dio un sólido marrón claro (70 mg). ¹H NMR (400 MHz, TFA), δ 8,85 (dd, 4 H), 8,55 (t, 2 H), 8,1 (m ancho, 4 H), 7,95 (m, 4 H), 7,85 (s, 4 H). LCMS-ES 553,28 [M+H]⁺.

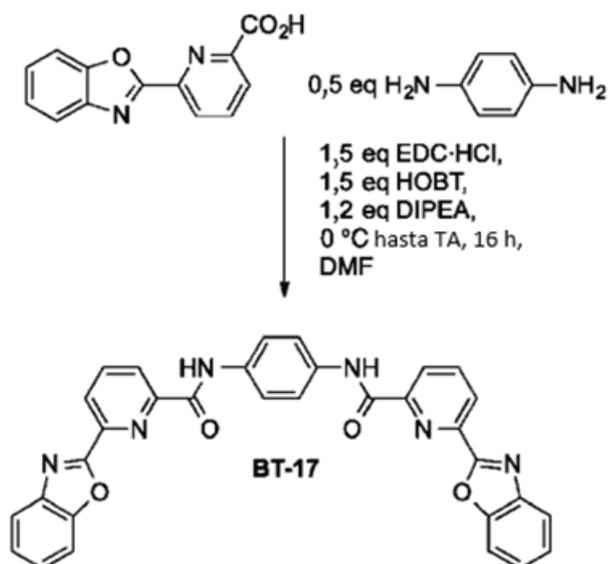
Esquema 12-1

35

40

45

50



55

Como se muestra en el **Esquema 12-2**, el BT-17 (60 mg) se trató en dioxano HCl (10 ml) a 0 °C a TA durante 4 h. Después de la evaporación del solvente mediante el uso de un liofilizador, se formó un sólido marrón claro (45 mg). ¹H NMR (400 MHz, TFA), δ 8,90 (bm, 4H), 8,6 (bm, 2H), 8,0 (bm, 10H).

60

65

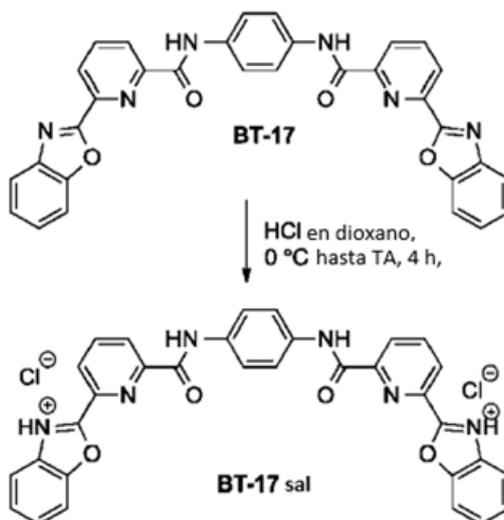
Esquema 12-2

5

10

15

20

**Ejemplo 13: BT-ABA-25**

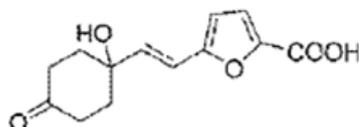
25

La estructura del BT-ABA-25 se muestra en el **Esquema 13-1**. El BT-ABA-25 es un ligando de la LANCL2 (**Figura 1B**). Su afinidad de unión predictiva a la LANCL2 es de $-7,5$ y la afinidad confirmada por SPR tiene un valor de K_d de $1,77e-04$.

30

Esquema 13-1

35

**Ejemplo 14: BT-ABA-5a**

40

45

Como se muestra en el **Esquema 14-1**, se desgasificó una solución de 8-vinil-1,4-dioxaspiro[4.5]decan-8-ol (200 mg, 1 eq) y 5-bromofuran-2-carboxilato de metilo (1,5 eq) en Et₃N (2 mL) con argón durante 10 min. Después, se añadieron Pd(OAc)₂ (0,025 eq), DPPF (0,05 eq) y se desgasificó de nuevo durante 10 min. La mezcla de reacción resultante se calentó a 100 °C durante 16 h. Se aisló un sólido de color pardo claro (130 mg) mediante cromatografía en columna (EtOAc/Hexano 3:7). ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆), δ 7,30 (d 1H), 6,60 (d 1H), 6,45 (dd, 2H), 4,75 (s, 1H), 3,85 (s, 4H), 3,80 (s, 3H), 1,85 (m, 2H), 1,65 (m, 2H), 1,50 (m, 4H), LCMS-ES 291,34 [M+H]⁺.

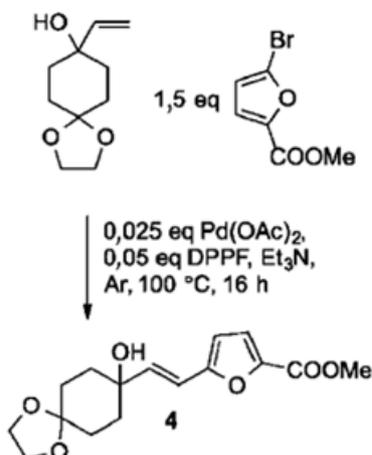
50

55

60

65

Esquema 14-1



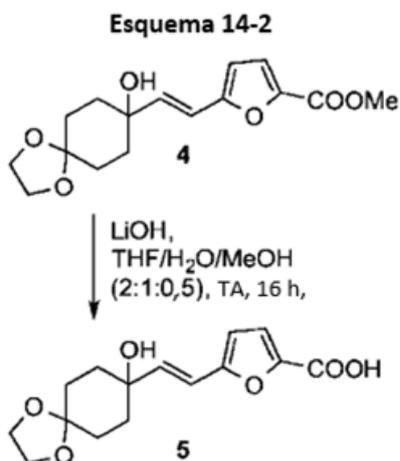
Como se muestra en el **Esquema 14-2**, se añadió LiOH (3 eq) a una solución de 100 mg del compuesto resultante en el **Esquema 14-1** (compuesto 4) en THF: H₂O: Et MeOH (2:1:0,5 mL) y la mezcla se agitó a TA durante 16 h. Después, la mezcla se concentró a presión reducida y el crudo se disolvió en una cantidad mínima de agua y se acidificó con HCl 2N hasta pH 4. Los compuestos se extrajeron con EtOAc y se concentraron para producir un sólido de color marrón claro (54 mg) que se usó para la siguiente reacción (**Esquema 14-3**) sin más purificación. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆), δ 7,50 (d 1H), 6,60 (d 1H), 6,45 (dd, 2H), 4,75 (s, 1H), 3,85 (s, 4H), 3,80 (s, 3H), 1,85 (m, 2H), 1,65 (m, 2H), 1,50 (m, 4H). LCMS-ES 277,26 [M+H]⁺.

10

15

20

25



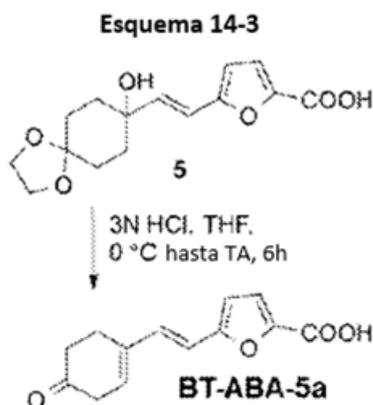
Como se muestra en el **Esquema 14-3**, se añadió HCl 3N, 0,1 ml al compuesto 5 (50 mg) en THF a 0 °C en agitador. La mezcla se dejó calentar hasta TA durante 6 h. La TLC muestra la ausencia de SM y una mancha no polar. La mezcla se concentró a presión reducida, se diluyó con agua, se extrajo con EtOAc y se volvió a concentrar para producir un sólido marrón (20 mg). ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆), δ 13,00 (bs 1H), 7,20 (d 1H), 6,95 (d 1H), 6,60 (d 1H), 6,45 (d, 1H), 6,10 (t, 1H), 3,05 (m, 2H), 2,65 (t, 2H), 2,5,(2H). LCMS-ES 233,21 [M+H]⁺ LCMS-ES 231,27 [MH]⁻ 463,15 [2M-H]⁻.

35

40

45

50



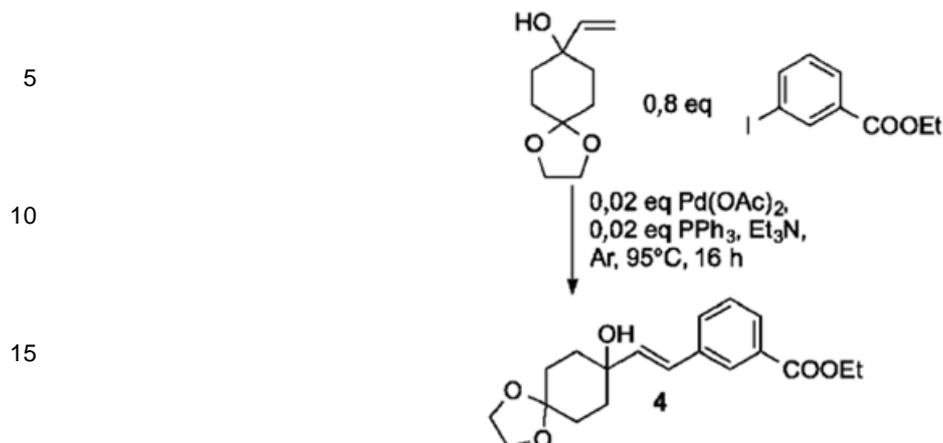
Ejemplo 15: BT-ABA-6

Como se muestra en el **Esquema 15-1**, una solución de 8-vinil-1,4-dioxaspiro [4,5]decan-8-ol (500 mg, 1 eq), 3-yodobenzoato de etilo (0,8 eq) y PPh₃ (0,02 eq) en Et₃N (8 mL) se desgasificó con argón durante 10 min. Después, se añadió Pd(OAc)₂ (0,02 eq.) y se desgasificó de nuevo durante 10 min. La mezcla de reacción resultante se calentó a 95 °C durante 16 h. Después del tratamiento, se aisló un sólido marrón pálido (500 mg) por cromatografía en columna (EtOAc/hexano 3:7). ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆), δ 7,95 (s 1H), 7,80 (d 1H), 7,71 (d 1H), 7,47 (t 1H), 6,65 (d 1H), 6,49 (d, 1H), 4,65 (bs 1H), 4,32 (q, 2H), 3,68 (s, 4H), 1,99-1,68 (m, 4H), 1,55-1,50 (m, 4H), 1,33 (t 3H). LCMS-ES 315,38 [M-17]⁺.

60

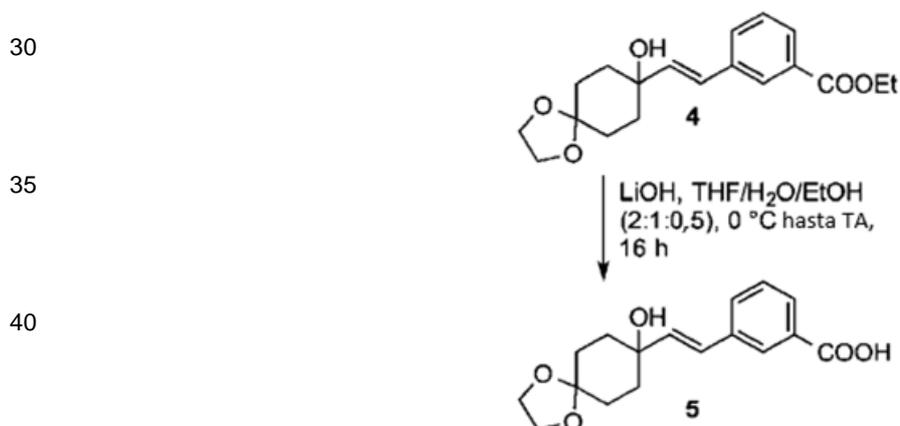
65

Esquema 15-1



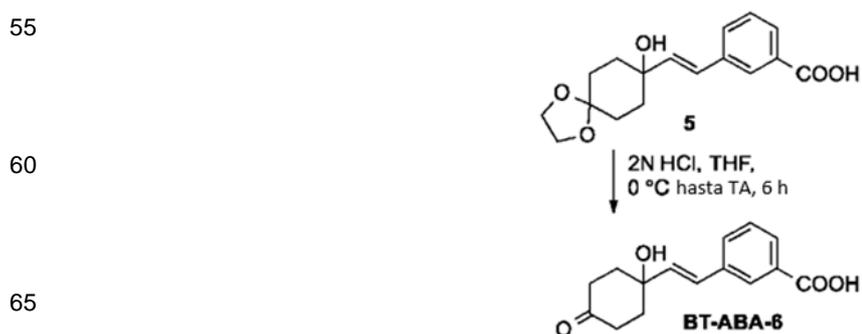
20 Como se muestra en el **Esquema 15-2**, una solución del compuesto 4 (500 mg) en THF/H₂O/EtOH (4:2:1, 17,5 ml) se
enfrió a 0 °C; se añadió LiOH (2,5 eq) y la mezcla se agitó mientras se elevaba a TA durante 16 h. La mezcla se
concentró a presión reducida y el crudo se disolvió en una cantidad mínima de agua y se acidificó con HCl 1N hasta
pH 3-4. La purificación por cromatografía en columna (EtOAc/hexano 1:1) dio un sólido amarillo pálido (220 mg). ¹H
NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆), δ 13,00 (bs 1H), 7,95 (s 1H), 7,78 (d 1H), 7,67 (d 1H), 7,44 (t 1H), 6,64 (d 1H), 6,48 (d,
25 1H), 4,65 (s 1H), 3,86 (s, 4H), 1,87-1,61 (m, 4H), 1,55-1,50 (m, 4H). LCMS-ES 287,34 [M-17]⁺.

Esquema 15-2



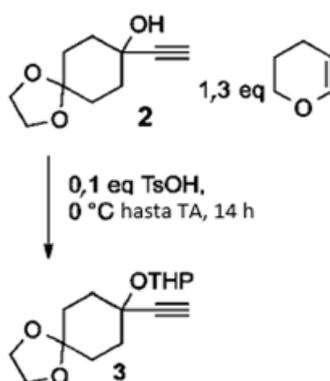
50 Como se muestra en el **Esquema 15-3**, se añadió HCl 2N (1,5 ml) a una mezcla de 100 mg del compuesto 5 (100 mg)
en THF a 0 °C en agitador. La mezcla se dejó calentar hasta TA durante 6 h. Después, la solución se concentró a
presión reducida, se diluyó con agua, se extrajo con EtOAc y se volvió a concentrar para obtener un sólido de color
amarillo pálido (20 mg). ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆), δ 13,00 (bs 1H), 8,00 (s, 1H), 7,80 (d 1H), 7,65 (d 1H), 7,45 (t
1H), 6,75 (d 1H), 6,45 (d, 1H), 6,10 (t, 1H), 5,15 (s 1H), 2,65 (m, 2H), 2,15 (m, 2H), 1,90 (m, 4H), LCMS-ES 259,37 [M-
H]⁻ 519,48 [2M-H]⁻.

Esquema 15-3

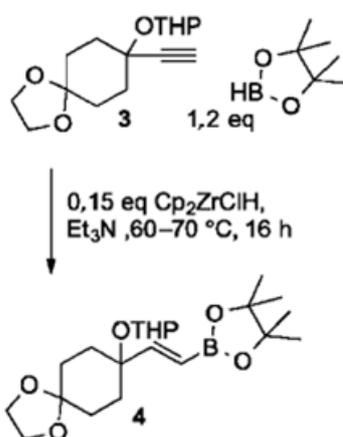


Ejemplo 16: BT-ABA-13

Como se muestra en el **Esquema 16-1**, se añadió dihidropirano (1,3 eq) y TsOH (0,1 eq) a una solución del compuesto 2 (2,5 g, 1 eq) en CH_2Cl_2 (50 mL) a 0°C en agitador. La solución resultante se dejó calentar gradualmente a TA durante 14 h. Se aisló un líquido de color amarillo pálido mediante cromatografía en columna (EtOAc/hexano 1:9). El compuesto se usó en la siguiente etapa sin purificación adicional.

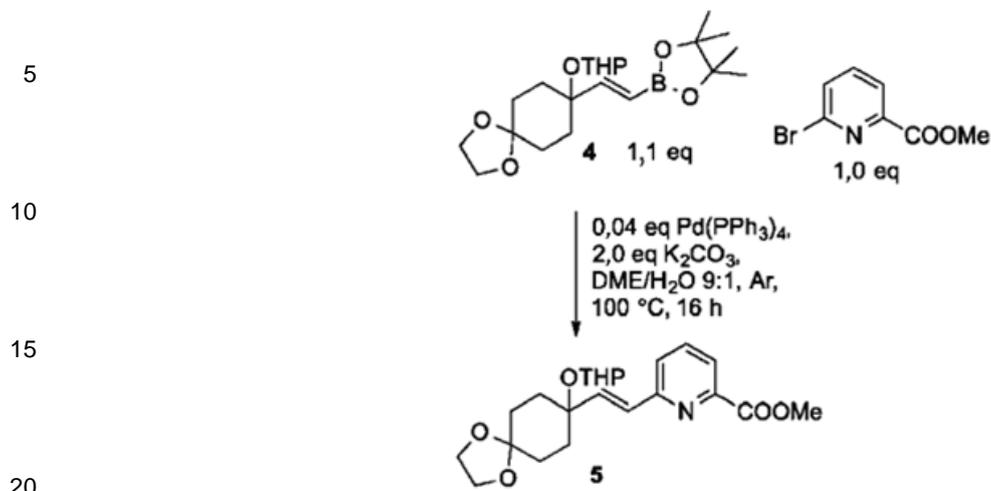
Esquema 16-1

Como se muestra en el **Esquema 16-2**, el compuesto 3 (2,5 g, 1,0 eq), 4,4,5,5-tetrametil-[1,3,2]dioxaborolano (1,2 eq) e hidruro de cloruro de bis(ciclopentadienil)circonio (0,15 eq) se añadieron a Et_3N . La mezcla de reacción resultante se calentó a $60\text{--}70^\circ\text{C}$ durante 16 h. La mezcla de reacción se diluyó con hexanos. El precipitado se eliminó mediante filtración sobre un lecho corto de gel de sílice y se lavó con hexanos. Al concentrar las soluciones de hexano, se obtuvo un líquido aceitoso incoloro (1,3 g). ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3), δ 6,60 (d 1H), 5,60 (d 1H), 6,35 (d, 1H), 4,75 (s, 1H), 3,85 (s, 3H), 2,80 (m, 2H), 2,35 (m, 2H), 2,05 (m, 4H).

Esquema 16-2

Como se muestra en el **Esquema 16-3**, una solución del compuesto 4 (550 mg, 1,1 eq), 6-bromopicolinato de metilo (1,0 eq), K_2CO_3 (2,0 eq) en mezcla de DME/ H_2O 9:1 (8 ml) se desgasificó con argón durante 10 min. Después, se añadió $\text{Pd}[(\text{P}(\text{Ph})_3)_4]$ (0,04 eq). La mezcla de reacción resultante se calentó a 100°C durante 16 h. La concentración de la solución de reacción seguida por cromatografía en columna (EtOAc/hexano 1:3) produjo un sólido amarillo pálido (230 mg). LCMS-ES 404,39 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 302,26 $[\text{M}-101]^+$.

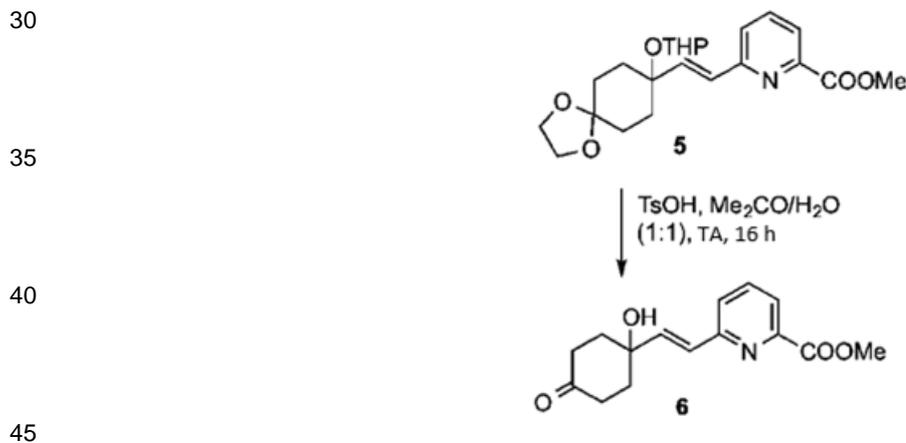
Esquema 16-4



25

Como se muestra en el **Esquema 16-5**, se añadió TsOH (0,1 eq) a una solución del compuesto 5 (230 mg, 1,0 eq) en acetona/H₂O 1:1 (6 ml). La mezcla de reacción resultante se agitó a temperatura ambiente durante 16 h. La concentración de la mezcla de reacción seguida de cromatografía en columna (EtOAc/hexano 7:3) dio un líquido amarillo pálido (110 mg). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃), δ 8,00 (d, 1H), 7,80 (t, 1H), 7,50 (d, 1H), 6,90 (m, 2H), 4,00 (s, 3H), 2,80 (m, 2H), 2,35 (m, 2H), 2,10 (m, 4H), LCMS-ES 276,38 [M+H]⁺.

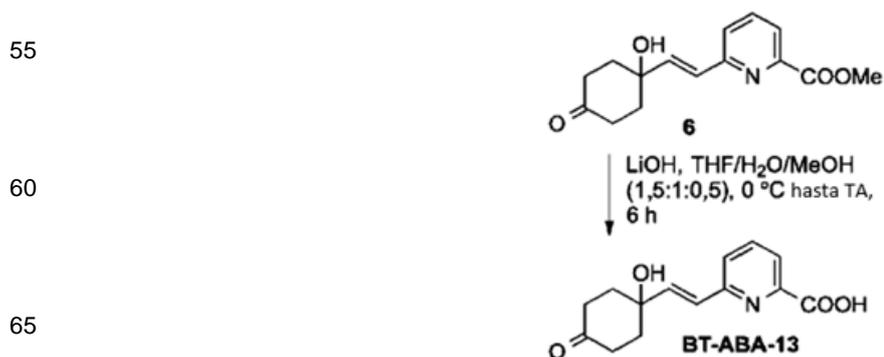
Esquema 16-5



50

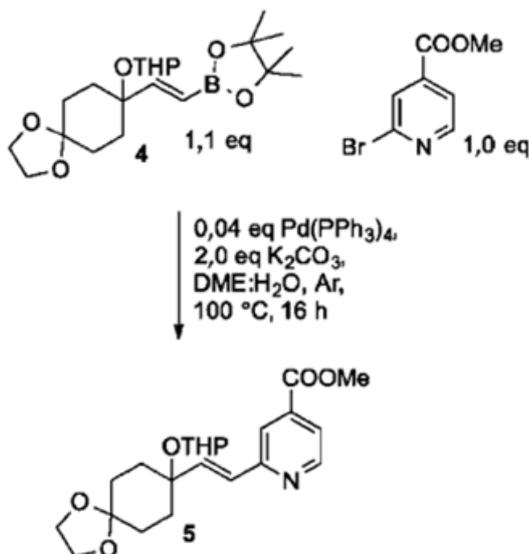
Como se muestra en el Esquema 16-6, se añadió LiOH (2,5 eq) a una solución del compuesto 6 (75 mg) en THF/H₂O 3:1 (3 mL) a 0 °C en agitador. La mezcla se dejó calentar hasta TA durante 6 h. La mezcla de reacción se acidificó con ácido cítrico y se extrajo con una mezcla de THF y EtOAc. La concentración de la solución orgánica dio un sólido blanquecino (10 mg). ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆), δ 13,05 (bs, 1H), 7,90 (m, 2H), 7,65 (d, 1H), 7,05 (d, 1H), 6,80 (d, 1H), 5,20 (s, 1H), 2,65 (m, 2H), 2,20 (bd, 2H), 2,10-1,90 (m, 4H), LCMS-ES 262,27 [M+H]⁺.

Esquema 16-6

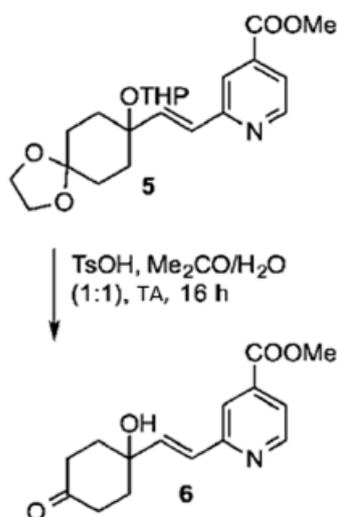


Ejemplo 17: BT-ABA-16

Como se muestra en el **Esquema 17-1**, una solución del compuesto 4 (437 mg, 1,2 eq), 2-bromoisonicotinato de metilo (1,0 eq), K_2CO_3 (2,0 eq) en mezcla de DME/ H_2O 9:1 (8 ml) se desgasificó con argón durante 10 min. Después, se añadió $Pd[(P(Ph)_3)_4]$ (0,04 eq). La mezcla de reacción resultante se calentó a $90\text{ }^\circ\text{C}$ durante 12 h. La concentración de la solución de reacción seguida de cromatografía en columna (EtOAc/hexano 1:3) produjo un líquido amarillo pálido (300 mg). 1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$), δ 8,70 (d, 1H), 7,85 (s, 1H), 7,65 (d, 1H), 6,85 (d, 1H), 6,65 (d, 1H), 4,70 (m, 1H), 3,95 (m, 4H), 2,20-1,40 (m, 16H), LCMS-ES 404,54 $[M+H]^+$, 302,53 $[M-101]^+$.

Esquema 17-1

Como se muestra en el esquema 17-2, se añadió TsOH (0,1 eq) a una solución de 5 (300 mg, 1,0 eq) en acetona/ H_2O 1:1 (6 ml). La mezcla de reacción resultante se agitó a TA durante 48 h. La concentración de la mezcla de reacción seguida de cromatografía en columna (EtOAc/hexano 7:3) dio un sólido blanquecino (160 mg). 1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6), δ 8,70 (d, 1H), 7,85 (s, 1H), 7,65 (d, 1H), 7,05 (d, 1H), 6,85 (d, 1H), 5,20 (s, 1H), 3,90 (s, 3H), 2,65 (td, 2H), 2,15 (bd, 2H), 2,00 (m, 2H), 1,85 (m, 2H), LCMS-ES 276,22 $[M+H]^+$.

Esquema 17-2

Como se muestra en el Esquema 17-3, se añadió LiOH (2,5 eq) a una solución del compuesto 6 (100 mg) en THF/ H_2O 3:1 (3 mL) a $0\text{ }^\circ\text{C}$ en agitador. La mezcla se dejó calentar hasta TA durante 16 h. La mezcla de reacción se acidificó con ácido cítrico y se extrajo con una mezcla de THF y EtOAc. La concentración a presión reducida dio un sólido blanquecino (20 mg). 1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6), δ 13,60 (bs, 1H), 8,70 (d, 1H), 7,85 (s, 1H), 7,60 (d, 1H), 7,00 (d, 1H), 6,85 (d, 1H), 5,20 (s, 1H), 2,65 (m, 2H), 2,20-1,80 (m, 6H), LCMS-ES 262,28 $[M+H]^+$.

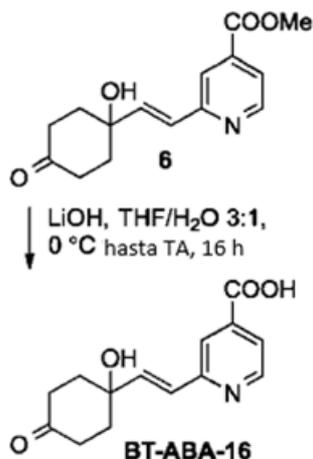
Esquema 17-3

5

10

15

20

**Ejemplo 18: BT-ABA-14**

25

Como se muestra en el Esquema 18-1, una solución del compuesto 4 (300 mg, 1,2 eq), 4-bromopicolinato de metilo (1,0 eq), K₂CO₃ (2,0 eq) en mezcla de DME/H₂O 9:1 (8 ml) se desgasificó con argón durante 10 min. Después, se añadió Pd[(P(Ph)₃)₄] (0,04 eq). La mezcla de reacción resultante se calentó a 90 °C durante 12 h. La concentración de la solución de reacción seguida de cromatografía en columna (EtOAc/hexano 1:3) produjo un líquido amarillo pálido (200 mg). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃), δ 8,50 (d, 1H), 8,20 (bs, 1H), 7,45 (d, 1H), 6,70 (d, 1H), 6,50 (d, 1H), 4,60 (m, 1H), 3,95 (m, 4H), 2,20-1,40 (m, 16H), LCMS-ES 390,35 [M+H]⁺.

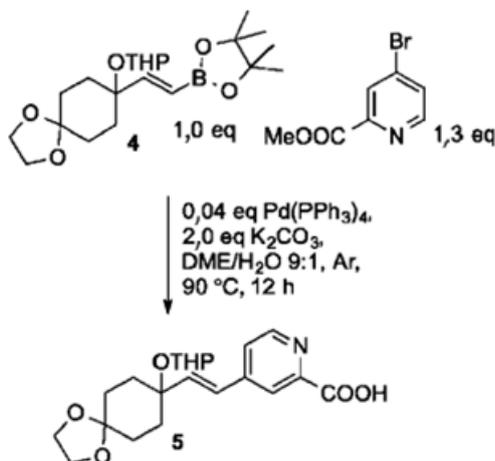
30

Esquema 18-1

35

40

45



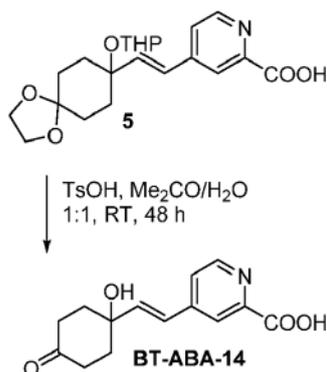
50

Como se muestra en el Esquema 18-2, se añadió TsOH (0,1 eq) a una solución de 5 (200 mg, 1,0 eq) en acetona/H₂O 1:1 (6 ml). La mezcla de reacción resultante se agitó a temperatura ambiente durante 48 h. La mezcla de reacción se acidificó con ácido cítrico y se extrajo con una mezcla de THF y EtOAc. La solución se concentró para dar un sólido blanquecino (18 mg). ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆), δ 8,60 (d, 1H), 8,05 (s, 1H), 7,60 (d, 1H), 6,90 (d, 1H), 6,70 (d, 1H), 5,20 (bs, 1H), 2,65 (m, 2H), 2,15 (bd, 2H), 2,05-1,80 (m, 4H), LCMS-ES 262,27 [M+H]⁺.

55

60

65



EJEMPLOS DE UNIÓN A RECEPTORES

Ejemplo 19: Ejemplo de unión a la LANCL2

20 Se combinaron estudios de modelación computacional y validación bioquímica para guiar la selección de compuestos que se unen a la LANCL2. Las últimas versiones de la tecnología de resonancia de plasmón de superficie (SPR) proporcionan medios cuantitativos, de alto rendimiento, *in vitro*, para determinar la interacción molecular entre proteínas sin marcaje y moléculas pequeñas (>25 Da) en tiempo real. La tecnología BIACORE™ T200 (GE Healthcare, Piscataway, NJ) proporciona un beneficio adicional de conformidad con las GMP/GLP y la adquisición autónoma de datos a gran escala, ya sea de valoraciones de cribado o detalladas en un período de menos de 24 horas. Las interacciones moleculares de interés se validan de forma rutinaria mediante la tecnología SPR BIACORE™ T200.

Métodos

30 *Cribado de alto rendimiento mediante modelación molecular de las interacciones compuestos-LANCL2.* El Auto-Doc Vina [14] es un paquete de software de última generación capaz de realizar cálculos paralelos de alto rendimiento para determinar la unión de compuestos botánicos a la LANCL2. El paquete de software primero calcula (i) las fuerzas de energía libre asociadas con el complejo unido y subsecuentemente (ii) el espacio conformacional disponible para la formación del complejo entre el objetivo y el ligando. Estos métodos son de naturaleza estocástica, por lo tanto, requieren cribados independientes repetidos para buscar exhaustivamente todos los espacios de parámetros y proporcionar confianza en las predicciones. Actualmente, el modelo de la LANCL2 está disponible a través de modelos de homología de la LANCL1 [15]. AutoDockTools, la interfaz gráfica de AutoDock y AutoGrid, se usó para definir el espacio de búsqueda, que incluye el centro de la red y las dimensiones x, y, z [16]. AutoDock Vina generó cinco conformaciones unidas para cada compuesto. El acoplamiento se aplicó a toda la proteína objetivo, con una red que cubre toda la superficie de la proteína. Se generaron archivos de registro de acoplamiento que consisten de energías de unión de cada modo de unión previsto para todos los compuestos para todas las superficies.

45 *Determinación cinética de la interacción LANCL2-molécula pequeña.* Se usó un BIACORE™ T200 para determinar los parámetros cinéticos para la unión de moléculas pequeñas BT-11, BT-ABA-5a, BT-6 y BT-15 (analitos) a la LANCL2 (ligando). Los datos se generaron por triplicado dependientes de la dosis (5-8 puntos de titulación) y se analizaron para determinar el modelo de unión (Langmuir, cambio conformacional, etc.), las constantes asociadas y de disociación en tiempo real y la constante de disociación en equilibrio. La tecnología SPR permitió la validación de las interacciones fitoquímicas específicas a la LANCL2, así como también obtener información estándar sobre el mecanismo y la velocidad de unión. Los experimentos se realizaron en chips sensores de carboximetildextrano (CM5) mediante su unión covalentemente a la LANCL2 mediante acoplamiento de amina. Las celdas de flujo 1 y 2 del chip sensor se activaron durante 720 segundos a 10 µl/min con una mezcla 1:1 de N-hidroxisuccinimida (NHS) 0,1 M y 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-clorhidrato de carbodiimida (EDC) 0,5 M. La reserva de la LANCL2 (0,41 mg/mL) se diluyó a 8,2 µg/mL (dilución 1:50) en acetato de sodio 10 mM, pH 5,0 y se inyectó sobre la superficie de la celda de flujo 2 activada durante 1000 segundos a un régimen de flujo de 10 µl/min. Después de la captura de la LANCL2 en la celda de flujo 2 (11000 RU), se desactivaron las superficies de las celdas de flujo 1 y 2 al inyectar etanolamina 1 M durante 720 segundos a 10 µl/min. El tampón de ejecución fue MOPS 25 mM que contiene T-20 al 0,05 % y NaCl 0,15 M, pH 6,5. Los estudios cinéticos se realizaron al inyectar diferentes concentraciones de BT-11 (25 µM, 12,5 µM, 6,25 µM, 3,13 µM, 1,56 µM y 0,76 µM), BT-ABA-5a (40 µM, 20 µM, 10 µM, 5 µM, 2,5 µM y 1,25 µM) y BT-15/BT-6 (20 µM, 10 µM, 5 µM, 2,5 µM, 1,25 µM, 0,625 µM y 0,313 µM) por triplicado. Cada muestra se inyectó durante 60 segundos (tiempo de contacto) seguido de un tiempo de disociación de 60 segundos a un régimen de flujo de 100 µl/min. Se usó un tiempo de estabilización de 180 segundos antes de la siguiente inyección. Los datos se analizaron con el software de evaluación BIACORE™ T200 (versión 1) para determinar la constante de unión por afinidad (KD) mediante el uso de un modelo de unión 1:1.

65 Resultados

Tanto el BT-11 como el BT-15 se unen fuertemente a la LANCL2. Para confirmar la unión del BT-11 y del BT-15 a la proteína LANCL2, realizamos un análisis SPR en un instrumento BIACORE™ T-200. La SPR, una técnica óptica que se usa para detectar interacciones moleculares, se usó para medir la afinidad de unión entre la LANCL2 y sus ligandos (es decir, el BT-11 y el BT-15). Inmovilizamos la proteína LANCL2 recombinante purificada en chips sensores BIACORE™ e inyectamos pequeñas moléculas sobre la superficie de la proteína mediante el uso del sistema de microfluidos del instrumento. Se midieron los cambios en la masa total en la superficie del chip, que corresponde a la pequeña unión a la proteína. Al inyectar una serie de concentraciones de moléculas pequeñas, pudimos calcular las afinidades de unión en estado estacionario para la unión del BT-11 a la LANCL2 y la unión del BT-15 a la LANCL2. Los sensorgramas de unión mostraron una interacción típica de proteína con molécula pequeña con velocidades de activación muy rápidas y velocidades de desactivación muy rápidas (Figura 8, paneles A y C). Estas interacciones rápidas están más allá de las capacidades técnicas del instrumento. Por lo tanto, la constante de velocidad de asociación confiable (k_a) y la constante de velocidad de disociación (k_d) no se determinaron. La constante de disociación de equilibrio (K_D) se usa comúnmente para describir la afinidad entre un ligando y una proteína, como la fuerza con la que un ligando se une a una proteína en particular. Las afinidades ligando-proteína están influenciadas por interacciones intermoleculares no covalentes entre las dos moléculas, tales como enlaces de hidrógeno, interacciones electrostáticas, fuerzas hidrófobas y de Van der Waals. Al graficar el nivel de unión en equilibrio respecto a la concentración del compuesto, pudimos medir la afinidad en estado estacionario (K_D) para cada interacción (Figura 8, paneles B y D). Ambas moléculas pequeñas mostraron una afinidad de unión similar por la LANCL2 (BT-11: 7,7 uM, BT-15 11,4 uM).

El BT-ABA-5a y el BT-6 se unen fuertemente a la LANCL2. De forma similar a los resultados que se describen anteriormente y con el fin de confirmar la unión del BT-6 y del BT-ABA-5a a la LANCL2, realizamos un análisis de SPR en un instrumento BIACORE™ T-200. En este caso también inmovilizamos la proteína LANCL2 recombinante purificada en chips sensores BIACORE™ e inyectamos pequeñas moléculas sobre la superficie de la proteína mediante el uso del sistema de microfluidos del instrumento. Se midieron los cambios en la masa total en la superficie del chip, que corresponde a la pequeña unión a la proteína. Al mirar más de cerca los sensorgramas de unión (Figuras 9A y 9B), nuestros resultados muestran cómo el BT-6 y el BT-ABA-5a son muy rápidos para unirse pero no tan rápidos como para separarse, en comparación con el BT-11/BT-15, que se unen y se separan muy rápido. Es de destacar que el tiempo de ocupación del BT-ABA-5a muestra la velocidad de separación más lenta, lo que significa que el BT-ABA-5a permanece más tiempo en el bolsillo de unión de la LANCL2. Esta unión más prolongada puede afectar potencialmente la activación de la vía LANCL2 al desencadenar respuestas antiinflamatorias y anti-diabéticas y otras respuestas terapéuticas más eficaces.

Se han probado otros compuestos a través de la SPR, y los resultados se muestran de manera comprensible en las Figuras 1A y 1B.

EJEMPLOS DE ESTUDIOS EXPERIMENTALES

Ejemplo 20: Uso del BT-11 en un modelo agudo de IBD

Introducción

La enfermedad inflamatoria intestinal (IBD), una enfermedad crónica y recurrente del tracto gastrointestinal, afecta a más de 1,4 millones de personas en los EE. UU. La IBD comprende dos manifestaciones diferentes: la colitis ulcerosa y la enfermedad de Crohn. Las terapias actuales contra la IBD tienen un éxito modesto y tienen efectos secundarios adversos importantes para el tratamiento a largo plazo de la enfermedad [17]. Mientras que la enfermedad de Crohn representa la etapa crónica de la enfermedad, la colitis ulcerosa aguda (UC) se manifiesta como una patología precoz que afecta el tejido colónico. La UC es un trastorno inflamatorio idiopático crónico del tracto GI que se caracteriza por una inflamación de la mucosa del recto que se extiende proximalmente a través del colon, de forma continua, pero en grado variable. El trastorno se caracteriza por un curso recurrente y remitente de gravedad variable. La mayoría de los pacientes presentan la enfermedad del lado izquierdo o distal de gravedad leve a moderada. La mayoría permanece en remisión durante largos períodos con terapia médica de mantenimiento. Sin embargo, los estudios de historia natural sugieren que entre el 10 y el 40 % se someterá a una colectomía en algún momento durante el curso de su enfermedad.

El tratamiento médico de la UC grave resistente a los esteroides se ha expandido algo en los últimos años con la disponibilidad de ciclosporina e infliximab como agentes de rescate; sin embargo, la cirugía sigue siendo la única opción "curativa". La presente invención proporciona un nuevo producto farmacéutico para el tratamiento de la UC al dirigirse a un nuevo receptor denominado LANCL2. El BT-11, nuestro principal compuesto líder, se administra por vía oral y se distribuye sistémicamente, y ejerce efectos inmunomoduladores en la UC al dirigirse a la LANCL2 en las células inmunitarias intestinales. Nuestros estudios pre-clínicos de eficacia en UC aguda en ratones mostraron cómo la administración con BT-11 reduce el índice de actividad de la enfermedad y mejora la inflamación intestinal al disminuir significativamente la infiltración leucocítica en la mucosa intestinal, así como también al disminuir el engrosamiento de la mucosa y la erosión epitelial. Los análisis de expresión génica confirmaron que la administración oral de BT-11 regula positivamente la expresión de IL-10 y LANCL2, y regula negativamente la expresión del ARNm de TNF α en un modelo de colitis ulcerosa aguda inducida por DSS en ratones.

Métodos

5 *Ratones.* Los C57BL/6 se adquirieron en el Laboratorio Jackson y se alojaron bajo condiciones específicas libres de patógenos en rejillas ventiladas. Los ratones LANCL2^{-/-} se compraron en el depósito KOMP de la Universidad de California Davis. Todos los ratones se mantuvieron en instalaciones para animales. Todos los protocolos experimentales se aprobaron por un comité institucional de cuidado y uso de animales y cumplieron o superaron las pautas de la política del Servicio de Salud Pública y Bienestar Animal de Laboratorio de los Institutos Nacionales de Salud.

10 *Colitis inducida por DSS.* Se indujo colitis en ratones C57BL/6J mediante la administración de 5 % (p/v) de sulfato de sodio dextrano (DSS; peso molecular 42 kDa; ICN Biochemicals, Aurora, OH) añadido al agua de bebida. Se evaluó la inflamación colónica 7 días después del tratamiento con DSS. Los grupos del proyecto DSS que consisten de i. ratones tratados con vehículo sin DSS, ii. ratones tratados con BT-11 (80 mg/kg) sin DSS, iii. ratones tratados con vehículo, tratados con DSS, y iv. ratones tratados con DSS, tratados con BT-11 (80 mg/kg). Se incluyeron doce ratones
15 en cada grupo.

20 *Histopatología.* Las secciones colónicas de los estudios de IBD en ratones se fijaron en formalina neutra tamponada al 10 %, después se incrustaron en parafina y después se seccionaron (5 µm) y se tiñeron con tinción H&E para el examen histológico. Los dos cólonos se clasificaron con una puntuación histológica compuesta que incluye la extensión de (1) la infiltración de leucocitos, (2) el engrosamiento de la mucosa y (3) la erosión de células epiteliales. Las secciones se clasificaron con una puntuación de 0-4 para cada una de las categorías anteriores, y los datos se analizaron como una puntuación compuesta normalizada.

25 *PCR cuantitativa en tiempo real.* El ARN total se aisló de los dos cólonos del ratón mediante el uso de un RNEASY PLUS MINI KIT (Qiagen, Valencia, CA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se usó el ARN total (1 µg) para generar un molde de ADNc mediante el uso de un kit de síntesis de ADNc ISCRIP™ (Bio-Rad, Hercules, CA). El volumen total de reacción fue de 20 µL, con la reacción incubada de la siguiente manera en un termociclador MJ MINI™ (Bio-Rad): 5 min a 25 °C, 30 min a 52 °C, 5 min a 85 °C y contener a 4 °C. La PCR se realizó en el ADNc mediante el uso de la ADN polimerasa Taq (Life Technologies, Carlsbad, CA). Cada amplicón de gen se purificó con
30 el kit de purificación MINELUTE PCR (Qiagen) y se cuantificó tanto en un gel de agarosa mediante el uso de un patrón de masa de ADN (Promega, Madison, WI) como con una nanogota. Estos amplicones purificados se usaron para optimizar las condiciones de la PCR en tiempo real y para generar curvas estándar en el ensayo de PCR en tiempo real. Los cebadores se diseñaron mediante el uso del software Oligo 6. Las concentraciones de cebadores y las temperaturas de alineamiento se optimizaron para el sistema ICYCLER IQ™ (Bio-Rad) para cada conjunto de
35 cebadores mediante el uso del protocolo de gradiente del sistema. Las eficiencias de la PCR se mantuvieron entre el 92 y 105 % y los coeficientes de correlación >0,98 para cada juego de cebadores durante la optimización y también durante la PCR en tiempo real de la muestra de ADN. Las concentraciones de ADNc para los genes de interés se examinaron mediante la qPCR en tiempo real mediante el uso de un sistema ICYCLER IQ™ y el IQ™ SYBR® Green Supermix (Bio-Rad). Se generó una curva estándar para cada gen mediante el uso de diluciones de 10 veces de
40 amplicones purificados al comenzar con 5 pg de ADNc y después se usó para calcular la cantidad inicial de ADNc objetivo en las muestras desconocidas. El SYBR® green I es un colorante intercalante de ADN bicatenario general y, por lo tanto, puede detectar productos inespecíficos y cebadores/dímeros adicionalmente al amplicón de interés. Para determinar el número de productos sintetizados durante la PCR en tiempo real, se realizó un análisis de la curva de fusión de cada producto. Se usó la PCR en tiempo real para medir la cantidad inicial de ácido nucleico de cada muestra
45 desconocida de ADNc en la misma placa de 96 pocillos.

50 *Análisis estadístico.* Los datos paramétricos se analizaron mediante el uso de un ANOVA seguido del método de comparación múltiple de Scheffe. Los datos no paramétricos se analizaron mediante el uso de la prueba U de Mann-Whitney seguida de una prueba de comparaciones múltiples de Dunn. El ANOVA se realizó mediante el uso del procedimiento de modelo lineal general de SAS, versión 6.0.3 (SAS Institute). La significación estadística se evaluó a un P≤0,05.

Resultados

55 *El BT-11 mejora la patología de la enfermedad y los tejidos en un modelo de colitis por DSS.* El objetivo de este estudio fue investigar si la administración de BT-11 activa la LANCL2 y ejerce propiedades antiinflamatorias en el contexto de la IBD. Para evaluar la eficacia de nuestro compuesto BT-11 ilustrativo en un modelo agudo de IBD, tratamos ratones C57BL/6J con DSS al 5 % en una prueba de 7 días. A lo largo del periodo de exposición, el tratamiento con BT-11
60 mejoró significativamente la puntuación en la actividad de la enfermedad (Figura 10, panel A). Además, las lesiones macroscópicas en el bazo (Figura 10, panel B), los MLN (Figura 10, panel C) y el colon (Figura 10, panel D) también disminuyeron significativamente después de la activación de la vía LANCL2 mediante el uso de BT-11 el día 7 después de la prueba.

65 *El BT-11 mejora la histopatología colónica en ratones con colitis inflamatoria aguda en una forma de respuesta a la dosis.* A continuación, examinamos el efecto del BT-11 sobre las lesiones inflamatorias histopatológicas del colon. De acuerdo con nuestras observaciones de la actividad de la enfermedad y las lesiones macroscópicas, los análisis

histopatológicos confirmaron que el tratamiento con BT-11 disminuyó significativamente en 5 veces la inflamación en la mucosa intestinal en base a la evaluación de la infiltración leucocítica (Figura 11, panel G), la erosión epitelial (Figura 11, panel H) y el engrosamiento de la mucosa (Figura 11, panel I). Las micrografías colónicas representativas muestran cómo el tratamiento con BT-11 durante la colitis inducida por DSS en ratones mejora significativamente el estado de la mucosa intestinal al mejorar la integridad de las células epiteliales y reducir la destrucción de la arquitectura intestinal, así como también la infiltración de varios sub-conjuntos inmunes (Figura 11, paneles AF). Realizamos estudios de dosis-respuesta con el BT-11 y observamos de manera interesante cómo las tres características distintivas de la inflamación colónica (infiltración leucocítica, engrosamiento de la mucosa y erosión epitelial) disminuyeron en ratones con colitis a medida que la dosis de BT-11 se aumentó de 10 a 80 mg/kg (Figura 12, paneles AC).

El tratamiento oral con BT-11 reduce la expresión de TNF α y regula positivamente la LANCL2 e IL-10. Para investigar más de cerca el efecto del BT-11 sobre la modulación del sistema inmunológico, evaluamos la expresión genética de la IL-10, la LANCL2 y el TNF α . Los resultados muestran cómo el tratamiento con BT-11 reguló negativamente la expresión del factor de necrosis tumoral alfa (TNF α) (Figura 13, panel A), así como también aumentó los niveles de interleucina 10 (IL-10) (Figura 13, panel B) y el receptor LANCL2 (Figura 13, panel C), al crear por tanto un lazo de retroalimentación positiva que promueve los efectos antiinflamatorios y regula negativamente la respuesta inflamatoria impulsada por TNF α . Al realizar un estudio de dosis-respuesta, podríamos plantear la hipótesis que nuestro ligando BT-11 y la siguiente activación de la vía LANCL2 aumentan directamente la producción de IL-10 colónica, ya que su expresión evaluada por citometría de flujo sigue la dinámica de dosis-respuesta con BT-11. **(Figura 14, panel B)**. Observamos que la reducción de las células colónicas que expresan TNF α fue significativamente diferente tanto con 40 como con 80 mg/kg de BT-11, pero no con dosis más bajas, como 10 o 20 mg/kg **(Figura 14, panel A)**. También observamos cómo la expresión de FOXP3 en los MLN depende de la dosis **(Figura 14, panel C)**.

Los efectos de BT-11 durante la colitis aguda son dependientes de LANCL2. Con el fin de demostrar cómo se ejercen los efectos beneficiosos de la administración con BT-11 durante la colitis aguda en ratones, realizamos estudios que comparan dichos efectos en ratones de tipo salvaje y con inactivación de LANCL2 (LANCL2 $^{-/-}$). Nuestros resultados demuestran que la LANCL2 es necesaria para que el BT-11 ejerza sus beneficios antiinflamatorios, ya que la pérdida de LANCL2 impidió que los ratones se recuperaran de la colitis aguda inducida por DSS **(Figura 15, panel A)**. Igualmente, la pérdida de LANCL2 anuló la disminución de la puntuación macroscópica en el colon **(Figura 15, panel B)**, los MLN **(Figura 15, panel C)** y el bazo **(Figura 15, panel D)** al comparar los compañeros de camada de tipo salvaje y LANCL2 $^{-/-}$. Además, el efecto de BT-11 en la formación de lesiones en la mucosa colónica también es dependiente de la LANCL2, ya que evaluamos los análisis histopatológicos en ratones LANCL2 $^{-/-}$ tratados con vehículo o BT-11 y observamos cómo la pérdida de la LANCL2 anula por completo el efecto de BT-11 **(Figura 16)**.

Para caracterizar aún más las respuestas celulares después del tratamiento con el BT-11, realizamos más estudios de desactivación de LANCL2 para determinar si la disminución de proteínas pro-inflamatorias y el aumento de factores antiinflamatorios se eliminaron. Nuestros resultados de citometría de flujo demuestran que la reducción del factor pro-inflamatorio MCP1 es dependiente de la LANCL2 tanto en el colon **(Figura 17, panel A)** y los MLN **(Figura 17, panel B)**, ya que la pérdida del gen LANCL2 anula el efecto del BT-11. También encontramos que la secreción del TNF α en el colon depende de la LANCL2 **(Figura 17, panel C)** así como también la regulación positiva de poblaciones de granulocitos MHC-II+ CD11c+ **(Figura 17, panel D)**. De acuerdo con estos resultados, encontramos que la regulación positiva de la secreción de IL-10 después del tratamiento con el BT-11 se anula por completo en ratones con desactivación de LANCL2 tanto en el colon **(Figura 17, panel E)** y el bazo **(Figura 17, panel F)**, al mostrar, una vez más, la dependencia de nuestro principal compuesto líder con nuestro objetivo de interés.

Discusión

La LANCL2 ha surgido como un nuevo objetivo terapéutico para enfermedades inflamatorias e inmunomediadas [18]. Nuestros resultados *in vivo* demuestran por primera vez que el tratamiento oral con el ligando BT-11 de la LANCL2 mejora la inmunopatología intestinal en modelos de ratón con IBD al suprimir la inflamación. La LANCL2 ha recibido cierta atención recientemente como un objetivo terapéutico potencial debido a su función relacionada con la unión y señalización de ABA [19] y el descubrimiento reciente de un mecanismo alternativo basado en la membrana de activación de PPAR γ [8]. Además, determinamos la expresión de la LANCL2 en una serie de tejidos de ratón, lo que demostró que, además del cerebro y los testículos, LANCL2 también se expresa en otros tejidos, como el timo, el bazo, el colon y las placas de Peyer, lo que indica la posible relación entre la LANCL2 y las respuestas inmunes y sugieren el potencial más amplio de LANCL2 como objetivo terapéutico.

Previamente, hemos informado que el ABA transactiva PPAR γ *in vitro* y suprime la inflamación sistémica similar a otros agonistas de PPAR γ . Dado que tanto el ABA como el NSC61610 tienen como objetivo la LANCL2, el NSC61610 también podría actuar a través de la activación de PPAR γ . Los resultados experimentales demuestran que el tratamiento con NSC61610 activa el PPAR γ en macrófagos crudos, de esta manera proporciona evidencia de una posible relación de señalización entre la LANCL2 y el PPAR γ e indica que el NSC61610 podría apuntar al eje LANCL2-PPAR γ *in vitro*. Para investigar la importancia de la LANCL2 en la activación del PPAR γ mediada por NSC61610, determinamos si la eliminación de LANCL2 en macrófagos crudos mediante el uso de ARNip alteraba o anulaba el efecto del NSC61610 sobre la actividad reportera de PPAR γ . Nuestros hallazgos indican que desactivar la LANCL2 atenúa significativamente el efecto del NSC61610 sobre la actividad PPAR γ [12]. En este ejemplo, demostramos

cómo la administración del BT-11 ejerce propiedades antiinflamatorias al disminuir no solo la puntuación en el índice de actividad de la enfermedad y las puntuaciones macroscópicas en el bazo, los MLN y el colon (**Figura 10**) pero también al reducir significativamente las lesiones histopatológicas (**Figura 11**). Demostramos cómo estos dos efectos específicos eran dependientes de la LANCL2 (**Figura 15 y Figura 16**). También demostramos que el BT-11 reduce los niveles de TNF α y regula positivamente tanto la LANCL2 como la IL-10 (**Figura 13**). También demostramos que los efectos son dependientes de la LANCL2 ya que no observamos estas tendencias en ratones LANCL2 $^{-/-}$ (**Figura 17**). Estos resultados confirman que la LANCL2 es un nuevo objetivo terapéutico para enfermedades inflamatorias y el BT-11 es un compuesto que se dirige a este.

10 Ejemplo 21: Uso de BT-11 en un modelo crónico de la enfermedad de Crohn

Introducción

15 Como se mencionó anteriormente, la enfermedad inflamatoria intestinal (IBD), con sus dos manifestaciones clínicas, la colitis ulcerosa y la enfermedad de Crohn, es una enfermedad inmunomediada caracterizada por una inflamación generalizada y una infiltración de células inmunitarias del tracto gastrointestinal. La etiología de la IBD es multifactorial e implica la interacción entre la predisposición genética, los factores ambientales y la microbiota intestinal.

20 El presente ejemplo se centrará en la manifestación crónica de la IBD: Enfermedad de Crohn. Mientras que la inflamación en la colitis ulcerosa se caracteriza por un patrón continuo que involucra las capas mucosas y submucosas superficiales pero se limita al colon, en la enfermedad de Crohn esta inflamación es transmural y discontinua, y cualquier región del intestino puede verse afectada más allá del íleon, el cual es el más afectado. La patogenia de la enfermedad de Crohn es compleja y está influenciada por factores genéticos y ambientales y la lesión inmunomediada de la mucosa intestinal provocada por la activación prolongada del sistema inmunológico de la mucosa.

25 Los tratamientos dirigidos a modular negativamente las respuestas inmunes e inflamatorias, como el corticosteroide prednisona o el anticuerpo anti-factor de necrosis tumoral a REMICADE® (Janssen Biotech, Inc., Horsham, PA) (infliximab), han demostrado ser prometedores para reducir la gravedad y la recurrencia de la enfermedad. Sin embargo, estos tratamientos también están asociados con varios efectos secundarios adversos, como la apariencia cushingoide, el aumento de peso y la inmunosupresión sistémica, lo que enfatiza la necesidad de desarrollar alternativas más seguras para el tratamiento a largo plazo de la IBD [20].

35 La presente invención proporciona un nuevo producto farmacéutico para el tratamiento de la enfermedad de Crohn al dirigirse a un nuevo receptor llamado LANCL2. El BT-11, un compuesto ilustrativo, se administra por vía oral y se distribuye sistémicamente, y ejerce efectos inmunomoduladores no solo en la UC sino también en la enfermedad de Crohn al dirigirse a la LANCL2 en las células inmunitarias intestinales. Nuestros estudios pre-clínicos de eficacia en modelos crónicos de la enfermedad de Crohn en ratones mostraron cómo la administración de BT-11 reduce el índice de actividad de la enfermedad y mejora la inflamación intestinal al disminuir significativamente la infiltración leucocítica en la mucosa intestinal, así como también al disminuir el engrosamiento de la mucosa y la erosión epitelial. Los análisis de expresión génica confirmaron que la administración oral del BT-11 regula positivamente la expresión de LANCL2 y regula negativamente la expresión del ARNm de TNF α en un modelo crónico de IBD en ratones. Además, la administración del BT-11 reduce los macrófagos pro-inflamatorios y la infiltración de células dendríticas en la lámina propia del colon, así como también reguló positivamente las células T CD4 $^{+}$ que expresan FOXP3 y reguló negativamente el número de células Th1 efectoras en el colon. También realizamos estudios de desactivación para confirmar que estos efectos son dependientes de LANCL2. Finalmente, en los sitios de inducción, el BT-11 es capaz de regular negativamente la generación de células Th17, así como también de regular positivamente el compartimento de células T CD4 $^{+}$ reguladoras mediante la regulación positiva de la expresión de FOXP3.

Métodos

50 **Ratones.** Se adquirieron ratones C57BL/6 y con desactivación de IL-10 del Laboratorio Jackson y se alojaron en condiciones específicas libres de patógenos en rejillas ventiladas. Los ratones LANCL2 $^{-/-}$ se compraron en el depósito KOMP de la Universidad de California Davis. Todos los ratones se mantuvieron en instalaciones para animales. Todos los protocolos experimentales se aprobaron por un comité institucional de cuidado y uso de animales y cumplieron o superaron las pautas de la política del Servicio de Salud Pública y Bienestar Animal de Laboratorio de los Institutos Nacionales de Salud.

60 **Enriquecimiento y clasificación de células T CD4 $^{+}$.** Los esplenocitos obtenidos de ratones C57BL/6J (tipo salvaje) se enriquecieron en células T CD4 $^{+}$ mediante clasificación magnética negativa mediante el uso del sistema de separación de células I-Mag (BD Pharmingen). Las células se incubaron con una mezcla de Abs biotinilados seguido de una segunda incubación con partículas de estreptavidina y se expusieron a un imán para eliminar las células no deseadas. La pureza de la suspensión de células enriquecidas con CD4 $^{+}$ estuvo entre un 93 y 96 %. Las células enriquecidas en CD4 se usaron para la transferencia adoptiva o se purificaron adicionalmente mediante FACS. Para la clasificación por FACS, las células se marcaron con CD45RB, CD4 y CD25 y se separaron en células CD4 $^{+}$ CD45RBhigh CD25 $^{-}$ (es decir, células T efectoras) en un clasificador de células FACSARIA™ (BD Biosciences, San José, CA). La pureza de los sub-conjuntos de CD4 $^{+}$ clasificados por FACS fue \geq 98 %.

Transferencia adoptiva. A los ratones SCID y RAG2-/- de seis semanas se les administraron por vía intraperitoneal (ip) 4×10^5 CD4+ CD45RBhigh CD25- a partir de ratones C57BL/6J (tipo salvaje) o LANCL2-/- . Los ratones se pesaron semanalmente y los signos clínicos de la enfermedad se registraron diariamente durante 14 semanas. Los ratones que desarrollaron signos graves de emaciación se sacrificaron. De cualquier otra manera, los ratones se sacrificaron 90 días después de la transferencia. Los grupos para los estudios de transferencia adoptiva fueron los siguientes: i. tratado con vehículo no transferido, ii. Tratado con BT-11 (80 mg/kg) no transferido, iii. Tratado con vehículo transferido, iv. Tratado con BT-11 (80 mg/kg) transferido. Se usaron 12 ratones en cada grupo.

Histopatología. Las secciones colónicas de los estudios de IBD en ratones se fijaron en formalina neutra tamponada al 10 %, después se incrustaron en parafina y después se seccionaron (5 μ m) y se tiñeron con tinción H&E para el examen histológico. Los dos cólonos se clasificaron con una puntuación histológica compuesta que incluye la extensión de (1) la infiltración de leucocitos, (2) el engrosamiento de la mucosa y (3) la erosión de células epiteliales. Las secciones se clasificaron con una puntuación de 0-4 para cada una de las categorías anteriores, y los datos se analizaron como una puntuación compuesta normalizada.

Aislamiento celular. Se extirparon los bazos y los ganglios linfáticos mesentéricos (MLN) y se trituraron en 1 x PBS/FBS al 5 % mediante el uso de los extremos esmerilados de dos portaobjetos de microscopio estériles. Las suspensiones de células individuales se centrifugaron a 300x g durante 10 min y se lavaron una vez con 1xPBS. Los glóbulos rojos se eliminaron mediante lisis osmótica antes de la etapa de lavado. Todos los sedimentos celulares se resuspendieron en tampón FACS (1xPBS suplementado con FBS al 5 % y azida de sodio al 0,09 %) y se sometieron a análisis de citometría de flujo. Paralelamente, se extirparon los dos cólonos y se aislaron los leucocitos de la lámina propia (LPL). Las piezas de tejido se lavaron en CMF (1xHBSS/10 % FBS/Hepes 25 mM) y el tejido se incubó dos veces con CMF/EDTA 5 mM durante 15 min a 37 °C en agitador. Después de lavar con 1xPBS, el tejido se digirió adicionalmente en CMF suplementado con 300 U/mL de colagenasa de tipo VIII y 50 U/mL de ADNasa I (ambas Sigma-Aldrich) durante 1,5 horas a 37 °C en agitador. Después de filtrar los sobrenadantes, las células se lavaron una vez en 1xPBS, los sedimentos se resuspendieron en tampón FACS y se sometieron a análisis de citometría de flujo.

Inmunofenotipificación y análisis de citocinas por citometría de flujo. Para la tinción fluorescente de los sub-conjuntos de células inmunes se incubaron $4-6 \times 10^5$ células durante 20 min con anticuerpos primarios específicos de ratón conjugados con fluorocromos: anti-CD3 PE-Cy5 clon 145-2C11 (eBioscience, San Diego, CA), anti-CD4 PE-Cy7 clon GK1.5 (eBioscience), anti- CD4 APC clon RM4-5 y anti-CD25 biotina clon 7D4 (BD Biosciences). Las células se lavaron con tampón FACS (1xPBS suplementado con FBS al 5 % y azida de sodio al 0,09 %). Para la tinción intracelular de factores de transcripción y citocinas, las células se fijaron y se permeabilizaron mediante el uso de un kit comercial de acuerdo con las instrucciones del fabricante (eBioscience). Brevemente, las células se fijaron y permeabilizaron durante 20 minutos, los receptores Fc se bloquearon con FcBlock anti-CD16/CD32 de ratón (BD Biosciences) y las células se tiñeron con anticuerpos conjugados con fluorocromo contra el anti-FOXP3 de ratón clon FJK-16s, el anti-ROR gamma (t) de ratón PE, clon B2B y el anti-IL-17-A APC de ratón, clon eBio17B7 (eBioscience). Todas las muestras se almacenaron fijadas a 4 °C en la oscuridad hasta su adquisición en un citómetro de flujo FACS Aria (BD Biosciences). Se aplicó un portal de células vivas (FSC-A, SSC-A) a todas las muestras, seguido de la clasificación de células individuales (FSC-H, FSC-W) antes de analizar las células para determinar la expresión de marcadores específicos. El análisis de datos se realizó con FACS DIVA™ (BD Biosciences) y Flow Jo (Tree Star Inc.).

PCR cuantitativa en tiempo real. El ARN total se aisló de los dos cólonos de ratón mediante el uso de un RNEASY PLUS MINI KIT (Qiagen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se usó ARN total (1 μ g) para generar un molde de ADNc mediante el uso de un kit de síntesis de ADNc ISCRIP™ (Bio-Rad). El volumen total de reacción fue de 20 μ L, con la reacción incubada de la siguiente manera en un termociclador MJ MINI™ (Bio-Rad): 5 min a 25 °C, 30 min a 52 °C, 5 min a 85 °C y contener a 4 °C. La PCR se realizó en el ADNc mediante el uso de la Taq DNA polimerasa (Invitrogen). Cada amplicón de gen se purificó con el kit de purificación MINELUTE PCR (Qiagen) y se cuantificó tanto en un gel de agarosa mediante el uso de un patrón de masa de ADN (Promega) como con una nanogota. Estos amplicones purificados se usaron para optimizar las condiciones de la PCR en tiempo real y para generar curvas estándar en el ensayo de PCR en tiempo real. Los cebadores se diseñaron mediante el uso del software Oligo 6. Las concentraciones de cebadores y las temperaturas de alineamiento se optimizaron para el sistema ICYCLER IQ™ (Bio-Rad) para cada conjunto de cebadores mediante el uso del protocolo de gradiente del sistema. Las eficiencias de la PCR se mantuvieron entre el 92 y 105 % y los coeficientes de correlación $>0,98$ para cada juego de cebadores durante la optimización y también durante la PCR en tiempo real de la muestra de ADN. Las concentraciones de ADNc para los genes de interés se examinaron mediante la qPCR en tiempo real mediante el uso de un sistema ICYCLER IQ™ y el IQ™ SYBR® Green Supermix (Bio-Rad). Se generó una curva estándar para cada gen mediante el uso de diluciones de 10 veces de amplicones purificados al comenzar con 5 pg de ADNc y después se usó para calcular la cantidad inicial de ADNc objetivo en las muestras desconocidas. El SYBR® green I es un colorante intercalante de ADN bicatenario general y, por lo tanto, puede detectar productos inespecíficos y cebadores/dímeros adicionalmente al amplicón de interés. Para determinar el número de productos sintetizados durante la PCR en tiempo real, se realizó un análisis de la curva de fusión de cada producto. Se usó la PCR en tiempo real para medir la cantidad inicial de ácido nucleico de cada muestra desconocida de ADNc en la misma placa de 96 pocillos.

Análisis estadístico. Los datos paramétricos se analizaron mediante el uso de un ANOVA seguido del método de comparación múltiple de Scheffe. Los datos no paramétricos se analizaron mediante el uso de la prueba U de Mann-Whitney seguida de una prueba de comparaciones múltiples de Dunn. El ANOVA se realizó mediante el uso del procedimiento de modelo lineal general de SAS, versión 6.0.3 (SAS Institute). La significación estadística se evaluó a un $P \leq 0,05$.

Resultados

El BT-11 mejora la actividad de la enfermedad en un modelo de IBD IL-10^{-/-}. Varios estudios en animales para estudiar la cronicidad de la enfermedad de Crohn han empleado el modelo de ratón deficiente en interleucina-10 (IL-10^{-/-}), dado que se sabe que la IL-10 suprime la secreción de numerosas citocinas pro-inflamatorias [21]. Para evaluar la eficacia del BT-11 no solo en modelos agudos de colitis sino también en modelos crónicos, establecimos un estudio de colitis de modelo de ratón de IL-10 nulo y tratamos a los ratones con dosis crecientes de BT-11 (20, 40, y 80 mg/kg). El tratamiento con BT-11 disminuyó significativamente las puntuaciones del índice de actividad de la enfermedad en los ratones tratados en comparación con sus compañeros de camada tratados con vehículo (Figura 18). Además, los ratones tratados con la dosis más alta del BT-11 (80 mg/kg) redujeron significativamente las puntuaciones en comparación con los tratados con 20 o 40 mg/kg de compuesto BT-11 a partir de la semana 13 y hasta el final del experimento.

El BT-11 redujo las lesiones macroscópicas en el bazo, los MLN y el colon en un modelo crónico de IBD IL10^{-/-}. Para determinar inicialmente la eficacia clínica, evaluamos la lesión tisular macroscópica después del tratamiento con BT-11 y la subsecuente activación de la vía LANCL2. Marcamos macroscópicamente el bazo (Figura 19, panel A), los MLN (Figura 19, panel B) y el colon (Figura 19, panel C) inmediatamente después de la eutanasia y la recolección de tejido 19 semanas después del inicio del estudio. El tratamiento con BT-11 a concentraciones tan bajas como 20 mg/kg redujo en gran medida y significativamente las puntuaciones macroscópicas en los tres tejidos, demostrando su potente eficacia.

El BT-11 mejora las lesiones histopatológicas y la inflamación en un modelo crónico de IBD IL-10^{-/-}. Para evaluar las lesiones histopatológicas y la patología general en la mucosa intestinal, se tiñeron secciones de colon con H&E y se observaron al microscopio. Nuestros resultados demuestran cómo el tratamiento con BT-11 redujo significativamente la inflamación en base a la reducción de la infiltración leucocítica (Figura 20, panel A), la erosión epitelial (Figura 20, panel B), y el engrosamiento de la mucosa (Figura 20, panel C). También observamos un mecanismo dependiente de la dosis sobre la cantidad de infiltración en la mucosa intestinal que se correlacionó con el engrosamiento de la mucosa.

El tratamiento con BT-11 induce una potente respuesta antiinflamatoria y disminuye los subconjuntos pro-inflamatorios en la lámina propia del colon, el bazo y los MLN. Para determinar el efecto del BT-11 en sub-conjuntos de células inmunes, caracterizamos fenotípicamente las células aisladas del colon, el bazo y MLN. Nuestros análisis indicaron que el BT-11 disminuyó significativamente el porcentaje de macrófagos pro-inflamatorios F4/80+ (Figura 21, panel A), de células dendríticas MHC-II+ CD11c+ (Figura 21, panel B), y de células efectoras Th1 (Figura 21, panel D) en la lámina propia del colon. Además, el BT-11 ejerció propiedades antiinflamatorias a través de la regulación positiva de las células T CD4+ que expresan FOXP3 en la LP colónica (Figura 21, panel C).

La regulación positiva de las células T CD4+ que expresan FOXP3 también se observó tanto en los MLN (Figura 22, panel B) y el bazo (Figura 22, panel C), al mostrar y demostrar cómo el BT-11 también tiene un efecto sistémico. La regulación negativa de las células Th1 pro-inflamatorias también se observó en el bazo en una forma de respuesta a la dosis (Figura 22, panel D). Por último, las células efectoras Th17, caracterizadas por su expresión de ROR γ t, se regularon negativamente en los MLN (Figura 22, panel A).

Además, los análisis de expresión genética confirmaron que el tratamiento con BT-11 regula positivamente la expresión colónica de la LANCL2 (Figura 23, panel A) y regula negativamente la expresión de TNF α (Figura 23, panel B). Estos efectos de expresión fueron dependientes de la dosis de la cantidad de BT-11 administrada.

El BT-11 demostró una mejora de la actividad de la enfermedad en un modelo de inducción de colitis IBD por células T CD4+. Para validar aún más la eficacia del BT-11 en otro modelo crónico de IBD, transferimos de forma adoptiva células T CD4+ vírgenes de ratones de tipo salvaje y LANCL2^{-/-} a receptores RAG2^{-/-}. Los ratones RAG2^{-/-} se trataron con vehículo o BT-11 en base al diseño experimental. El tratamiento con nuestro principal líder de compuestos BT-11 redujo significativamente la puntuación del índice de actividad de la enfermedad en los ratones tratados en comparación con sus compañeros de camada de tipo salvaje (Figura 24). Encontramos que estos resultados dependen de la LANCL2, ya que el efecto de BT-11 se anuló por completo con la pérdida de la LANCL2 (Figura 25).

Curiosamente, la pérdida de peso en los ratones tratados con BT-11 mejoró significativamente en comparación con los ratones tratados con vehículo a partir de las 7 semanas hasta el final del experimento (Figura 26).

El BT-11 redujo las lesiones macroscópicas en el bazo, los MLN y el colon en un modelo crónico de transferencia adoptiva de IBD. Para confirmar la eficacia clínica en el segundo modelo de colitis crónica, evaluamos la lesión tisular macroscópica después del tratamiento con BT-11 y la subsecuente activación de la vía LANCL2 en ratones

transferidos adoptivamente con células de tipo salvaje o LANCL2-/- y tratados con vehículo o con el BT-11. Marcamos macroscópicamente el bazo (**Figura 27, panel A**), los MLN (**Figura 27, panel B**), y el colon (**Figura 27, panel C**) y el íleon (**Figura 27, panel D**) inmediatamente después de la eutanasia y la recolección de tejido 11 semanas después del inicio del estudio. El tratamiento con BT-11 a una concentración de 80 mg/kg redujo considerablemente y significativamente las puntuaciones macroscópicas en los cuatro tejidos demostrando su potente eficacia. Descubrimos que estas observaciones dependen de la LANCL2 así como también que la pérdida de la LANCL2 anuló por completo el efecto de BT-11 (**Figura 28**).

El BT-11 también mejora las lesiones histopatológicas y la inflamación en un modelo de transferencia adoptiva de colitis crónica. De manera similar al experimento de colitis inducida por IL-10-/- y para confirmar las lesiones histopatológicas y la patología general en la mucosa intestinal con un segundo modelo de ratón de IBD, las secciones de colon se tiñeron con H&E y se observaron bajo un microscopio. Nuestros resultados confirman cómo el tratamiento con BT-11 redujo significativamente la inflamación en base a la reducción de la infiltración leucocitaria tanto en el colon como en el íleon (**Figura 29, paneles A y B**) y al engrosamiento de la mucosa (**Figura 29, paneles E y F**). Es de destacar que el íleon se vio menos afectado por la erosión epitelial (**Figura 29, panel D**) pero esa erosión en el colon se encontró significativamente menor en ratones tratados con nuestro compuesto líder BT-11 (**Figura 29, panel C**). Para confirmar la dependencia del BT-11 a la LANCL2, realizamos estudios de transferencia adoptiva y transferimos células T CD4+ de donantes LANCL2-/- . Nuestros resultados demuestran cómo la disminución de la infiltración leucocítica, la erosión epitelial y el engrosamiento de la mucosa se anulan en gran medida en los receptores transferidos con LANCL2-/- (**Figura 30**).

El BT-11 induce consistentemente una tremenda respuesta antiinflamatoria y regula negativamente los mediadores pro-inflamatorios en ratones. Para caracterizar el perfil de células inmunes en ratones tratados con BT-11 respecto al vehículo, realizamos análisis de citometría de flujo en células aisladas del colon, el bazo y los ganglios linfáticos mesentéricos. Confirmamos en un segundo modelo crónico de IBD de ratón que los ratones receptores que se trataron con BT-11 durante un período de 11 semanas poseen un nivel significativamente menor de macrófagos infiltrantes pro-inflamatorios F4/80+ CD11b+ (**Figura 31, panel A**), así como también una disminución de los niveles de IFN γ en base a un análisis realizado en leucocitos CD45+ totales (**Figura 31, panel B**) en el colon. Además, el tratamiento con BT-11 reguló positivamente consistentemente las células T reguladoras CD4+ al promover la expresión de FOXP3 (**Figura 31, panel C**) y la potente citocina antiinflamatoria IL-10 (**Figura 31, panel D**) en el sitio local de inflamación, en este caso, la mucosa colónica.

De manera similar al perfil observado en las células de la lámina propia del colon, caracterizamos estas poblaciones en sitios inductivos como el bazo y los MLN. Los resultados de inmunofenotipificación muestran cómo el tratamiento con BT-11 también aumenta los niveles de FOXP3 e IL-10 en los sitios inductivos como el bazo y los MLN (**Figura 32, paneles A, B, D y E**). Es de destacar que el tratamiento de BT-11 disminuyó la expresión de IFN γ en la población CD45+ tanto en los MLN como en el bazo (**Figura 32, paneles C y F**).

El efecto del BT-11 dirigido a la LANCL2 es independiente de PPAR γ . La activación de la LANCL2 activa una plétora de vías que, en última instancia, regulan las respuestas antiinflamatorias basadas en IL-10 que regulan la inflamación a nivel de sistemas, en base a nuestros resultados experimentales. Una vía aguas abajo activada de LANCL2 es la vía PPAR γ . Para ayudar a superar las posibles preocupaciones toxicológicas sobre la activación secundaria de este factor nuclear y de transcripción, también transferimos ratones RAG2-/- con células T CD4+ de donantes PPAR γ -/-. Después tratamos a estos ratones con vehículo o BT-11 a 80 mg/kg. Nuestros resultados demuestran claramente que los efectos beneficiosos de BT-11 a través de la activación de LANCL2 sobre la actividad de la enfermedad y la histopatología ocurren de manera independiente de PPAR γ (**Figura 33, paneles AD**). Estos resultados demuestran que la activación de LANCL2 también regula otras vías que modulan los efectos antiinflamatorios de la activación de LANCL2.

Discusión

Las terapias actuales contra la enfermedad inflamatoria intestinal (IBD) tienen un éxito moderado y tienen efectos secundarios adversos importantes para el tratamiento a largo plazo de la enfermedad [17]. El compuesto botánico ácido abscísico (ABA) ejerce potentes efectos antiinflamatorios en modelos de colitis en ratones [22, 23]. La de lantionina sintetasa 2 tipo componente C (LANCL2) es un objetivo para la unión y señalización de ABA [15, 19, 24]. Por tanto, la LANCL2 se ha convertido en un objetivo terapéutico novedoso y prometedor contra la inflamación [18]. Se identificó que el compuesto 61610, una bis(bencimidazol)tereftalanilida (BTT), se une a la LANCL2 con la mayor afinidad en una biblioteca de varios millones de sustancias químicas. Adicionalmente, el 61610 ejerció potentes efectos antiinflamatorios en modelos de ratón de inflamación intestinal [25]. Se creó una biblioteca temática de 20 BTT derivados de 61610 y se identificó el BT-11 como un compuesto ilustrativo superior. El BT-11 se une a la LANCL2, es activo por vía oral, ha demostrado eficacia antiinflamatoria en 3 modelos de colitis en ratones y un perfil de seguridad sobresaliente.

De acuerdo con la Fundación Americana de la Crohn y la Colitis, la IBD afecta a más de 1 millón de personas en América del Norte y a 4 millones en todo el mundo. Esta enfermedad generalizada y debilitante resulta en una disminución de la calidad de vida y en costos significativos relacionados con la atención médica [26]. Los gastos

médicos promedio para tratar un solo episodio de IBD exceden los \$ 55,000 por paciente [27] con gastos totales que exceden los \$ 15 mil millones anuales en los EE. UU. Adicionalmente, los gastos indirectos incluyen los costos de tratar la pancreatitis recurrente [28] u otras complicaciones de la IBD como abscesos, obstrucción intestinal, anemia, trombosis, lesiones perianales, artritis, uveítis, iritis o lesiones cutáneas [29]. La IBD porta una carga significativa para los pacientes, a menudo al aislarlos socialmente, lo que afecta las relaciones familiares y limita sus oportunidades profesionales [17]. Con respecto a esto, los pacientes con IBD tienen una mayor velocidad de no participación en la fuerza laboral; esta alta velocidad persiste en el tiempo [30]. Adicionalmente, la inflamación intestinal (la colitis ulcerosa (UC) y la enfermedad de Crohn (CD)) aumenta el riesgo de desarrollar cáncer de colon, especialmente a edades tempranas (<30 años) [31]. Se espera que el mercado global de productos terapéuticos para la IBD alcance los 4300 millones de dólares en 2015, de acuerdo con un nuevo informe de los analistas de la industria global.

Aunque los tratamientos actuales para la IBD han mejorado [17, 32], solo tienen un éxito moderado para el manejo crónico de la enfermedad y producen efectos secundarios significativos, que incluye una capacidad disminuida del sistema inmunológico para montar respuestas inmunitarias protectoras contra patógenos o neoplasias malignas. Las opciones de tratamiento para los pacientes incluyen abordar los síntomas de la inflamación. La mayoría de los tratamientos farmacológicos usados en el mercado actualmente incluyen aminosalicilatos, corticosteroides, inmunomoduladores, antibióticos, biológicos (anticuerpo anti-factor de necrosis tumoral alfa). Los aminosalicilatos son extremadamente efectivos y generalmente bien tolerados. Sin embargo, los pacientes con recurrencias o enfermedades más moderadas pueden necesitar un tratamiento más agresivo, que incluye dosis a corto plazo de corticosteroides durante un período breve para controlar los síntomas. Este tipo de terapia de acción rápida no puede tolerarse durante períodos prolongados. Para el mantenimiento de la afección, los inmunomoduladores también se usan comúnmente en la CD y la UC, pero tienen un inicio de acción lento (de 3 a 6 meses para el efecto completo). Estos medicamentos tienen efectos secundarios adversos potencialmente significativos que van desde la pancreatitis hasta la diabetes, el hígado con cicatrices y los pulmones inflamados. Para los casos moderados a severos de la enfermedad que no han logrado el manejo con otras terapias, los pacientes recibirán anti-TNF- α , que se administra por vía intravenosa en un entorno controlado cada 6-8 semanas. Esta terapia extremadamente costosa, aunque efectiva, es de difícil acceso, ya que se necesita personal capacitado y un entorno clínico para su administración. Además, existen efectos secundarios importantes como el síndrome de Cushing, manía, insomnio, hipertensión, alta glucosa en sangre, osteoporosis, neoplasias, infecciones y necrosis avascular de huesos largos.

El compuesto ilustrativo, BT-11, ha demostrado un perfil toxicológico tremendamente seguro. Nuestros datos de eficacia en modelos crónicos de IBD demuestran cómo el tratamiento de BT-11 mejora las puntuaciones de actividad de la enfermedad en dos modelos de IBD crónica (**Figuras 18 y 24**) así como también la pérdida de peso corporal (**Figura 26**). Nuestros datos demuestran cómo estos efectos son dependientes de la LANCL2 (**Figura 25**). Nuestros datos de eficacia también demuestran cómo la activación de la vía LANCL2 por BT-11 promueve una respuesta antiinflamatoria caracterizada principalmente por células T CD4+ que expresan FOXP3 productoras de IL-10 (**Figuras 21, 22, 31, y 32**), así como también una disminución significativa de macrófagos inflamatorios, células dendríticas y factores proinflamatorios como el IFN γ (**Figuras 22, 23, 31, y 32**). Además, los análisis de expresión génica confirman estos hallazgos basados en células al mostrar cómo el tratamiento con BT-11 reduce los niveles de TNF α en el colon. (**Figura 23**). Todos estos hallazgos juntos son responsables de la mejora dramática dependiente de LANCL2 en la mucosa colónica en términos de infiltración leucocítica, erosión epitelial y engrosamiento de la mucosa en dos modelos de IBD crónica (**Figuras 20, 29, y 30**). También hemos demostrado que los efectos de BT-11 después de la unión a la LANCL2 son independientes de PPAR γ (**Figura 33**). Estos resultados confirman que la activación de la LANCL2 activa una plétora de activadores aguas abajo que regulan la inflamación a través de un mecanismo independiente de PPAR γ . Juntos, estos resultados soportan firmemente el hecho de que la LANCL2 es un nuevo objetivo terapéutico para las enfermedades inflamatorias y BT-11 es útil como nuevo fármaco.

Ejemplo 22: Uso del BT-11 para tratar la diabetes de tipo 1 (T1D)

Introducción

La diabetes mellitus (DM), también conocida simplemente como diabetes, es un grupo de enfermedades metabólicas en las que hay niveles altos de azúcar en sangre durante un período prolongado. Los dos tipos de diabetes se conocen como de tipo 1 y de tipo 2. Los nombres anteriores de estas afecciones eran diabetes insulino-dependiente y no insulino-dependiente, o diabetes de aparición juvenil y de aparición adulta. En la T1D, el cuerpo no produce insulina. En relación con la DT2, la DT1 no es tan común como la DT2. De hecho, aproximadamente el 10 % de todos los casos de diabetes son de tipo 1. La diabetes de tipo 1 afecta a 3 millones de estadounidenses. Cada año, más de 15,000 niños y 15,000 adultos son diagnosticados con DT1 en los EE. UU. Se estima que la velocidad de incidencia de DT1 entre niños menores de 14 años aumentará en un 3 % anual en todo el mundo. Los pacientes con diabetes de tipo 1 requieren inyecciones de insulina para mantenerse con vida, pero no curan la enfermedad ni previenen sus efectos secundarios graves.

Los medicamentos anti-diabéticos actuales son efectivos para mejorar la sensibilidad a la insulina, pero su administración crónica tiene efectos secundarios importantes como complicaciones cardiovasculares, hepatotoxicidad, aumento de peso, retención de fluidos y tumores de vejiga. La vía de la de lantionina sintetasa 2 tipo componente C

(LANCL2) ejerce acciones anti-diabéticas sin efectos secundarios [18]. El BT-11 se une a la LANCL2, es activo por vía oral, ha demostrado eficacia anti-diabética en ratones y un perfil de seguridad excepcional.

Métodos

Ratones. Los ratones NOD se compraron en el Laboratorio Jackson y se alojaron bajo condiciones específicas libres de patógenos en rejillas ventiladas. Los ratones se mantuvieron en instalaciones para animales. Todos los protocolos experimentales se aprobaron por un comité institucional de cuidado y uso de animales y cumplieron o superaron las pautas de la política del Servicio de Salud Pública y Bienestar Animal de Laboratorio de los Institutos Nacionales de Salud.

Evaluación del peso corporal y la tolerancia a la glucosa. Se determinó que todos los ratones eran normoglucémicos (niveles de glucosa en sangre en ayunas inferiores a 250 mg/dL) y tenían pesos similares ($20 \pm 1,5$ g) antes del inicio del estudio. Los ratones se pesaron semanalmente y se examinaron en busca de signos clínicos de enfermedad por observadores ciegos. Después de un ayuno estándar de 12 h, se midió la glucosa mediante el uso de un glucómetro ACCU-CHEK® (Indianapolis, IN). La sangre se recogió a través de la vena lateral de la cola y se colocó en tubos de recogida de sangre capilar.

Histopatología. Las secciones pancreáticas de los estudios en ratones NOD se fijaron en formalina neutra tamponada al 10 %, después se incluyeron en parafina y después se seccionaron ($5 \mu\text{m}$) y se tiñeron con tinción H&E para examen histológico. Las secciones se clasificaron con una puntuación de 0-4, en dependencia de la infiltración linfocítica, el daño celular y la erosión tisular, y los datos se analizaron como una puntuación compuesta normalizada.

Análisis estadístico. Los datos paramétricos se analizaron mediante el uso de un ANOVA seguido del método de comparación múltiple de Scheffe. Los datos no paramétricos se analizaron mediante el uso de la prueba U de Mann-Whitney seguida de una prueba de comparaciones múltiples de Dunn. El ANOVA se realizó mediante el uso del procedimiento de modelo lineal general de SAS, versión 6.0.3 (SAS Institute). La significación estadística se evaluó a un $P \leq 0,05$.

Resultados

El BT-11 reduce los niveles de glucosa en sangre en ayunas y aumenta la insulina en un modelo de ratón con diabetes de tipo 1.

Para determinar el efecto del BT-11 en la modulación de los niveles glucémicos en un modelo de ratón de T1D, realizamos una prueba de glucosa en sangre en ayunas en las semanas 0, 1, 3, 4, 5, 10 y 11 después del inicio del estudio. Nuestros resultados muestran cómo los ratones tratados con nuestro compuesto BT-11 tenían niveles significativamente más bajos de glucosa en sangre después de un período de ayuno de 12 h. (**Figura 34, panel A**). En paralelo, evaluamos los niveles de insulina en la semana 5 y nuestros resultados demuestran cómo los ratones tratados con BT-11 tenían niveles significativamente aumentados de insulina en plasma (Figura 34, panel B).

El BT-11 mejora la inflamación y las lesiones pancreáticas histopatológicas clínicas en el modelo de ratón NOD. Para evaluar las lesiones histopatológicas en el modelo de ratón de T1D, se recogió el páncreas y se fijó con formalina al 10 %. A continuación, las secciones pancreáticas se tiñeron con H&E y se observaron al microscopio. Nuestros resultados demuestran cómo el tratamiento con BT-11 reduce significativamente las lesiones histopatológicas clínicas en el páncreas en ratones en comparación con los ratones tratados con vehículo. (**Figura 35**).

Discusión

Existe la necesidad de medicamentos orales eficaces y más seguros para la diabetes de tipo 1 (T1D), una enfermedad que afecta a más de 3 millones de estadounidenses. El tratamiento con ABA ejerce efectos antidiabéticos [2]. La de lantionina sintetasa 2 tipo componente C (LANCL2) es un objetivo para la unión y señalización de ABA [15, 19, 24]. Por tanto, la LANCL2 se ha convertido en un objetivo terapéutico novedoso y prometedor contra la inflamación [18]. El ABA es efectivo para mejorar la diabetes [2, 33] y las enfermedades inmunomediadas como la enfermedad inflamatoria intestinal (IBD) [22, 23]. El compuesto 61610, una bis(bencimidazol)tereftalanilida (BTT), se une a la LANCL2 con la mayor afinidad en una biblioteca de varios millones de sustancias químicas. Adicionalmente, el 61610 ejerció potentes efectos inmunomoduladores en modelos de ratón de inflamación intestinal [25]. El BT-11 ejerce efectos anti-diabéticos en ratones NOD (**Figuras 34 y 35**). Además, el ABA aumentó la secreción de insulina en las células beta pancreáticas humanas [34], lo que sugiere la aplicación potencial del ABA como tratamiento de la diabetes de tipo 1 (DT1).

En las células inmunes, el ABA es reconocido por la LANCL2, un receptor acoplado proteína G que se asocia con la membrana celular después de la miristoilación [19, 35]. La unión del ABA a la LANCL2 aumenta el AMPc e inicia la señalización a través de la PKA y modula las respuestas inmunitarias en macrófagos y células T [8]. Realizamos modelos de homología para construir una estructura tridimensional de la LANCL2 mediante el uso de la estructura cristalina de la LANCL1 como molde. Mediante el uso del acoplamiento molecular, se demostró primero *in silico* y

después *in vitro* que ABA se une a la LANCL2. Esta predicción computacional se validó por resultados de SPR y un ensayo de unión con la LANCL2 humana [35]. Realizamos un cribado virtual basado en la LANCL2 mediante el uso de la estructura de la LANCL2 obtenida mediante modelos de homología para descubrir nuevos ligandos de LANCL2. Los compuestos de las bases de datos de productos naturales NCI Diversity Set II, ChemBridge y ZINC se acoplaron al modelo LANCL2 con Auto Dock y se clasificaron según la afinidad calculada. Si bien el ABA tiene una alta afinidad por la LANCL2, también se predijo que otros compuestos naturales que contienen dieno, como el 61610, se unirán en la misma región y también pueden usarse como fármacos de unión a LANCL2 [12]. El BT-11 también ha demostrado una fuerte unión a LANCL2 y una eficacia terapéutica en el modelo de ratón NOD de T1D (**Figura 34**). Estos datos proporcionan cierta validación de que la vía LANCL2 y los otros compuestos de la invención son útiles como fármacos inmunomoduladores para la diabetes de tipo 1. Otra evidencia que soporta el papel de la vía LANCL2 como medio para modular las respuestas inmunitarias y mejorar las enfermedades autoinmunitarias incluye la unión a la LANCL2 y los efectos protectores del ABA [22, 23], 61610 [12, 18] y BT-11 en modelos de ratón de la enfermedad inflamatoria intestinal (IBD).

La incidencia de diabetes de tipo 1 está aumentando a una tasa anual estimada del 3 % en todo el mundo [36-38]. Si bien el trasplante exitoso de islotes pancreáticos puede tratar la diabetes de tipo 1, la falta de islotes suficientes, la destrucción continua de los islotes trasplantados mediada por el sistema inmunitario y los efectos secundarios de los fármacos inmunosupresores limitan en gran medida el uso generalizado de este enfoque [39]. Como tal, las terapias que combinan de forma segura la capacidad de promover la función de las células β pancreáticas y la modulación inmunitaria son estrategias fundamentales para tratar la diabetes de tipo 1. Nuestros datos demuestran que la activación de la LANCL2 por el BT-11 no solo mejora los niveles de glucosa en sangre, sino que también mejora su normalización después de una prueba de glucosa (**Figura 34**). Además, el tratamiento con BT-11 durante la aparición de la T1d mejora la histopatología en el páncreas (**Figura 35**). De hecho, el ABA suprime de forma preventiva y terapéutica la inflamación y mejora la tolerancia a la glucosa [2, 3]. Por lo tanto, la activación natural de LANCL2 resulta tanto en la modulación inmune como lo ilustran sus efectos terapéuticos en la IBD [12, 18, 22, 23] y en la regulación de la homeostasis de la glucosa debido a la inflamación suprimida y la sensibilidad a la insulina mejorada [2, 3]. En base a estos antecedentes y los datos que se presentan en las **Figuras 34 y 35**, es importante investigar el papel de la LANCL2 como objetivo terapéutico para la diabetes de tipo 1.

Ejemplo 23: Uso del BT-11 para tratar la diabetes de tipo 2 (T2D)

Introducción

La diabetes mellitus (DM) es una afección crónica que ocurre cuando el cuerpo no puede producir suficiente insulina o usarla de manera efectiva, y es inducida por una predisposición genética acoplado con los factores ambientales. A diferencia de las personas con diabetes de tipo 1, los diabéticos de tipo 2 pueden producir insulina. Sin embargo, el páncreas de estos pacientes no fabrica suficiente insulina o el cuerpo no puede usar la insulina lo suficientemente bien. Este fenómeno se llama resistencia a la insulina. Cuando no hay suficiente insulina o la insulina no se usa como debería, la glucosa no puede procesarse ni usarse. Como resultado, cuando la glucosa se acumula en el torrente sanguíneo en lugar de ingresar a las células y ser metabolizada, otras células del sistema no pueden funcionar correctamente. De hecho, la hiperglucemia y la diabetes son causas importantes de morbilidad y mortalidad, debido a enfermedades cardiovasculares (CVD), nefropatía, neuropatía, úlceras del pie y retinopatía.

Aproximadamente 28,3 millones de estadounidenses tienen diabetes de tipo 2 (T2D) y más del 40,1 % de los adultos de mediana edad tienen pre-diabetes, una afección que se caracteriza por una intolerancia a la glucosa, inflamación sistémica y resistencia a la insulina. La Organización Mundial de la Salud estima que el número de personas con DT2 aumentará a 366 millones para el año 2030.

Como se indicó anteriormente, los medicamentos anti-diabéticos actuales son efectivos para mejorar la sensibilidad a la insulina, pero su administración crónica tiene efectos secundarios significativos tales como las complicaciones cardiovasculares, la hepatotoxicidad, el aumento de peso, la retención de fluidos y los tumores de vejiga. La vía de la lantionina sintetasa 2 tipo componente C (LANCL2) ejerce acciones anti-diabéticas sin efectos secundarios [18]. El BT-11 se une a la LANCL2, es activo por vía oral, ha demostrado eficacia anti-diabética en ratones y un perfil de seguridad excepcional.

Métodos

Ratones y tratamientos dietéticos. Se adquirieron ratones C57BL/6 y db/db en el Laboratorio Jackson y se alojaron bajo condiciones específicas libres de patógenos en rejillas ventiladas. Los ratones del modelo de diabetes con obesidad inducida por dieta (DIO) se alimentaron con una dieta alta en grasas (40 Kcal % de grasa). Los ratones se mantuvieron en instalaciones para animales. Todos los protocolos experimentales se aprobaron por un comité institucional de cuidado y uso de animales y cumplieron o superaron las pautas de la política del Servicio de Salud Pública y Bienestar Animal de Laboratorio de los Institutos Nacionales de Salud.

Evaluación del peso corporal y la tolerancia a la glucosa. Se determinó que todos los ratones eran normoglucémicos (niveles de glucosa en sangre en ayunas inferiores a 250 mg/dL) y tenían pesos similares (peso \pm 1,5 g) antes del

inicio del estudio. Los ratones se pesaron semanalmente y se examinaron en busca de signos clínicos de enfermedad por observadores ciegos. Después de un ayuno estándar de 12 h, se determinó la glucosa en diferentes días. Brevemente, se recogió sangre a través de la vena lateral de la cola y se colocó en tubos de recogida de sangre capilar. Después, se administró a los ratones una prueba de tolerancia a la glucosa mediante inyección intraperitoneal de D-glucosa (2 g/kg de peso corporal) y se recogieron muestras de sangre antes de la inyección (tiempo 0) (correspondiente a un nivel basal de FBG después de un ayuno de 12 horas a partir de las 6 am) y a los 15, 60 y 90 minutos (modelo db/db) o 15, 30, 60, 90, 120, 180, 220 y 265 minutos (modelo DIO) después de la inyección de glucosa. El tejido adiposo blanco abdominal (epidídimo) (WAT), el WAT subcutáneo y el hígado se extirparon y pesaron. Después, se digirió y fraccionó el WAT abdominal (epididimario).

Digestión del tejido adiposo blanco. El WAT abdominal se extrajo, se pesó, se trituró en piezas pequeñas de <10 mg y se colocó en un medio de digestión (1XHBSS (Mediatech, Herndon, VA) suplementado con HEPES al 2,5 % (Mediatech) y suero bovino fetal al 10 % que contiene colagenasa de tipo II (0,2 %, Sigma-Aldrich)). Las muestras se incubaron en una incubadora a 37 °C durante 30 min, se filtraron a través de un colador de células de nailon de 100 µm para eliminar las partículas no digeridas y se centrifugaron a 4 °C a 1000 x g durante 10 min. El sedimento, que consiste de células vasculares estromales (SVC), se lavó con 1XHBSS y se centrifugó a 4 °C a 1000 x g durante 10 min. El sobrenadante se descartó y los eritrocitos se lisaron incubando las SVC en 2 ml de tampón de lisis de eritrocitos durante 2 min antes de detener la reacción con 9 ml de PBS IX. Después, las células se volvieron a centrifugar a 4 °C a 1000 x g durante 10 min, se suspendieron en 1 ml de IX PBS y se contaron con un contador Coulter (Beckman Coulter, Fullerton, CA).

Inmunofenotipificación de células vasculares estromales. Para la inmunofenotipificación, se sembraron las SVC en placas de 96 pocillos (Costar) a 2 x 10⁵ células/pocillo. Después de una incubación inicial de 20 minutos con FcBlock (20 µg/mL; BD Biosciences - Pharmingen) para inhibir la unión inespecífica, las células se lavaron en PBS que contiene suero al 5 % y azida de sodio al 0,09 % (tampón FACS) y se tiñeron con anticuerpos anti-ratón primarios específicos. Los resultados de flujo se calcularon con un citómetro de flujo FACS Aria y los análisis de datos se realizaron con FACS DIVA™ (BD Biosciences) y FlowJo (TreeStar).

PCR cuantitativa en tiempo real. El ARN total se aisló del tejido adiposo mediante el uso del mini kit de lípidos RNEASY (Qiagen) y de las células mediante el uso del mini Kit RNEASY (Qiagen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se usó el ARN total para generar un molde de ADN complementario (ADNc) mediante el uso del kit de síntesis de ADNc QSCRIPT™ (Quanta Biosciences, Gaithersburg, MD). El volumen total de reacción fue de 20 µL con la reacción incubada de la siguiente manera en un termociclador MJ MINI™ (Bio-Rad): 5 min a 25 °C, 30 min a 52 °, 5 min a 85 °C, contener a 4 °C. Cada amplicón de gen se purificó con el kit de purificación MINELUTE PCR (Qiagen) y se cuantificó en un gel de agarosa mediante el uso de un patrón de masa de ADN (Promega). Estos amplicones purificados se usaron para optimizar las condiciones de PCR en tiempo real en el ensayo de PCR en tiempo real. Las concentraciones de cebadores y las temperaturas de hibridación se optimizaron para el sistema CFX (Bio-Rad) para cada conjunto de cebadores mediante el uso del protocolo de gradiente del sistema. Las eficiencias de la PCR se mantuvieron entre el 92 y el 105 % y los coeficientes de correlación por encima del 0,98 para cada conjunto de cebadores durante la optimización y también durante la PCR en tiempo real de la muestra de ADN. Los datos se muestran mediante el uso del método de cuantificación $\Delta\Delta C_t$.

Resultados

El BT-11 redujo los niveles de glucosa en sangre en ayunas en un modelo DIO de ratón de T2D. Para evaluar la eficacia del compuesto ilustrativo BT-11 en un modelo de T2D, alimentamos a ratones C57BL/6 con una dieta alta en grasas (modelo DIO). La administración oral de BT-11 disminuyó significativamente los niveles de glucosa en sangre en los ratones tratados con BT-11 en comparación con sus compañeros de camada tratados con vehículo en la semana 12 de alimentación rica en grasas (**Figura 36, panel A**). Además, después de 12 h de ayuno y la prueba de glucosa a 2 g/kg de peso corporal vía IP, los ratones tratados con BT-11 fueron capaces de normalizar los niveles de glucosa en sangre significativamente más rápido que los ratones no tratados. (**Figura 36, panel B**).

El tratamiento con BT-11 disminuyó la infiltración de macrófagos pro-inflamatorios, así como también los granulocitos pro-inflamatorios en el tejido adiposo blanco. Con el fin de caracterizar las células que infiltran el tejido adiposo blanco, se recogió y digirió WAT abdominal como se especifica en la sección de métodos. Se realizaron análisis de citometría de flujo evaluando diferentes poblaciones pro-inflamatorias en WAT. Nuestros resultados demuestran cómo el tratamiento con BT-11 disminuyó significativamente los niveles de macrófagos pro-inflamatorios F4/80+ CD11b+ (**Figura 37, panel A**), así como también el número de granulocitos pro-inflamatorios con altos niveles de Ly6c (GR1+ Ly6chigh) (**Figura 37, panel B**).

El BT-11 disminuyó los niveles de glucosa en sangre en ayunas en un modelo de ratón db/db de T2D. Para evaluar la eficacia terapéutica del tratamiento oral con BT-11 en dos modelos de ratón de diabetes, también se usaron ratones db/db, que desarrollan T2D espontánea debido a una mutación en el receptor de leptina. Se administró a los ratones db/db una dosis diaria de BT-11 a 80 mg/kg mediante sonda oral. Determinamos el efecto del BT-11 sobre la homeostasis de la glucosa al medir las concentraciones de glucosa en sangre en ayunas. El tratamiento con BT-11 disminuyó significativamente los niveles de glucosa en sangre en comparación con sus compañeros de camada

tratados con vehículo tan pronto como en una semana, al acentuar las diferencias con el tiempo en la semana 3 (**Figura 38, panel A**). Para determinar si el tratamiento oral con BT-11 modula cómo el animal inicia la homeostasis de la glucosa, administramos una prueba de glucosa intraperitoneal a animales experimentales y evaluamos la cinética de la glucosa plasmática de 0 a 265 minutos después de la inyección de glucosa. Las muestras de sangre recolectadas antes de la inyección (tiempo 0) (correspondiente a un nivel de FBG inicial después de un ayuno de 12 h). Nuestros resultados demuestran cómo el tratamiento oral con BT-11 disminuye significativamente los niveles de glucosa antes de la prueba de glucosa IP (tiempo 0, **Figura 38, panel B**). Después de la prueba de glucosa en el modelo db/db, nuestros resultados demuestran cómo los niveles de glucosa en ratones tratados con nuestro líder principal de compuestos BT-11, cayeron hacia niveles normales más rápidamente que en los ratones tratados con vehículo (**Figura 38, panel B**).

El BT-11 redujo los niveles de ARNm del TNF α y MCP-1 y aumentó la LANCL2. Para confirmar aún más la potencia antiinflamatoria de BT-11, evaluamos la expresión génica en el WAT como se indica en la sección de métodos. Nuestros resultados demuestran cómo, en comparación con los ratones no tratados, los ratones tratados con BT-11 tienen niveles de expresión más altos de LANCL2 y niveles de ARNm significativamente más bajos del factor proinflamatorio TNF α y MCP-1. (**Figura 39**).

Discusión

A medida que continúan aumentando las velocidades de la obesidad y diabetes de tipo 2 (T2D) en los EE. UU., un número cada vez mayor de personas se vuelve dependiente de los medicamentos anti-diabéticos orales. Aproximadamente 28,3 millones (el 8,3 % de la población) de estadounidenses tienen diabetes de tipo 2 y más del 40,1 % de los adultos de mediana edad tenían pre-diabetes, una afección que se caracteriza por una intolerancia a la glucosa y resistencia a la insulina [40]. Los gastos directos e indirectos totales atribuibles a la DT2 en los Estados Unidos superan los 132 000 millones de dólares [40]. A pesar de este problema creciente, los fabricantes de productos farmacéuticos no han podido desarrollar medicamentos que sean seguros y efectivos. Uno de los medicamentos anti-diabéticos orales más populares y efectivos es la clase de medicamentos sensibilizantes a la insulina tiazolidinediona (TZD). Aunque las TZD aumentan la sensibilidad a la insulina, tienen efectos secundarios adversos importantes que limitan su disponibilidad, que incluye el aumento de peso, la insuficiencia cardíaca congestiva, el cáncer de vejiga, la hepatotoxicidad y la retención de fluidos [41, 42]. Por ejemplo, aproximadamente el 10-15 % de los pacientes que usan TZD se ven obligados a interrumpir el tratamiento debido al edema, y el aumento del volumen extracelular por exceso de retención de fluidos también plantea un problema importante para las personas con insuficiencia cardíaca congestiva pre-existente. En 2000, la troglitazona (REZULIN®) se eliminó del mercado, 3 años después de su inicio, debido a informes de lesiones hepáticas graves y muerte [43]. Las preocupaciones de seguridad sobre otros TZD resultaron en el etiquetado obligatorio de caja negra y las subsecuentes restricciones de uso.

La LANCL2 fue el segundo miembro de la familia de proteínas similares a LanC en identificarse. El primer miembro, la LANCL1, se aisló de las membranas de eritrocitos humanos [44]. Subsecuentemente, la LANCL2 se identificó y expresó en todo el cuerpo [1, 18], que incluye las células inmunitarias, el páncreas, el pulmón y el intestino [1, 44]. La vía de la 2 tipo C de lantionina sintetasa (LANCL2) ha surgido como un nuevo objetivo terapéutico para la diabetes de tipo 2 [18]. Las pruebas preclínicas exhaustivas proporcionan una amplia evidencia del potencial terapéutico de los ligandos a la LANCL2 como el ácido abscísico (ABA) en la diabetes y las enfermedades inflamatorias crónicas [2, 3, 22, 23, 45]. El compuesto 61610, una bis(bencimidazol)tereftalanilida (BTT) se une a la LANCL2 con la mayor afinidad en una biblioteca de varios millones de sustancias químicas.

Dado que los fármacos actuales para la diabetes de tipo 2 no satisfacen la primera necesidad del paciente, que es el control glucémico, sin efectos secundarios, el BT-11 representa un potencial sustituto muy atractivo. Nuestros resultados demuestran cómo la administración de BT-11 en diferentes modelos de ratón de T2D disminuye significativamente los niveles de glucosa en sangre después de un período de ayuno (**Figuras 36 y 38**). Además, la administración de este compuesto también ayuda a normalizar los niveles de glucosa después de una prueba de glucosa (**Figuras 36 y 38**). Las propiedades antiinflamatorias de BT-11 también se reflejan en nuestros resultados de inmunofenotipificación. De hecho, la administración de BT-11 resultó en una menor infiltración de macrófagos proinflamatorios y granulocitos proinflamatorios en el WAT abdominal (**Figura 37**). Estos resultados se soportaron por datos de expresión génica de dos factores pro-inflamatorios muy importantes, el TNF α y MCP-1, que se encontraron significativamente reducidos en ratones tratados con BT-11 (**Figura 39**).

Ejemplo 24: Uso de BT-11 durante la infección por influenza

Introducción

Los patógenos respiratorios que causan neumonía son la principal causa de muerte relacionada con enfermedades infecciosas en los países industrializados. La ausencia de vacunas y antivirales efectivos, acoplado con la creciente preocupación por la aparición de resistencia a los antivirales, destaca la necesidad de desarrollar enfoques inmunoterapéuticos dirigidos al huésped. La patogenia pulmonar y la enfermedad clínica asociadas con las infecciones respiratorias a menudo resultan de una combinación de los efectos citopáticos del virus y la respuesta inmune del

huésped. Con respecto a esto, las terapias dirigidas a modular la respuesta inmune innata se consideran para el tratamiento de la gripe [46].

La influenza sigue siendo un importante problema de salud pública en todo el mundo. La influenza estacional se asocia con un proceso del tracto respiratorio superior que a menudo es incapacitante y requiere días de actividad restringida. Se ha estimado que solo en los Estados Unidos, las epidemias de gripe anuales resultan en 30 millones de visitas ambulatorias y 300,000 ingresos hospitalarios. Ciertas poblaciones (por ejemplo, niños pequeños, ancianos y personas con afecciones médicas predisponentes) tienen un mayor riesgo de desarrollar neumonía viral. Los expertos han estimado que entre 25.000 y 35.000 personas mueren anualmente a causa de la gripe estacional en los EE. UU., y se ha calculado que la carga financiera mundial es de cientos de miles de millones de dólares [47]. Los ciclos de influenza pandémica ocurren cada 30-50 años con mayor complejidad debido a su presentación impredecible y la falta de inmunidad preexistente, y se asocian con altas velocidades de mortalidad [48]. La influenza se asocia con una morbilidad y una mortalidad significativas, pero faltan tratamientos farmacológicos efectivos y seguros.

Los datos que sugieren que la de lantionina sintetasa 2 tipo componente C (LANCL2) es un objetivo para la unión y señalización de ABA [15, 19, 24]. Por lo tanto, la LANCL2 se ha convertido en un nuevo objetivo terapéutico prometedor para la modulación inmunitaria. Mediante el uso de la modelación molecular y la resonancia de plasmón de superficie (SPR), BTI ha identificado el compuesto BT-11, una bis(bencimidazol)tereftalanilida (BTT), que se une a la LANCL2 con alta afinidad. Además, el BT-11 ejerció potentes efectos pro-resolutivos en los pulmones y disminuyó la mortalidad y la morbilidad en modelos de ratón de influenza.

Métodos

Ratones. Se adquirieron ratones C57BL/6 en el Laboratorio Jackson y se alojaron bajo condiciones específicas libres de patógenos en rejillas ventiladas. Todos los protocolos experimentales se aprobaron por un comité institucional de cuidado y uso de animales y cumplieron o superaron las pautas de la política del Servicio de Salud Pública y Bienestar Animal de Laboratorio de los Institutos Nacionales de Salud.

Infección intranasal de ratones con virus de la influenza. Los ratones se anestesiaron con isoflurano al 2-5 % mediante el uso de una estación de vaporizador y 50 μ L de dilución de virus a 10^3 TCID₅₀ se administró a través de las fosas nasales (25 μ L cada una). A continuación, se colocaron los ratones en sus jaulas y se observó la recuperación de la anestesia.

Administración oral del BT-11 mediante sonda orogástrica. Se administró el BT-11 a los ratones mediante sonda orogástrica mediante el uso de una aguja de sonda de seguridad con punta de bola disponible comercialmente (calibre 18-24, en dependencia del peso del animal). Este procedimiento no causó dolor ni angustia. Los ratones se trataron con BT-11 a una dosis de 80 mg/kg cada 24 h durante la duración del experimento.

Monitoreo de los ratones y la enfermedad y pesaje. Los ratones se monitorearon una vez al día después de la infección (o cada 4 horas si desarrollaban signos clínicos graves de enfermedad equivalentes a la puntuación de enfermedad 2) y se sacrificaron antes del punto final planificado si desarrollaban signos significativos de enfermedad medidos por la pérdida de peso (es decir, un 25 % de pérdida gradual del peso corporal inicial), deshidratación, pérdida de movilidad, vigilancia/protección de la zona dolorida, pelaje erizado (piloerección). Los ratones se pesaron una vez al día durante la duración del experimento.

Resultados

La administración oral de BT-11 redujo las puntuaciones clínicas y la morbilidad en los ratones con el virus de la influenza.

Para evaluar la eficacia terapéutica de BT-11, usamos un modelo de ratón de infección por influenza en ratones. Brevemente, los ratones se infectaron por vía intranasal después de la anestesia con isoflurano al 5 %. Los ratones se trataron diariamente con una suspensión oral de BT-11 a 80 o 40 mg/kg. Los ratones se pesaron y puntuaron durante la duración del experimento (16 días). Los resultados demuestran cómo la administración de BT-11 redujo significativamente la puntuación clínica de actividad a partir del día 3 y durante todo el experimento (**Figura 40, panel A**). Además, la puntuación clínica del aspecto físico se redujo significativamente en los ratones que recibieron el tratamiento con 40 y 80 mg/kg de BT-11 (**Figura 40, panel B**).

Para evaluar el efecto del tratamiento en la morbilidad de la enfermedad, calculamos el porcentaje de pérdida de peso y evaluamos adicionalmente el número de ratones que perdieron más del 15 % dentro de cada grupo experimental. A partir del día 6 después de la infección, el tratamiento con 80 mg/kg de BT-11 resultó en una menor morbilidad en comparación con el grupo de vehículo. Las diferencias se acentuaron a partir del día 10 y hasta el día 12 (**Figura 40, panel C**).

Discusión

Los enfoques tradicionales para controlar la propagación y la enfermedad de la influenza se centran en el lado del virus mediante la vacunación y el tratamiento antivírico. Las vacunas deben formularse anualmente en base a las cepas circulantes de la temporada anterior. Sin embargo, se necesitan entre 4 y 6 meses para producir, autorizar y probar la eficacia de una nueva vacuna [49], ya sea para la gripe estacional o pandémica. La principal desventaja de los antivirales es la aparición y selección muy frecuente de cepas resistentes. Adicionalmente a los tratamientos centrados en el virus, el desarrollo de terapias en base al control de las respuestas exacerbadas del huésped tiene una posibilidad muy alta de ser adoptado para complementar las estrategias antimicrobianas y profilácticas. Los productos terapéuticos dirigidos al huésped tienen la ventaja de ofrecer protección cruzada entre diferentes reactivaciones y, por tanto, ser eficaces de una temporada a otra, pueden producirse y almacenarse, y pueden usarse para tratar la enfermedad después de la exposición al virus [46, 50, 51].

La identificación de la LANCL2 como un nuevo objetivo terapéutico para la influenza abre una nueva vía para los productos terapéuticos dirigidos al huésped. Demostramos que la activación de la LANCL2 por el BT-11 mejora no solo la actividad y las puntuaciones clínicas, sino que también disminuye las morbilidades causadas por el virus de la influenza y acelera la recuperación de la infección por influenza (Figura 33). Estos resultados soportan firmemente que la LANCL2 es un nuevo objetivo terapéutico para la influenza y el BT-11 es un nuevo fármaco potencial dirigido al huésped.

REFERENCIAS

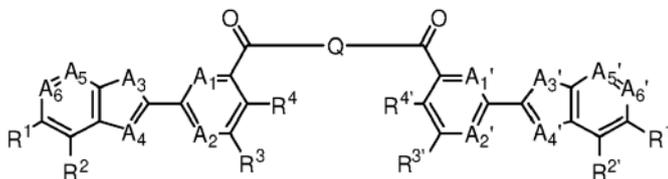
1. Mayer, H., M. Pongratz, y R. Prohaska, Molecular cloning, characterization, and tissue-specific expression of human LANCL2, a novel member of the Lan C-like protein family. *DNaseq*, 2001.12(3):p.161-6.
2. Guri, A.J., y otros, Dietary abscisic acid ameliorates glucose tolerance and obesity-related inflammation in db/db mice fed high-fat diets. *Clin Nutr*, 2007.26(1):p.107-16.
3. Guri, A.J., y otros, Loss of PPARgamma in immune cells impairs the ability of abscisic acid to improve insulin sensitivity by suppressing monocyte chemoattractant protein-1 expression and macrophage infiltration into white adipose tissue. *J Nutr Biochem*, 2008.19(4):p.216-28.
4. Bassaganya-Riera, J., y otros, Mechanisms of action and medicinal applications of abscisic Acid. *Curr Med Chem*, 2010.17(5):p.467-78.
5. Guri, A.J., R. Hontecillas, y J. Bassaganya-Riera, Abscisic acid synergizes with rosiglitazone to improve glucose tolerance and down-modulate macrophage accumulation in adipose tissue: possible action of the cAMP/PKA/PPARgamma axis. *Clin Nutr*, 2010. 29(5):p.646-53.
6. Guri, A.J., R. Hontecillas, y J. Bassaganya-Riera, Abscisic acid ameliorates experimental IBD by downregulating cellular adhesion molecule expression and suppressing immune cell infiltration. *Clin Nutr*, 2010. 29(6):p.824-31.
7. Guri, A.J., y otros, Abscisic acid ameliorates atherosclerosis by suppressing macrophage and CD4+ T cell recruitment into the aortic wall. *J Nutr Biochem*, 2010. 21(12):p.1178-85.
8. Bassaganya-Riera, J., y otros, Abscisic acid regulates inflammation via ligand-binding domain-independent activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *J Biol Chem*, 2011. 286(4):p.2504-16.
9. Guri, A.J., y otros, T cell PPARgamma is required for the anti-inflammatory efficacy of abscisic acid against experimental IBD. *J Nutr Biochem*, 2011. 22(9):p.812-9.
10. Lu, P., y otros, Molecular modeling of lanthionine synthetase component C-like protein 2: a potential target for the discovery of novel type 2 diabetes prophylactics and therapeutics. *J Mol Model*, 2011. 17(3):p.543-53.
11. Hontecillas, R., y otros, Dietary abscisic acid ameliorates influenza-virus-associated disease and pulmonary immunopathology through a PPARgamma-dependent mechanism. *J Nutr Biochem*, 2013.24(6):p.1019-27.
12. Lu, P., y otros, Computational modeling-based discovery of novel classes of anti-inflammatory drugs that target lanthionine synthetase C-like protein 2. *PLoSOne*, 2012. 7(4):p.e34643.
13. Lu, P., y otros, Lanthionine synthetase component C-like protein 2: a new drug target for inflammatory diseases and diabetes. *Curr Drug Targets*, 2014.15(6):p.565-72.
14. Trott, O. y A.J. Olson, AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *J Comput Chem*, 2010.31(2):p.455-61.
15. Lu, P., y otros, Molecular modeling of lanthionine synthetase component C-like 2: a potential target for the discovery of novel type 2 diabetes prophylactics and therapeutics. *Journal of Molecular Modeling*, 2011.17(3):p.543-53.

16. Morris, G.M., y otros, AutoDock4 and AutoDock Tools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *J Comput Chem*, 2009.30(16):p.2785-91.
- 5 17. Lichtenstein, G.R., M. Abreu, y D. Present, Recent advances in the treatment of Crohn's colitis, 2003, The center for health care education, LLC.
18. Lu, P., y otros, Lanthionine Synthetase Component C-like Protein 2: A New Drug Target for Inflammatory Diseases and Diabetes. *Curr Drug Targets*, 2014.
- 10 19. Sturla, L., y otros, LANCL2 is necessary for abscisic acid binding and signaling in human granulocytes and in rat insulinoma cells. *J Biol Chem*, 2009.284(41):p.28045-57.
20. Hanauer, S.B. y D.H. Present, The state of the art in the management of inflammatory bowel disease. *Rev Gastroenterol Disord*, 2003.3(2):p.81-92.
- 15 21. Lindsay, J.O. y H.J. Hodgson, Review article: the immunoregulatory cytokine interleukin-10—a therapy for Crohn's disease? *Aliment Pharmacol Ther*, 2001.15(11):p.1709-16.
22. Guri, A.J., R. Hontecillas, y J. Bassaganya-Riera, Abscisic acid ameliorates experimental IBD by downregulating cellular adhesion molecule expression and suppressing immune cell infiltration. *Clinical Nutrition*, 2010.29(6):p.824-31.
- 20 23. Guri, A.J., y otros, T cell PPARgamma is required for the anti-inflammatory efficacy of abscisic acid against experimental inflammatory bowel disease. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 2011.22(9):p.812-9.
- 25 24. Bassaganya-Riera, J., y otros, Abscisic acid regulates inflammation via ligand-binding domain-independent activation of PPARgamma. *Journal of Biological Chemistry*, 2011.286(4):p.2504-16.
25. Lu, P., y otros, Computational modeling-based discovery of novel classes of anti-inflammatory drugs that target LANCL2. *PLoSOne*, 2012. In Press.
- 30 26. Stenson, W.F., Interleukin-4 hyporesponsiveness in inflammatory bowel disease: immune defector physiological response? *Gastroenterology*, 1995.108(1):p.284-6.
27. Cohen, R.D., y otros, The cost of hospitalization in Crohn's disease. *Am J Gastroenterol*, 2000.95(2):p.524-30.
- 35 28. Barba, G., y otros, Recurrent pancreatitis revealing Crohn's disease. *Arch Pediatr*, 2002.9(10):p.1053-5.
29. Braverman, I.M., Skin signs of gastrointestinal disease. *Gastroenterology*, 2003.124(6):p.1595-614.
- 40 30. Marri, S.R. y A.L. Buchman, The education and employment status of patients with inflammatory bowel diseases. *Inflamm Bowel Dis*, 2005.11(2):p.171-7.
31. Spunt, S., y otros, Cancer Epidemiology in Older Adolescents and Young Adults 15 to 29 Years of Age, in SEERAYA Monograph. 2008, National Cancer Institute: Bethesda, MD.p.123-133.
- 45 32. Camilleri, M., GI clinical research 2002-2003: The year in review. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 2003.1:p.415-420.
33. Guri, A.J., R. Hontecillas, y J. Bassaganya-Riera, Abscisic acid synergizes with rosiglitazone to improve glucose tolerance and down-modulate macrophage accumulation in adipose tissue: possible action of the cAMP/PKA/PPARgamma axis. *Clinical Nutrition*, 2010.29(5):p.646-653.
- 50 34. Bruzzone, S., y otros, Abscisic Acid Is an Endogenous Stimulator of Insulin Release from Human Pancreatic Islets with Cyclic ADP Ribose as Second Messenger. *J Biol Chem*, 2008.283(47):p.32188-32197.
- 55 35. Sturla, L., y otros, Binding of abscisic acid to human LANCL2. *Biochem Biophys Res Commun*, 2011.415(2):p.390-5.
36. Sparre, T., y otros, Unraveling the pathogenesis of type 1 diabetes with proteomics: present and future directions. *Mol Cell Proteomics*, 2005.4(4):p.441-57.
- 60 37. Vehik, K., y otros, Increasing incidence of type 1 diabetes in 0- to 17-year-old Colorado youth. *Diabetes Care*, 2007.30(3):p.503-9.
- 65 38. Ma, R.C. y J.C. Chan, Diabetes: incidence of childhood type 1 diabetes: a worrying trend. *Nat Rev Endocrinol*, 2009.5(10):p.529-30.

39. Suarez-Pinzon, W.L., J.R. Lakey, y A. Rabinovitch, Combination therapy with glucagon-like peptide-1 and gastrin induces beta-cell neogenesis from pancreatic duct cells in human islets transplanted in immunodeficient diabetic mice. *Cell Transplant*, 2008.17(6):p.631-40.
- 5 40. CDC. National Diabetes Fact Sheet: general information and national estimates on diabetes in the United States, 2005. In U.S. Department of Health and Human Services, Center for Disease Control and Prevention, 2005.2005. Atlanta, Georgia.
- 10 41. Bassaganya-Riera, J.,A. Guri,J. King, y R. Hontecillas, Peroxisome Proliferator-Activated Receptors: the Nutritionally Controlled Molecular Networks that Integrate Inflammation, Immunity and Metabolism. *Current Nutrition & Food Science.*, 2005.1:p.179-187.
- 15 42. Nesto, R.W., y otros, Thiazolidinedione use, fluid retention, and congestive heart failure: a consensus statement from the American Heart Association and American Diabetes Association. October 7, 2003. *Circulation*, 2003.108(23):p.2941-8.
43. Wysowski, D.K., G. Armstrong, y L. Governale, Rapid increase in the use of oral antidiabetic drugs in the United States,1990-2001. *Diabetes Care*, 2003.26(6):p.1852-5.
- 20 44. Mayer, H., y otros, Isolation, molecular characterization, and tissue-specific expression of a novel putative G protein-coupled receptor. *Biochim Biophys Acta*, 1998.1395(3):p.301-8.
- 25 45. Hontecillas, R., y otros, Dietary abscisic acid ameliorates influenza virus-associated disease and pulmonary immunopathology through a PPAR γ -dependent mechanism. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 2012.24(6):p.1019-27.
46. Enserink M. Infectious disease. Old drugs losing effectiveness against flu; could statins fill gap? *Science*. 2005 Sep 23; 309(5743):1976-7.
- 30 47. Rothberg, M.B., S.D. Haessler, and R.B. Brown, Complications of viral influenza. *Am J Med*. 2008.121(4):p.258-64.
48. Dawood FS, y otros Estimated global mortality associated with the first 12 months of 2009 pandemic influenza AH1N1 virus circulation: a modelling study. *Lancet Infect Dis*. 2012 Sep;12(9):687-95.
- 35 49. Quigley, E., Influenza therapies: vaccines and antiviral drugs. *Drug Discov Today*, 2006.11(11-12):p.478-80.
50. Butler D. Cheaper approaches to flu divide researchers. *Nature*. 2007 Aug 30; 448(7157):976-7.
- 40 51. Fedson DS. Confronting an influenza pandemic within expensive generic agents: can it be done? *Lancet Infect Dis*. 2008 Sep; 8(9):571-6.
52. Melo F, Feytmans E. Assessing protein structures with a non-local atomic interaction energy. *J Mol Biol*. 1998 Apr 17; 277(5):1141-52.
- 45 53. SMILES Translator and Converter. <http://cactus.nci.nih.gov/translate/>.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de la fórmula:



o una sal o éster farmacéuticamente aceptable de este, en donde:

Q es piperazina-1,4-diilo; 2,5-diazabicyclo[2.2.1]heptano-2,5-diilo; 2,5-diazabicyclo[2.2.2]octano-2,5-diilo; 1,4-diazepano-1,4-diilo; benceno-1,4-diamina-N¹,N⁴-diilo; etano-1,2-diamina-N¹,N²-diilo; N¹,N²-dialquiletano-1,2-diamina-N¹,N²-diilo; propano-1,3-diamina-N¹,N³-diilo; N¹,N³-dialquilpropano-1,3-diamina-N¹,N³-diilo; 1,4-diaminoantraceno-9,10-diona-1,4-diilo; C₆ areno-1,4-diamina-N¹,N⁴-diilo en donde el areno está sustituido con uno a cuatro sustituyentes en las posiciones 2, 3, 5 o 6 y en donde los sustituyentes se seleccionan independientemente del grupo que consiste en -C(O)O(C₁ a C₆)alquilo, OH, O(C₁ a C₆)alquilo, (C₁ a C₆)alquilo, CF₃, F, Cl y Br; o piperazina-1,4-diilo sustituido en donde la piperazina está sustituida con uno a ocho sustituyentes en las posiciones 2, 3, 5 o 6 y en donde los sustituyentes se seleccionan independientemente del grupo que consiste en (C₁ a C₆)alquilo, arilo, aril(C₁ a C₆)alquilo, C(O)OH y C(O)O(C₁ a C₆)alquilo;

A₁ y A₁' son cada uno independientemente N o CR⁶;

A₂ y A₂' son cada uno independientemente N o CR⁷;

A₃ es NR⁸;

A₃' es NR⁸, O, o S;

A₄ y A₄' son cada uno independientemente N o CR⁹;

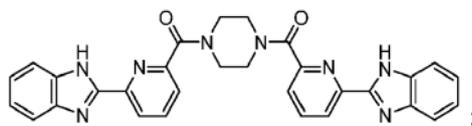
A₅ y A₅' son cada uno independientemente N o CR¹⁰;

A₆ y A₆' son cada uno independientemente N o CR¹¹; y

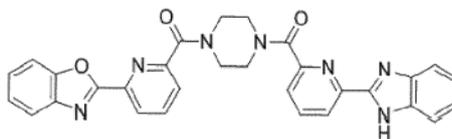
R¹, R¹', R², R²', R³, R³', R⁴, R⁴', R⁶, R⁷, R⁸, R⁹, R¹⁰ y R¹¹, si están presentes, se seleccionan en cada caso independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo, halo, trifluorometilo, dialquilamino en donde cada alquilo es igual o diferente, -NH₂, alquilamino y arilalquilo.

2. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en donde uno o ambos de A₁ y A₁' es N.
3. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 2, en donde uno o ambos de A₂ y A₂' es CH, A₃ es NH, A₄ es N, A₅ es CH y A₆ es CH.
4. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 2, en donde uno o ambos de A₂ y A₂' es CH, uno o ambos de A₃ y A₃' es NH, uno o ambos de A₄ y A₄' es N, uno o ambos de A₅ y A₅' es CH, y uno o ambos de A₆ y A₆' es CH.
5. El compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde Q es piperazina-1,4-diilo; 2,5-diazabicyclo[2.2.1]heptano-2,5-diilo; 2,5-diazabicyclo[2.2.2]octano-2,5-diilo; 1,4-diazepano-1,4-diilo; N¹,N²-dialquiletano-1,2-diamina-N¹,N²-diilo; N¹,N³-dialquilpropano-1,3-diamina-N¹,N³-diilo; 1,4-diaminoantraceno-9,10-diona-1,4-diilo; C₆ areno-1,4-diamina-N¹,N⁴-diilo en donde el areno está sustituido con uno a cuatro sustituyentes en las posiciones 2, 3, 5 o 6 y cada sustituyente se selecciona independientemente del grupo que consiste en -C(O)O(C₁ a C₆)alquilo, OH, O(C₁ a C₆)alquilo, (C₁ a C₆)alquilo, CF₃, F, Cl y Br; o piperazina-1,4-diilo sustituido en donde la piperazina está sustituida con uno a ocho sustituyentes en las posiciones 2, 3, 5 o 6 y cada sustituyente se selecciona independientemente del grupo que consiste en (C₁ a C₆)alquilo, arilo, aril(C₁ a C₆)alquilo, C(O)OH y C(O)O(C₁ a C₆)alquilo.
6. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en donde R¹, R¹', R², R²', R³, R³', R⁴, R⁴', R⁶, R⁷, R⁸, R⁹, R¹⁰ y R¹¹, si están presentes, se seleccionan en cada caso independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo, halo y trifluorometilo.
7. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el compuesto tiene la estructura de:

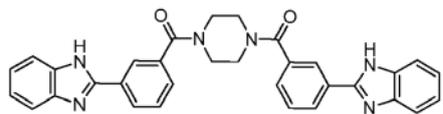
5



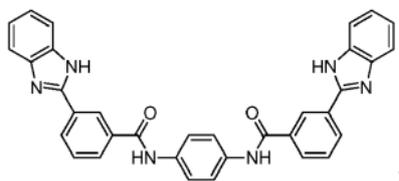
10



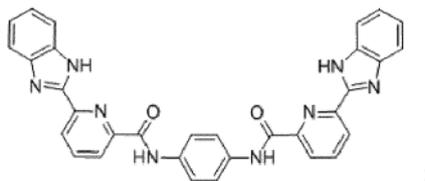
15



20



25



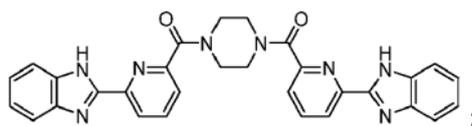
30

o
sales de este.

35

8. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el compuesto tiene la estructura de:

40



45

o
una sal de este.

9. Un compuesto como se reivindicó en cualquier reivindicación anterior, para usar en un método de tratamiento de una enfermedad infecciosa, una enfermedad autoinmunitaria, diabetes o una enfermedad inflamatoria crónica.

50

10. El compuesto para usar de acuerdo con la reivindicación 9, para usar en un método de tratamiento de una enfermedad infecciosa, en donde la enfermedad infecciosa comprende una enfermedad viral, en donde opcionalmente la enfermedad viral comprende una infección por influenza.

55

11. El compuesto para usar de acuerdo con la reivindicación 9, para usar en un método de tratamiento de una enfermedad autoinmunitaria, en donde la enfermedad autoinmunitaria comprende una enfermedad inflamatoria autoinmunitaria, y en donde la enfermedad inflamatoria autoinmunitaria comprende la enfermedad inflamatoria intestinal.

60

12. El compuesto para usar de acuerdo con la reivindicación 11, en donde la enfermedad inflamatoria autoinmunitaria es la colitis ulcerosa.

13. El compuesto para usar de acuerdo con la reivindicación 11, en donde la enfermedad inflamatoria autoinmunitaria es la enfermedad de Crohn.

65

14. El compuesto para usar de acuerdo con la reivindicación 9, para usar en un método de tratamiento de la diabetes, en donde la diabetes es la diabetes de tipo 1 o la diabetes de tipo 2.
- 5 15. El compuesto para usar de acuerdo con la reivindicación 9, para usar en un método de tratamiento de una enfermedad inflamatoria crónica, en donde la enfermedad inflamatoria crónica comprende el síndrome metabólico.

Ejemplo Núm.	Nombre del compuesto	Estructura	Afinidad de unión a la LANCL2 predicha	Afinidad a la LANCL2 por SPR (Kd)
1	BT-11		-11,2	7,7
2	BT-12		-10,9	NB ^{*1}
3	BT-14		-9,3	NB ^{*1}
4	BT-15		-9,9	11,4
5	BT-13		-7,2	NB ^{*1}
6	BT-4		-9,8	84,3
7	BT-6		-8,6	18,2
8	BT-16		-7,6	4,85e-06
9	BT-3		-10,1	No medido

*1 : NB se refiere a « Sin unión »

Figura 1A

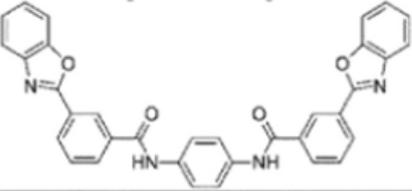
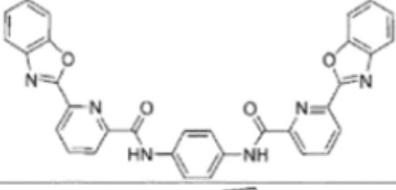
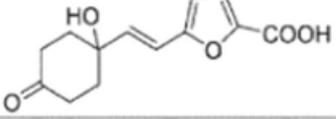
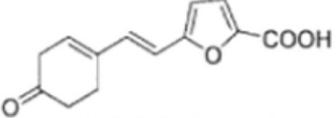
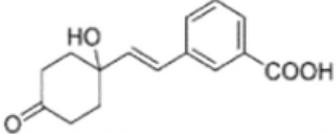
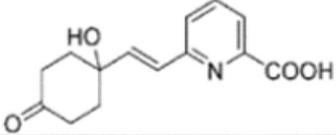
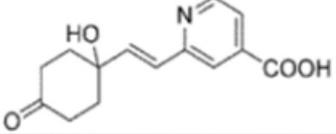
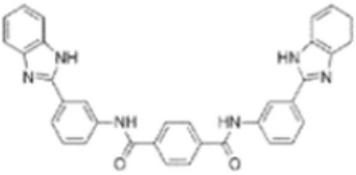
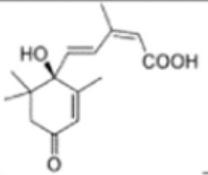
Ejemplo Núm.	Nombre del compuesto	Estructura	Afinidad de unión a la LANCL2 predicha	Afinidad a la LANCL2 por SPR (Kd)
10	BT-5		-8,9	No medido
11	BT-17		-7,6	No medido
12	BT-ABA-25		-7,5	1,77e-04
13	BT-ABA-5a		-9,5	1,17e-05
14	BT-ABA-6		-7,5	163
15	BT-ABA-13		-7,6	4,65e-06
16	BT-ABA-16		-7,6	4,85e-06
REF 18	61610	 N1,N4-bis(3-(1H-benzo[d]imidazol-2-yl)fenil)tereftalamida	-9,1	6,2
REF 18	ABA		-7,5	2,3

Figura 1B

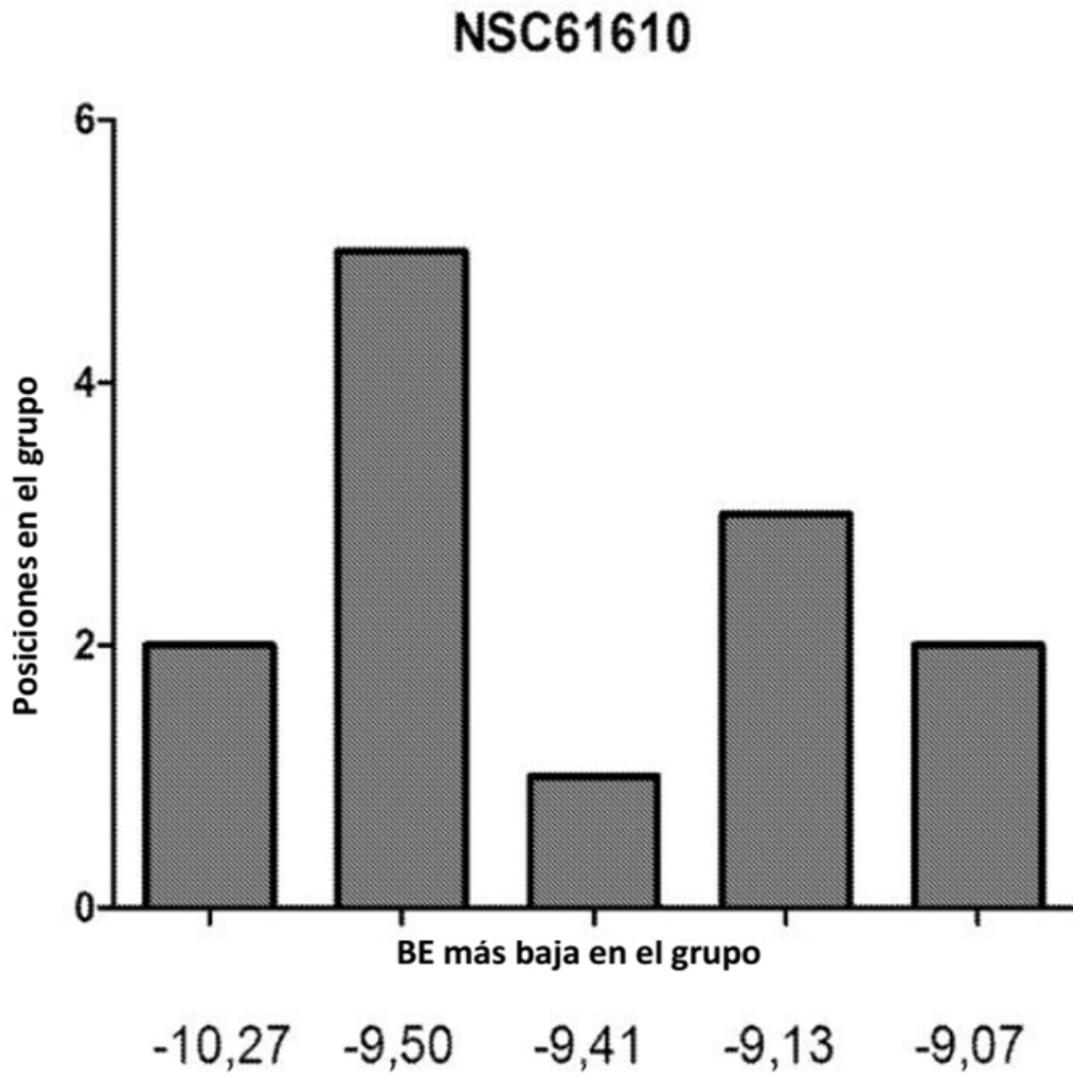


Figura 2

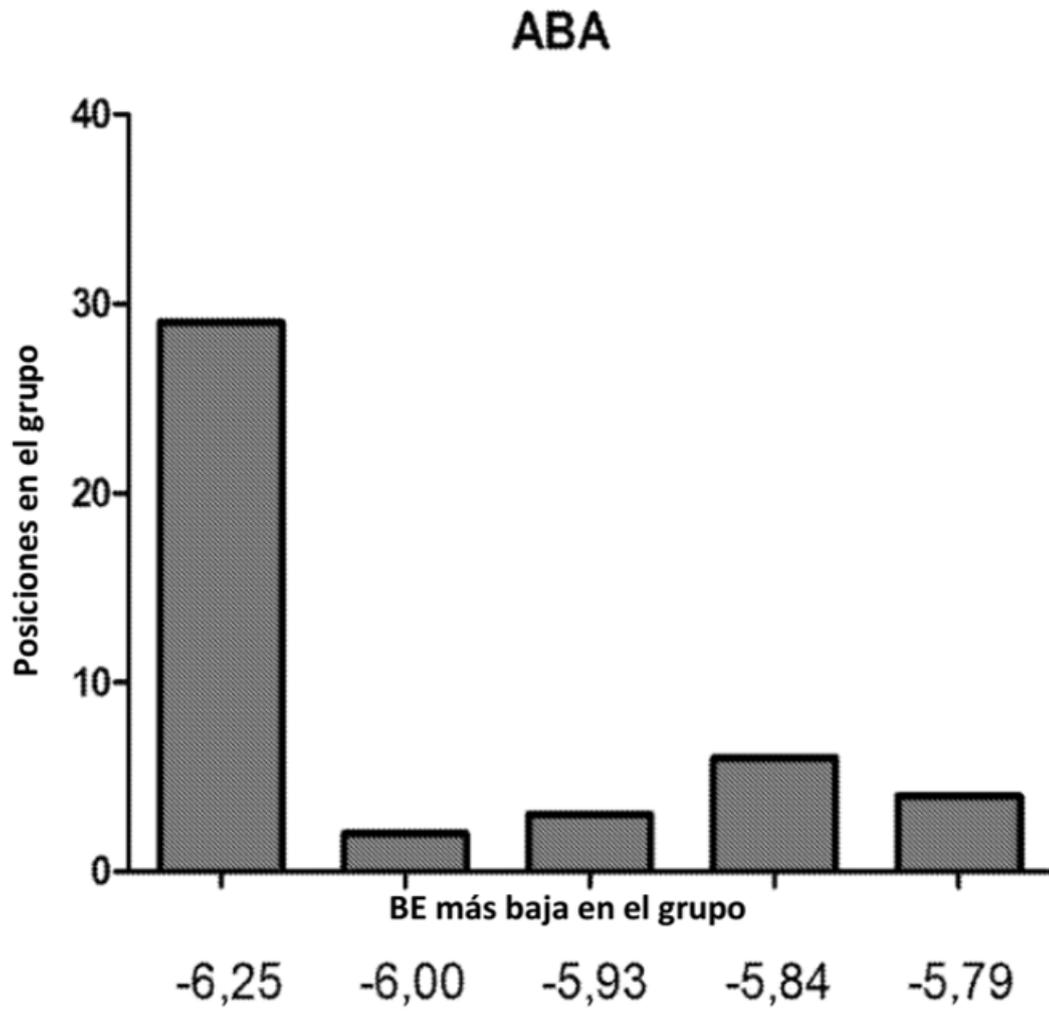


Figura 3

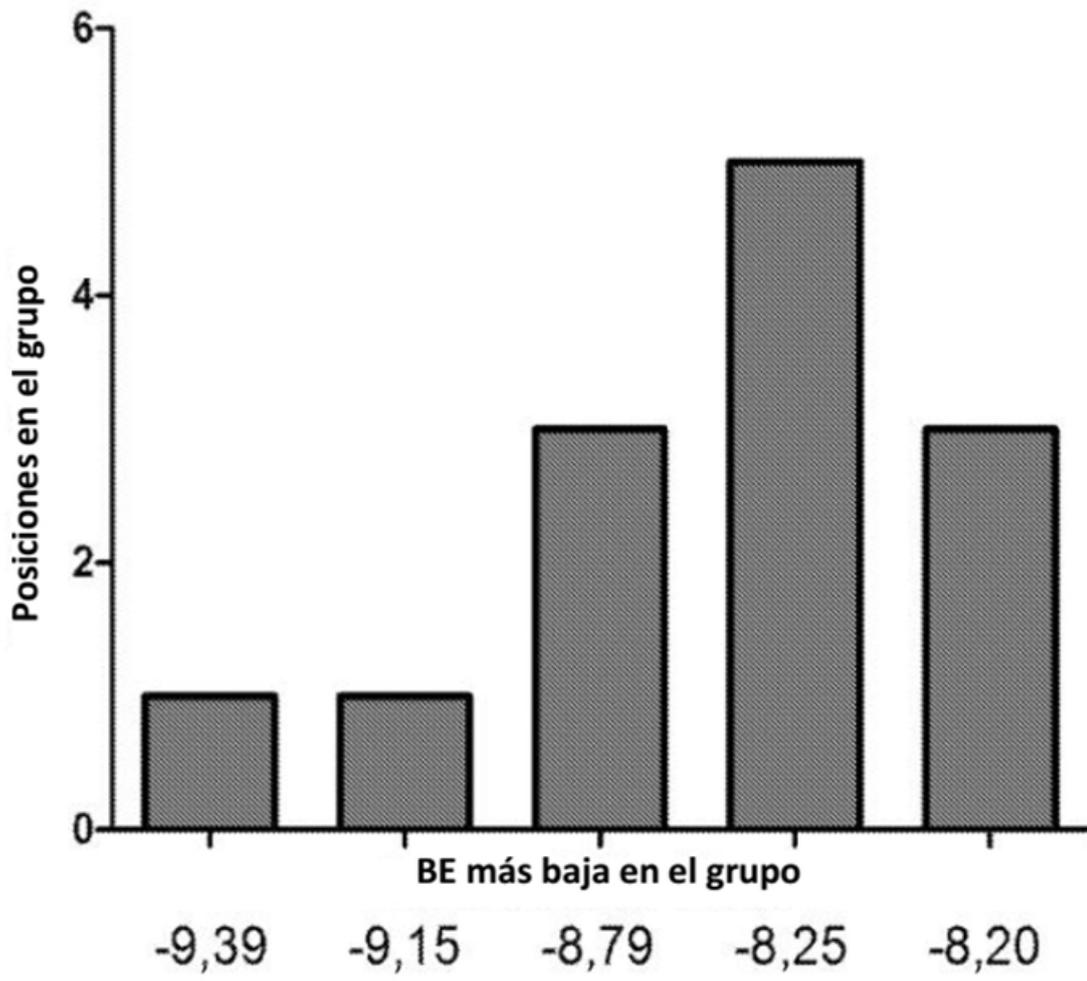


Figura 4

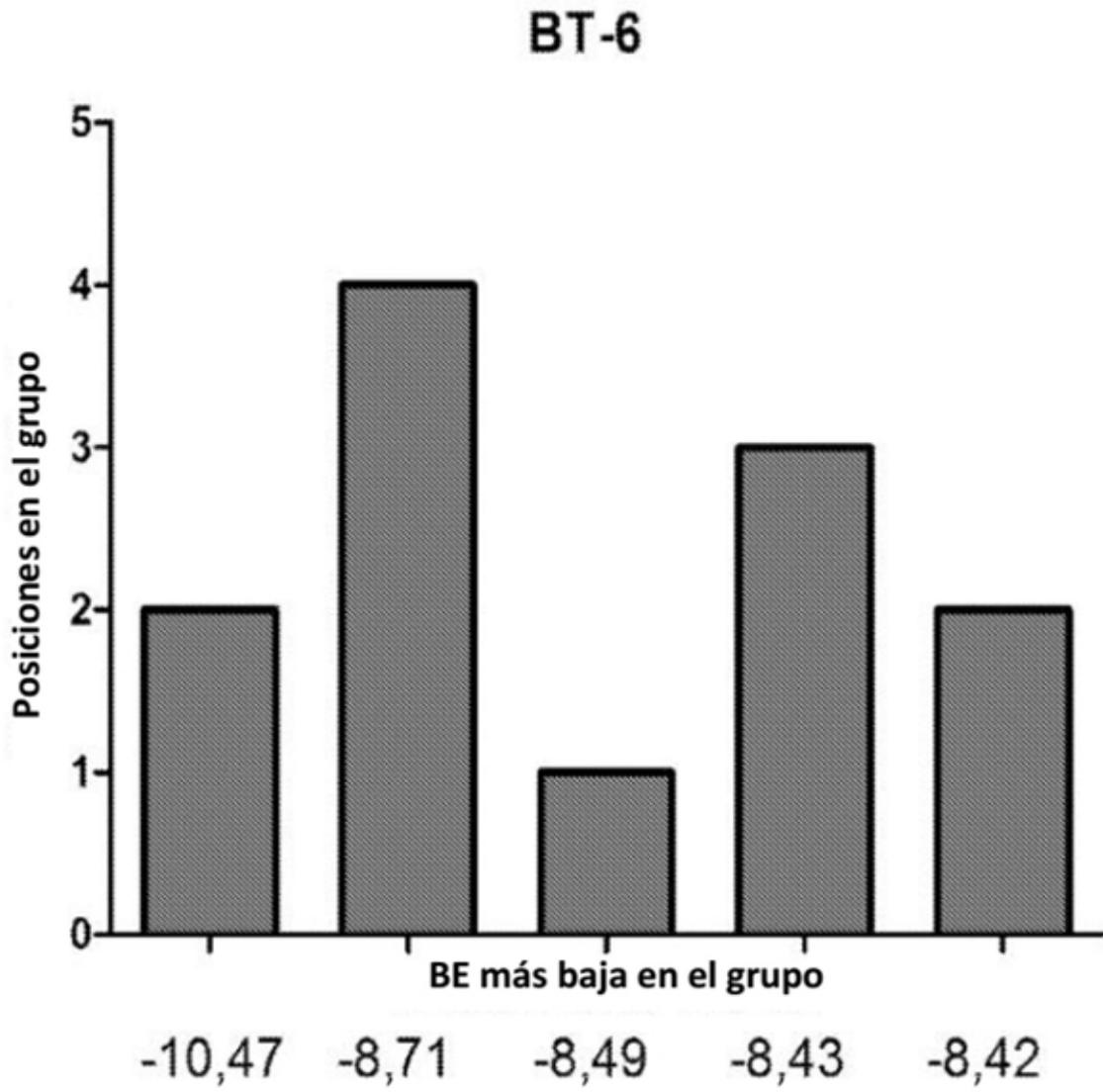


Figura 5

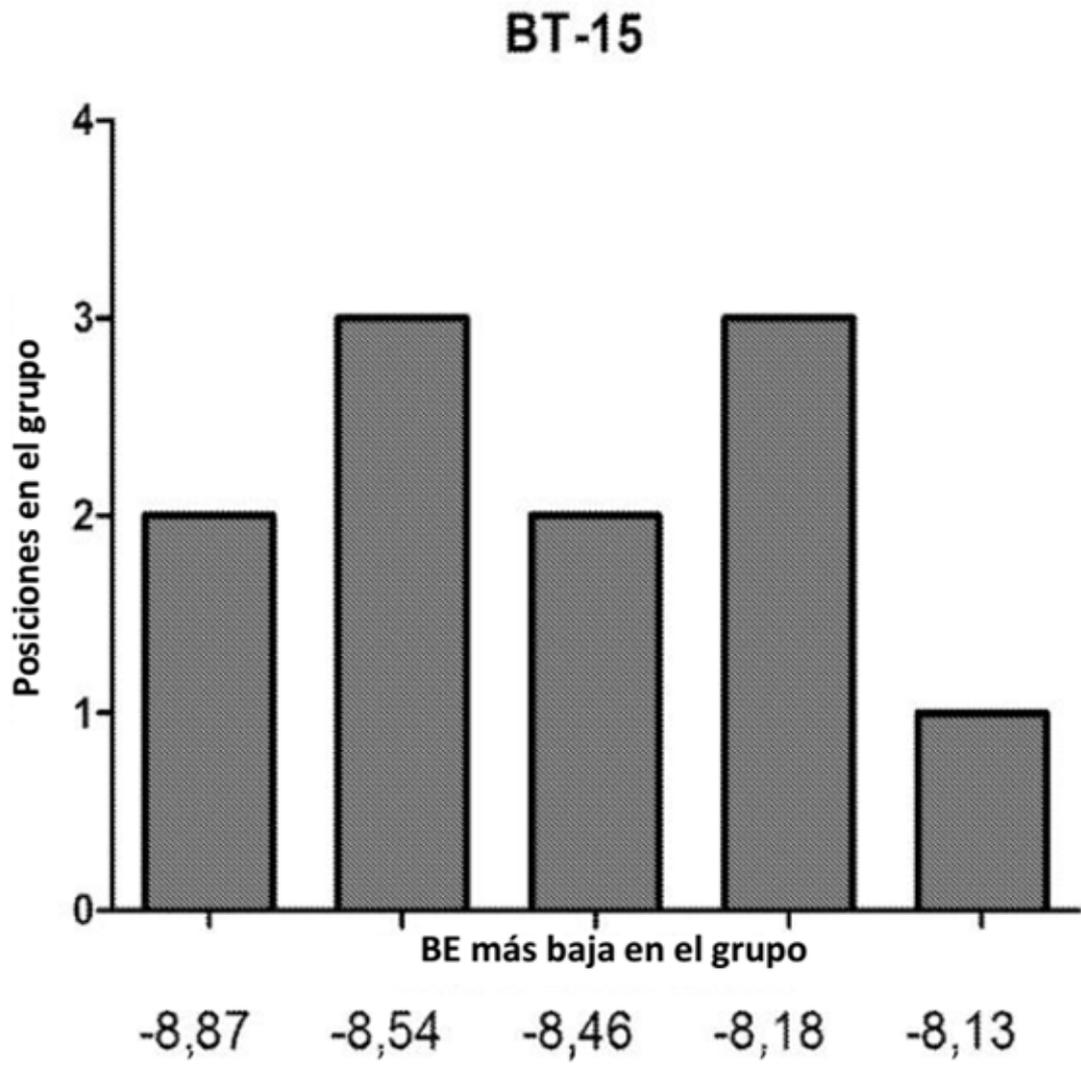


Figura 6

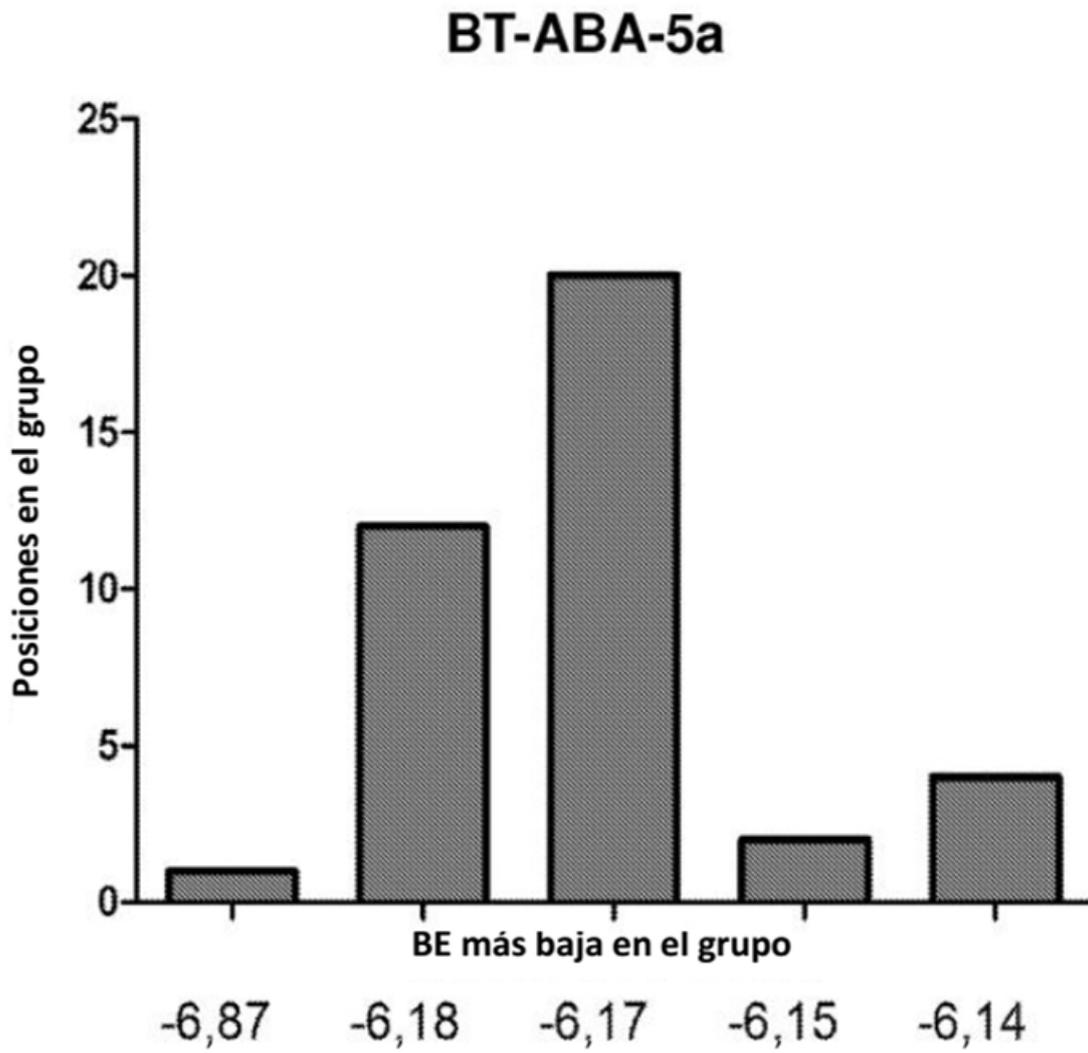


Figura 7

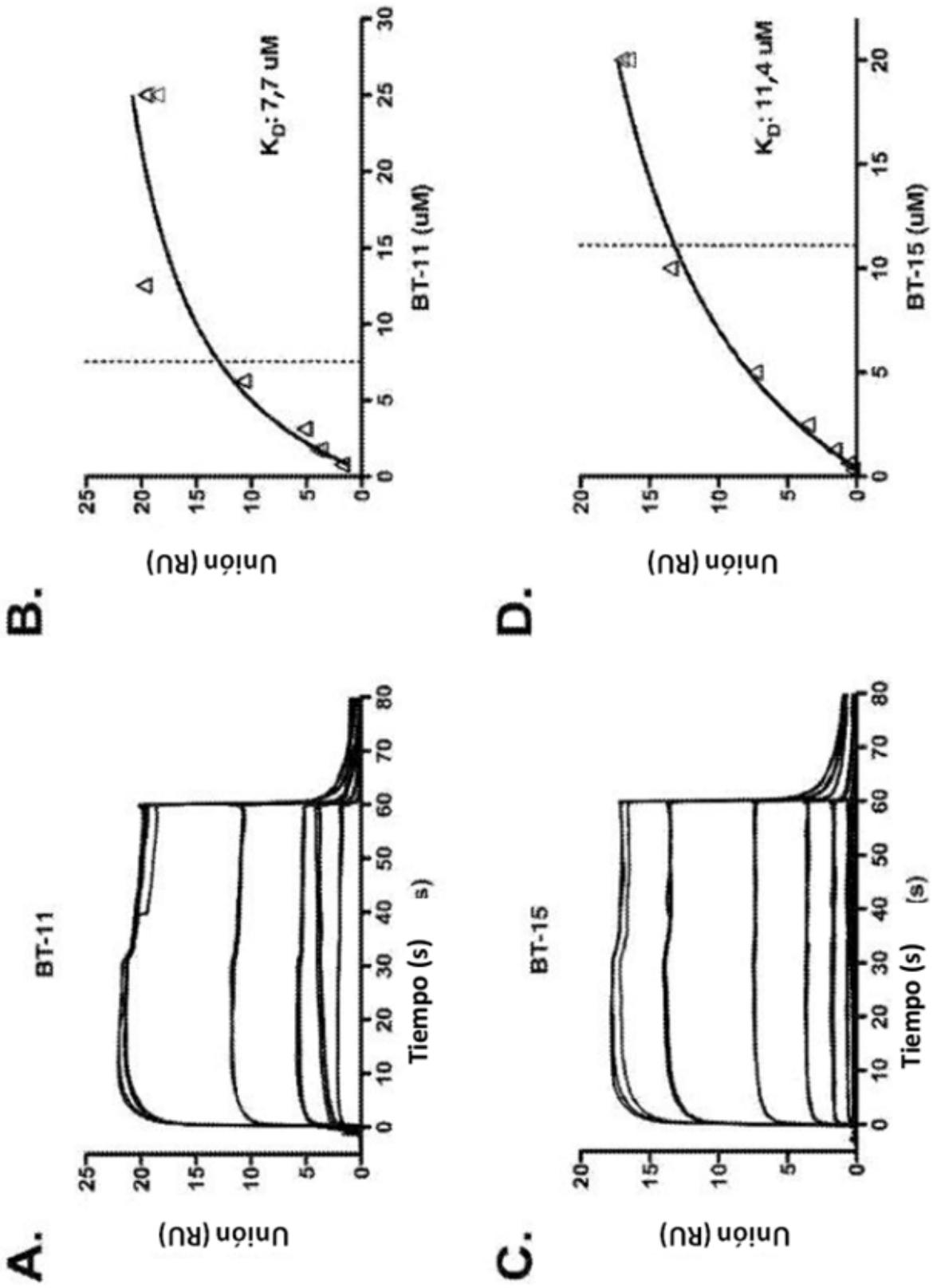
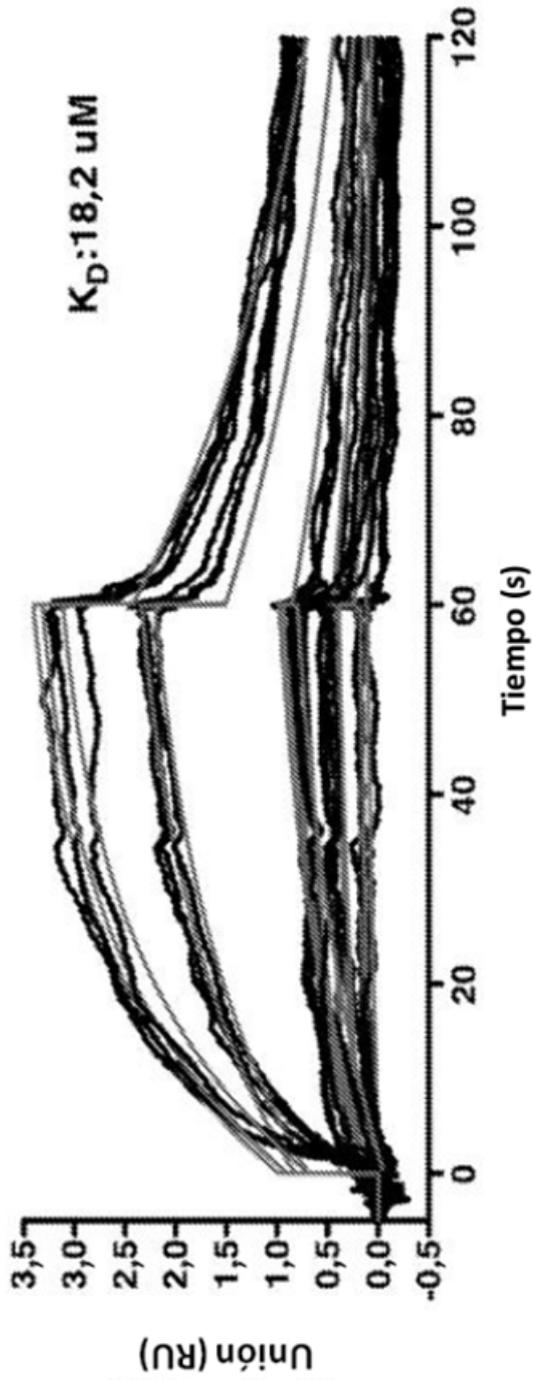


Figura 8

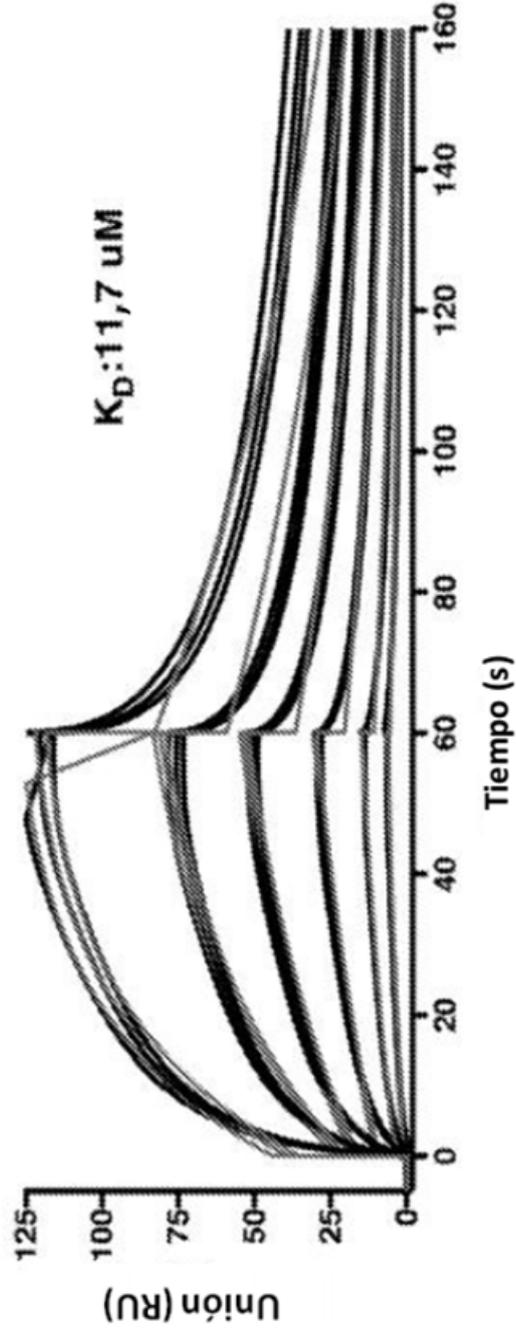
Unión del BT-6 a la LANCL2



ka (1/Ms): 1133; kd (1/s): 0,02057; K_D (M): $1,816 \cdot 10^{-5}$; χ^2 (RU²): 0,0369 Valor-U :7

Figura 9A

Unión del BT-ABA-5a a la LANCL2



k_a (1/Ms): 924; k_d (1/s): 0,01083; K_D (M): $1,173 \cdot 10^{-5}$; χ^2 (RU²): 7,25 Valor-U :2

Figura 9B

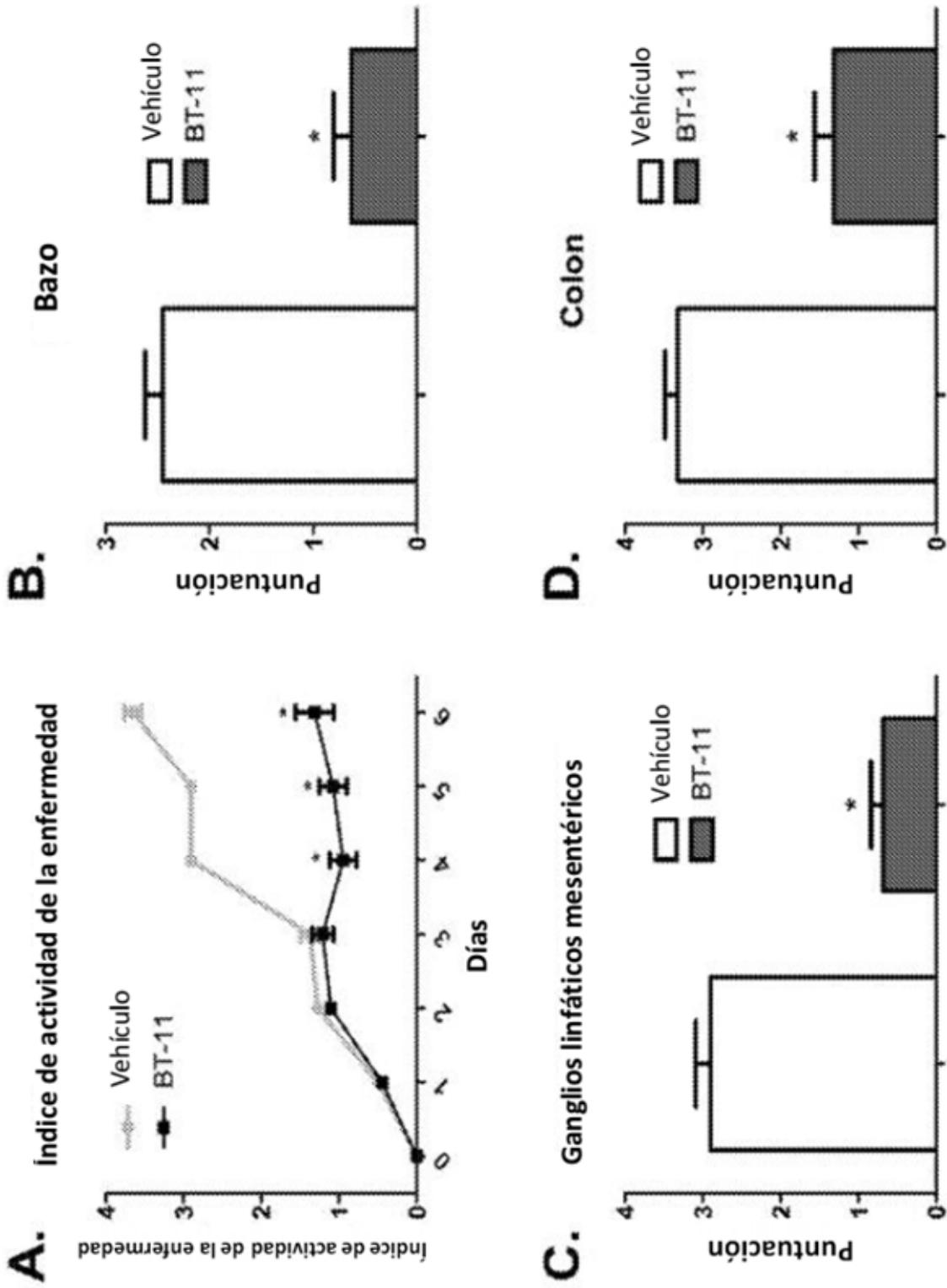


Figura 10

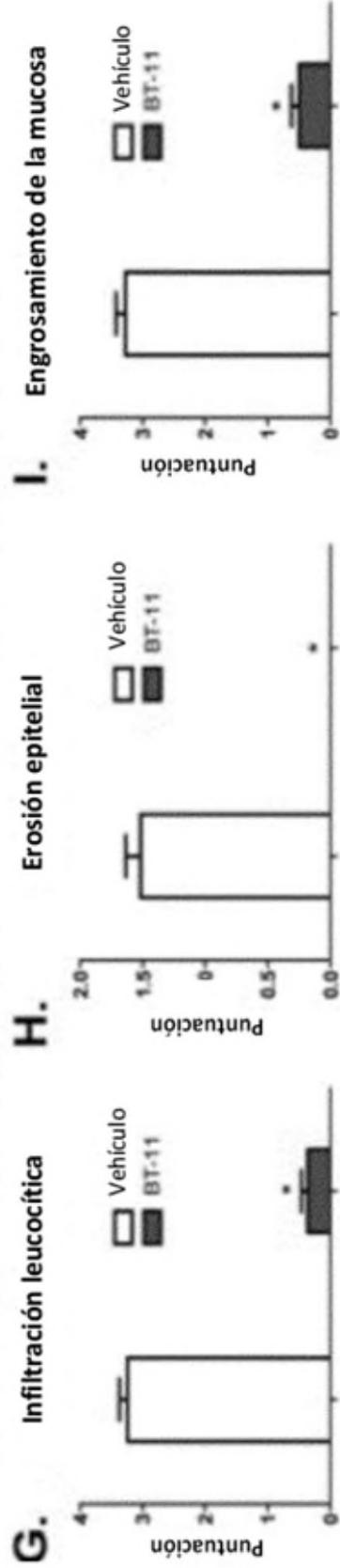
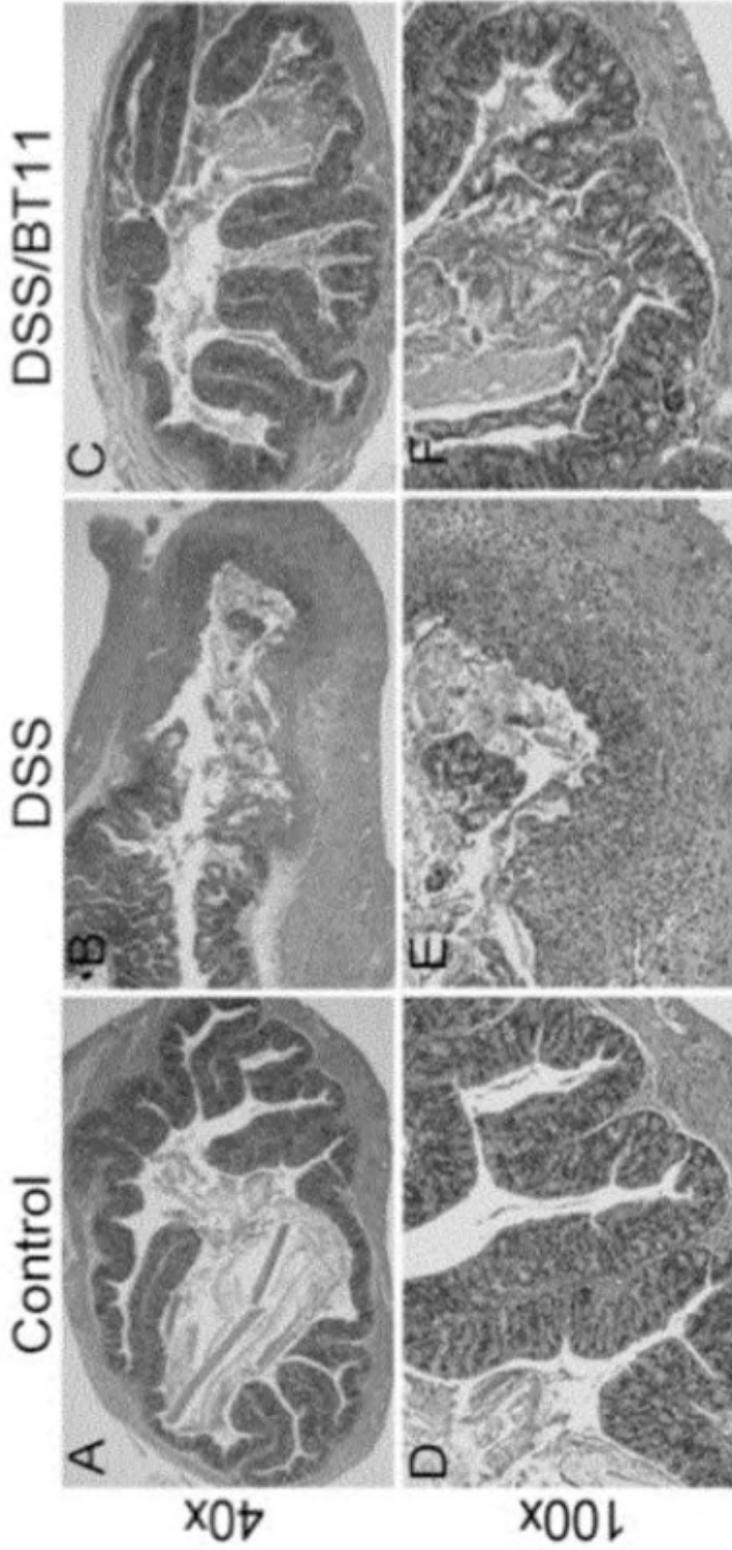


Figura 11

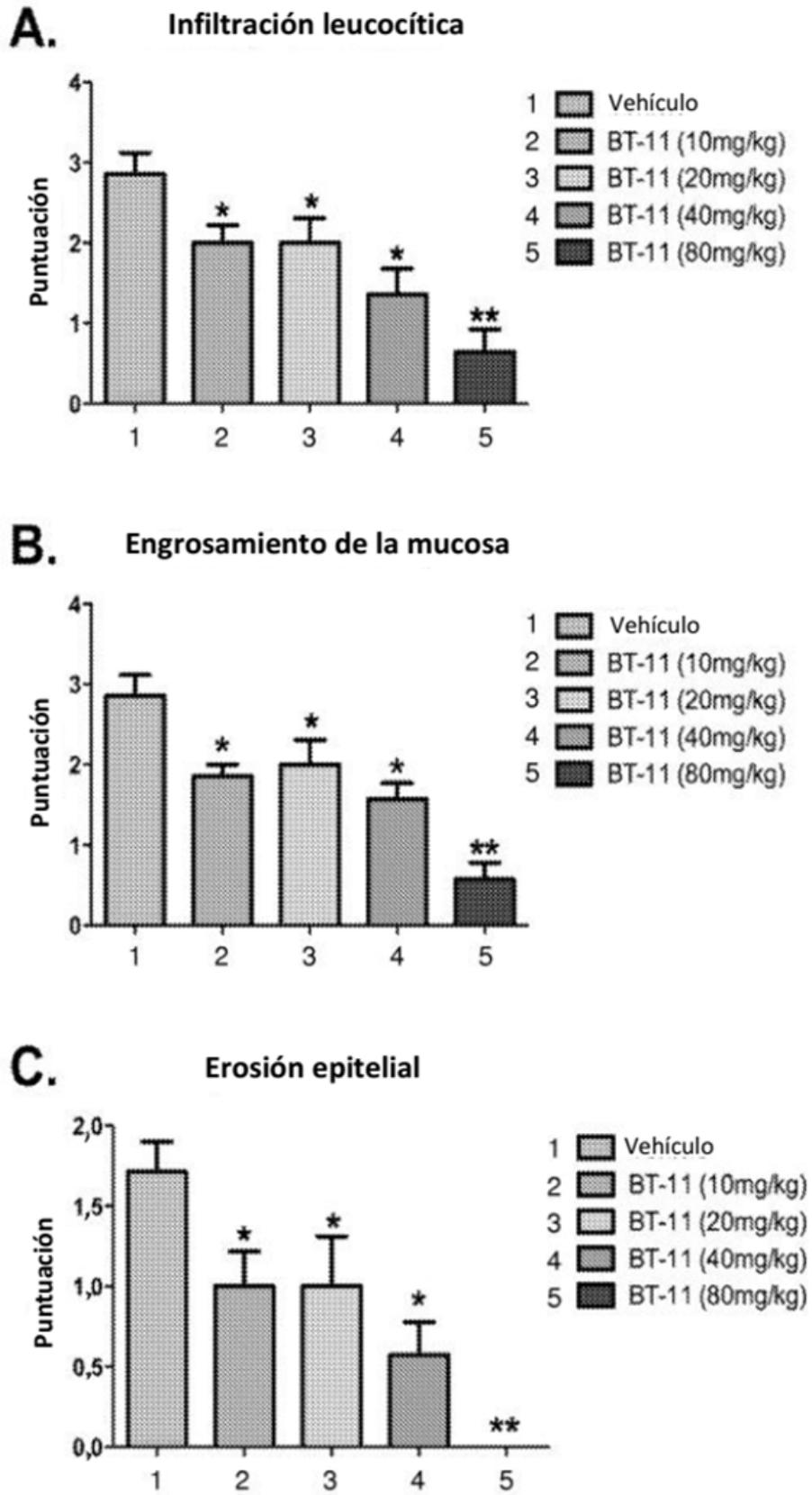


Figura 12

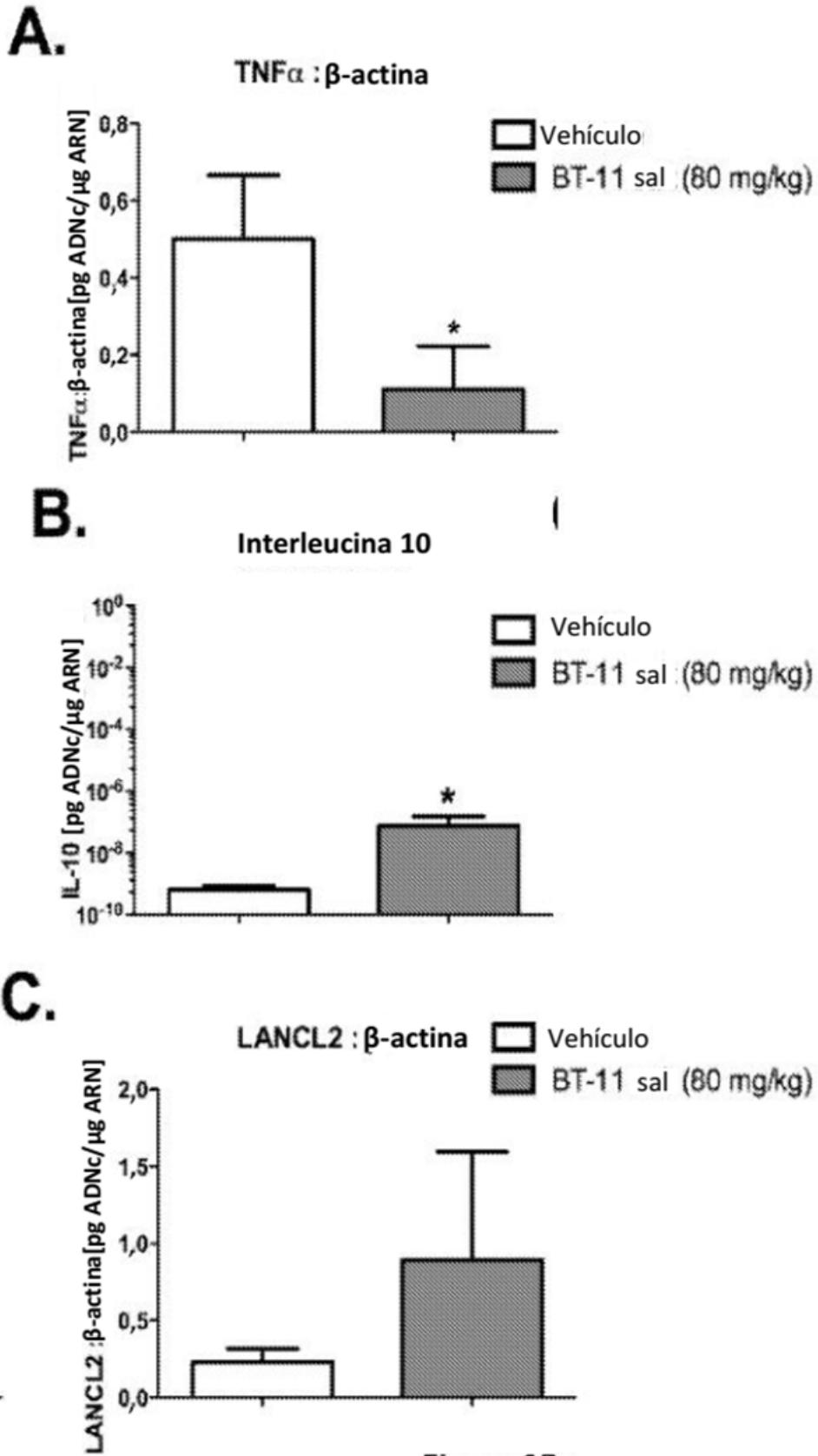
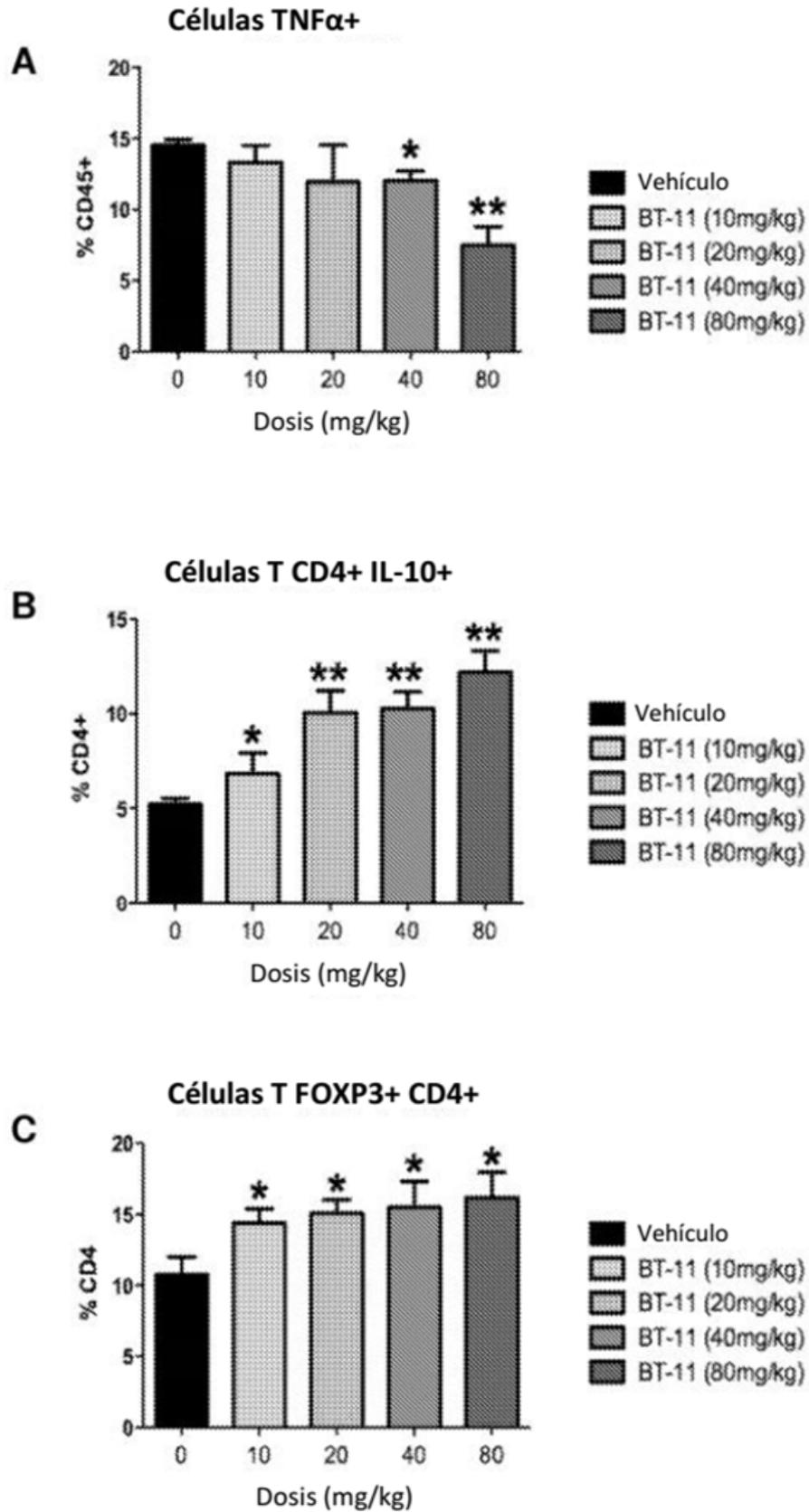


Figura 13



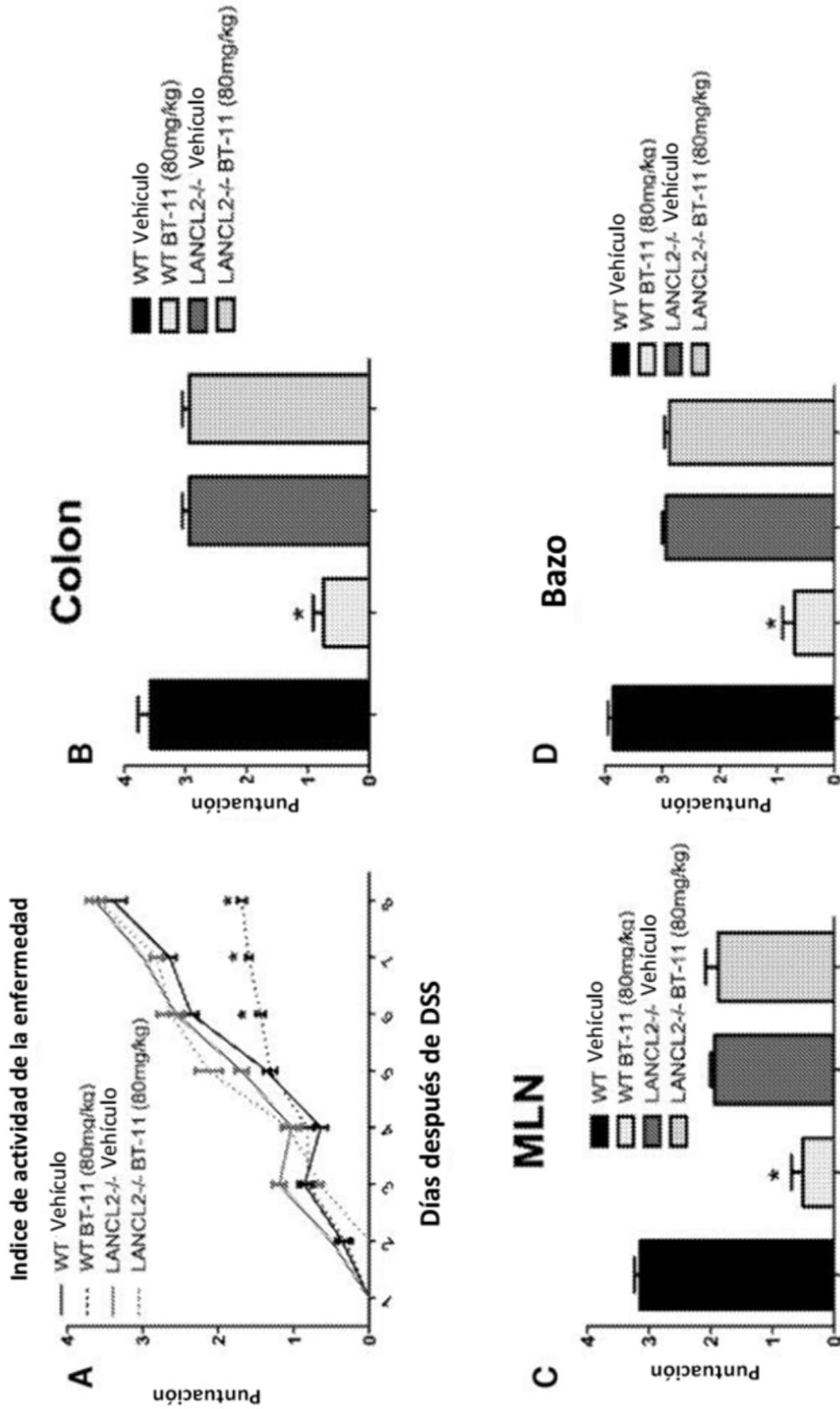


Figura 15

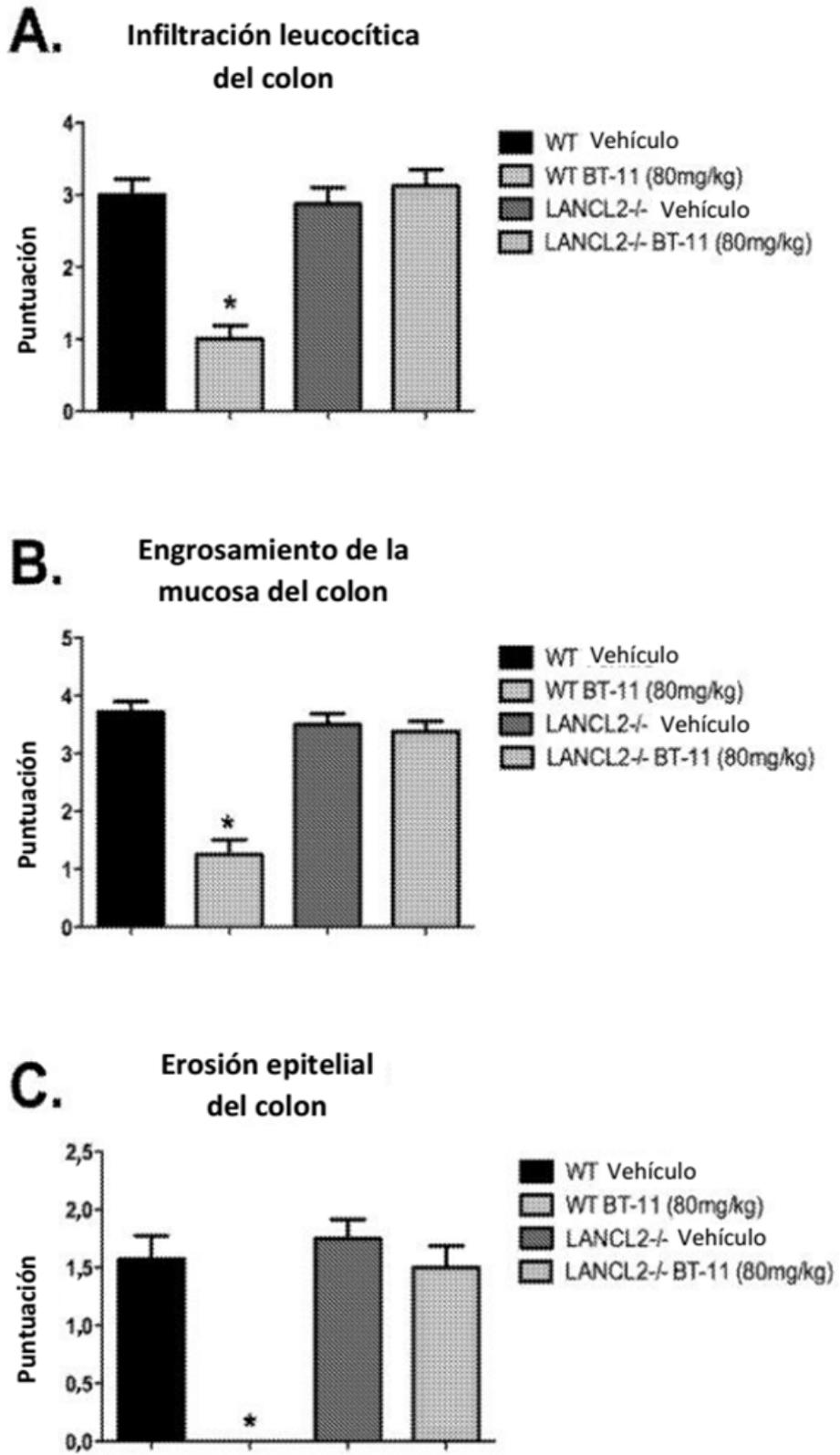


Figura 16

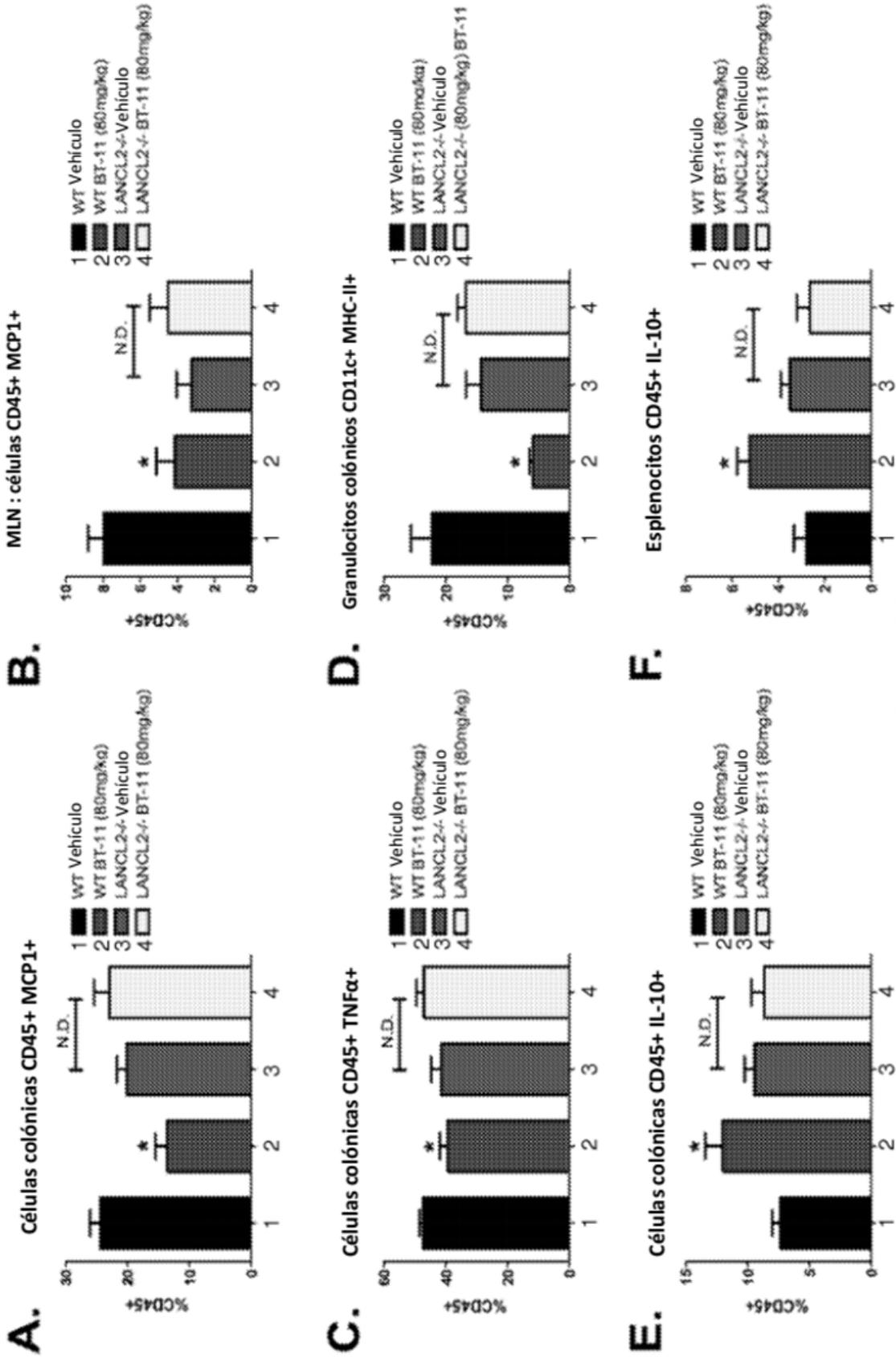


Figura 17

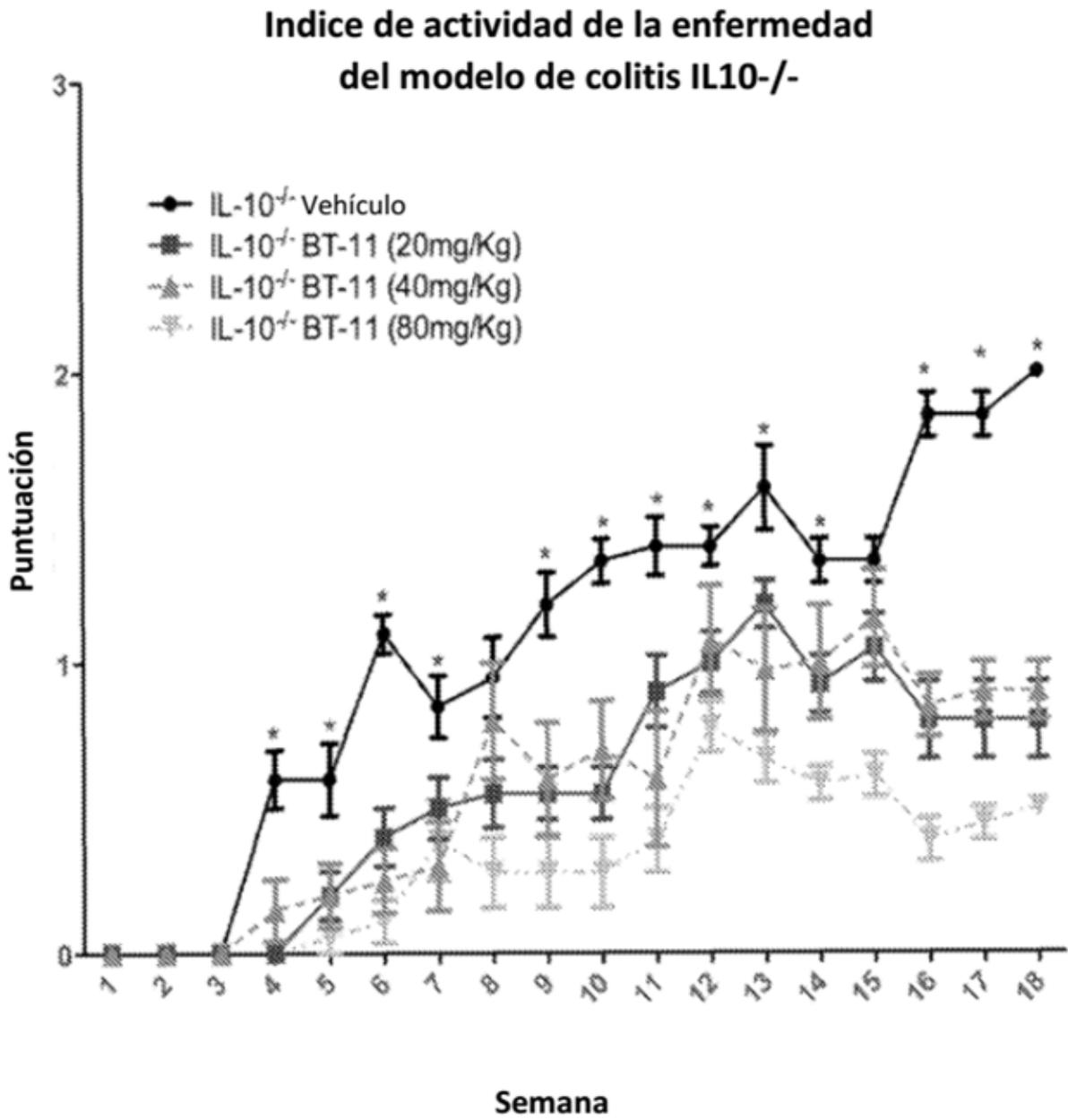


Figura 18

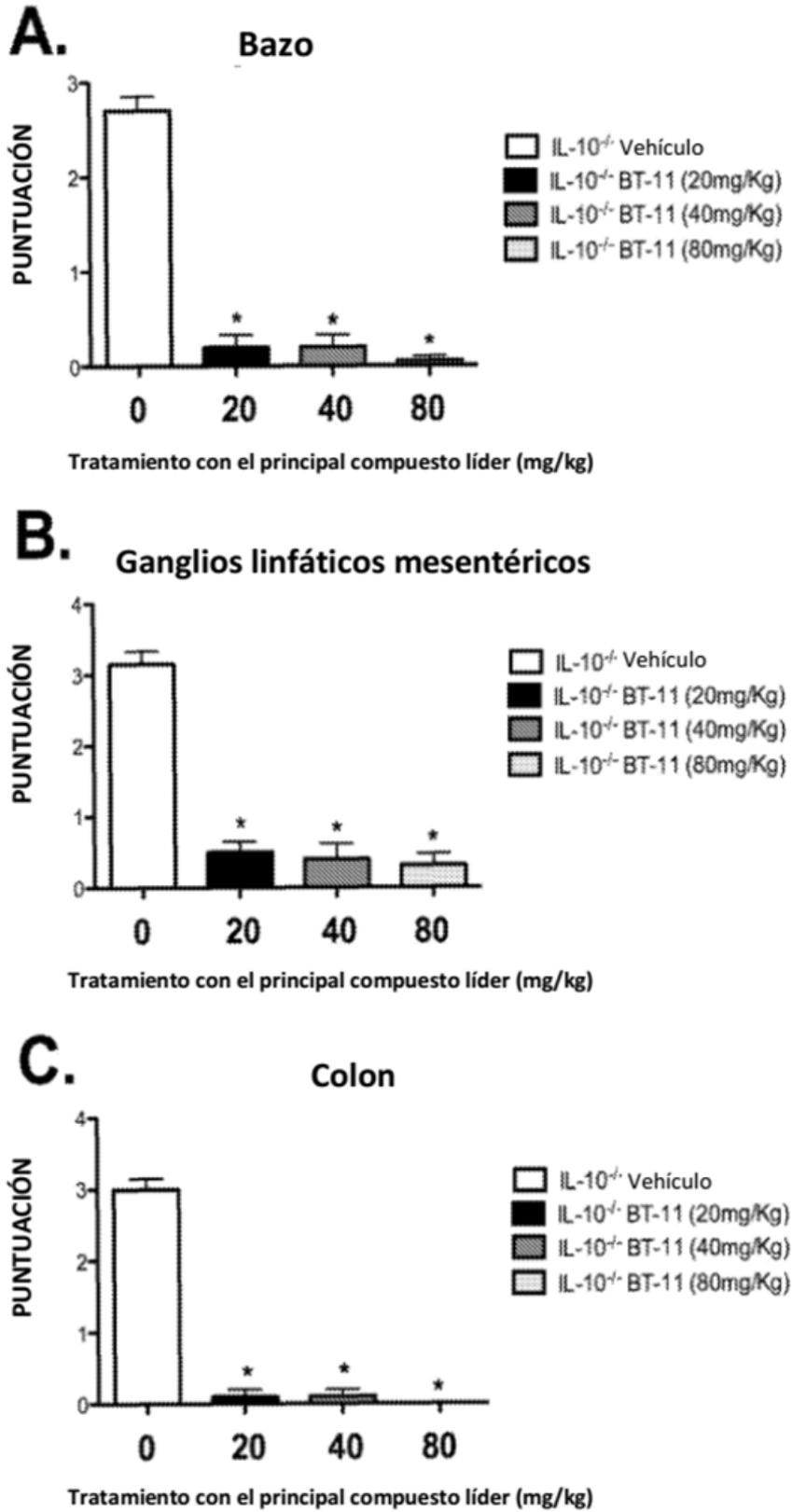


Figura 19

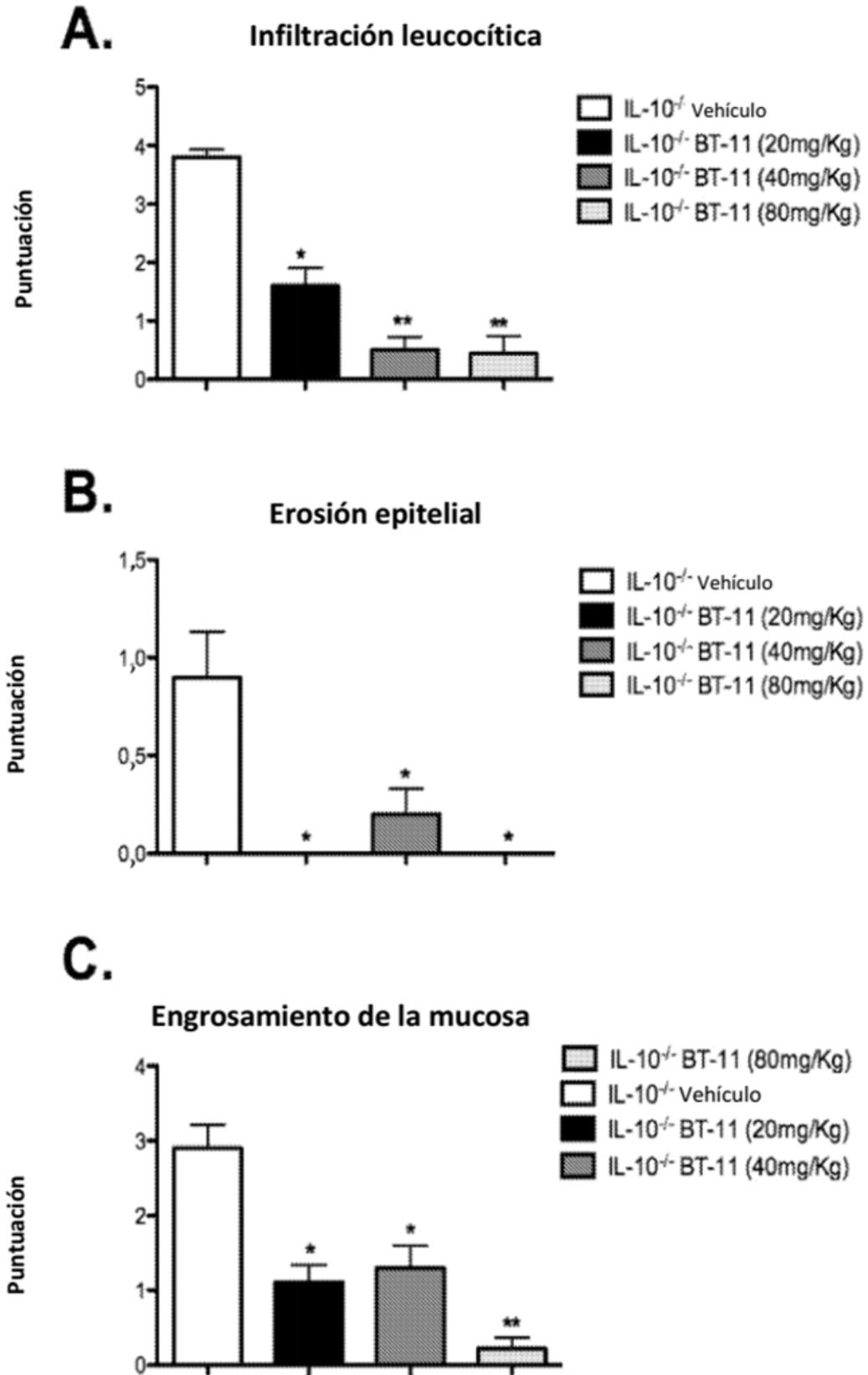


Figura 20

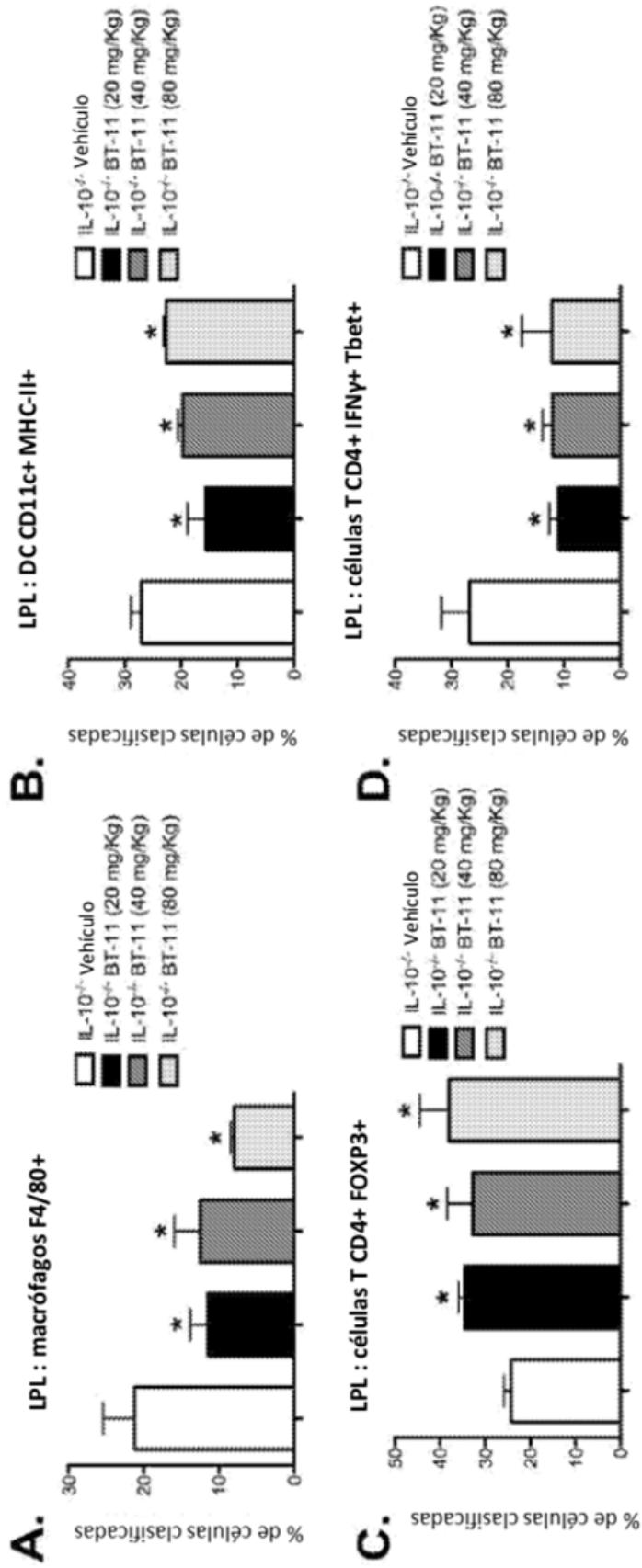


Figura 21

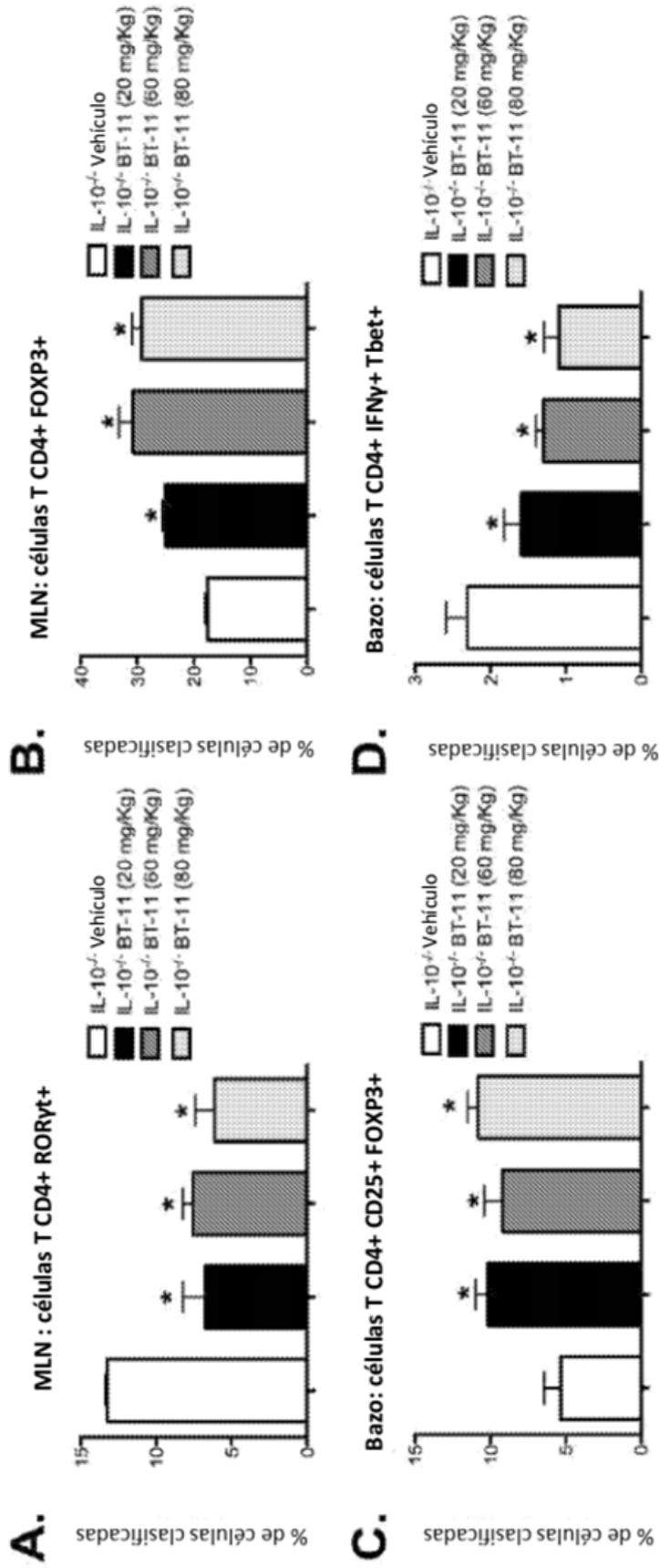
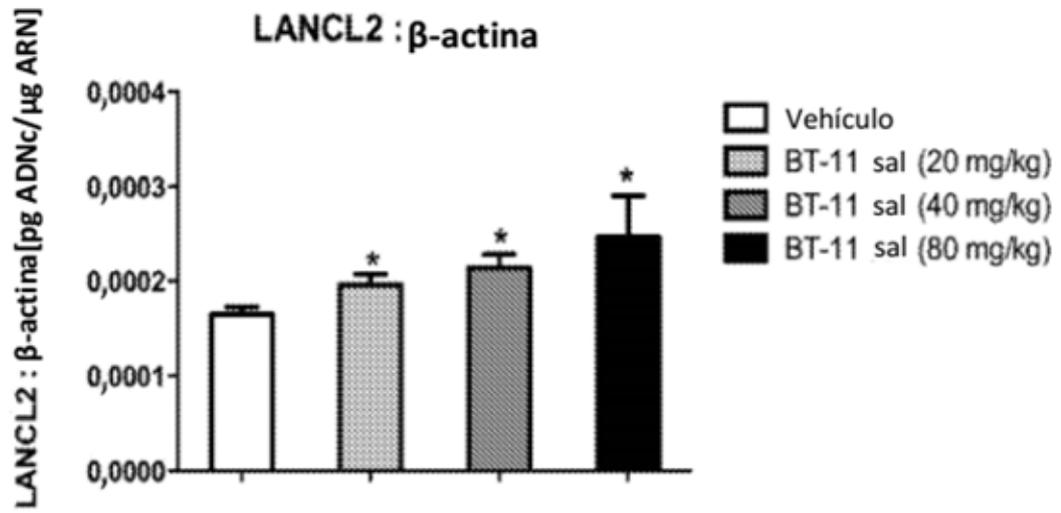


Figura 22

A.



B.

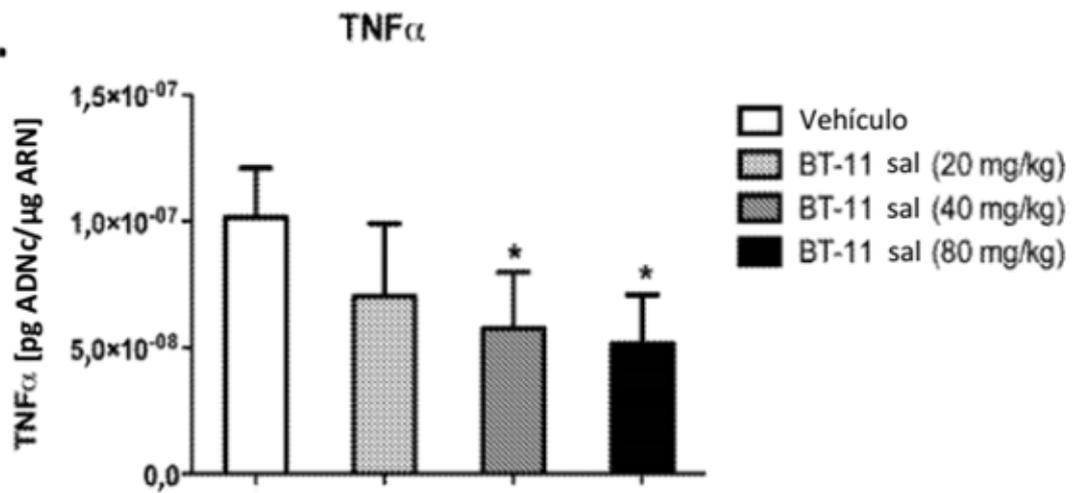


Figura 23

Indice de actividad de la enfermedad del modelo de colitis inducida por células T CD4+

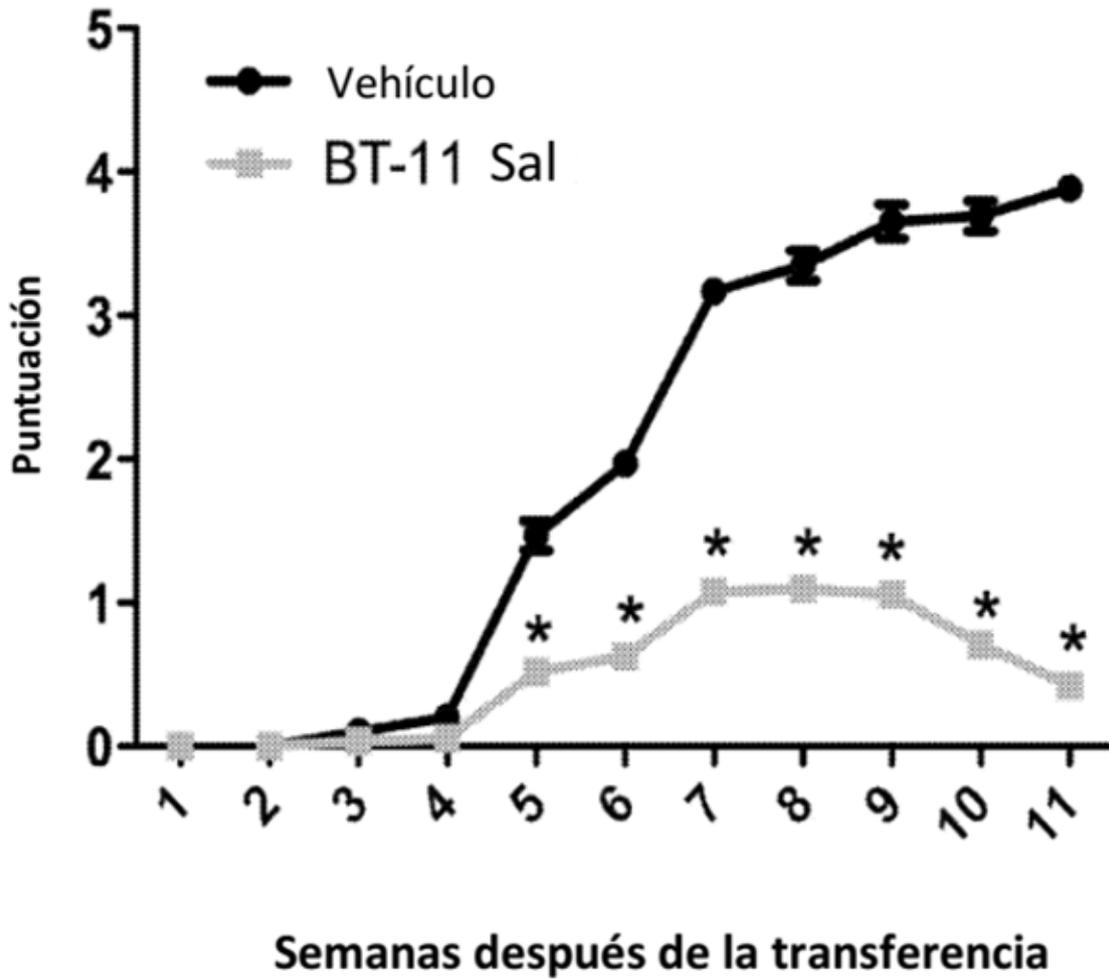


Figura 24

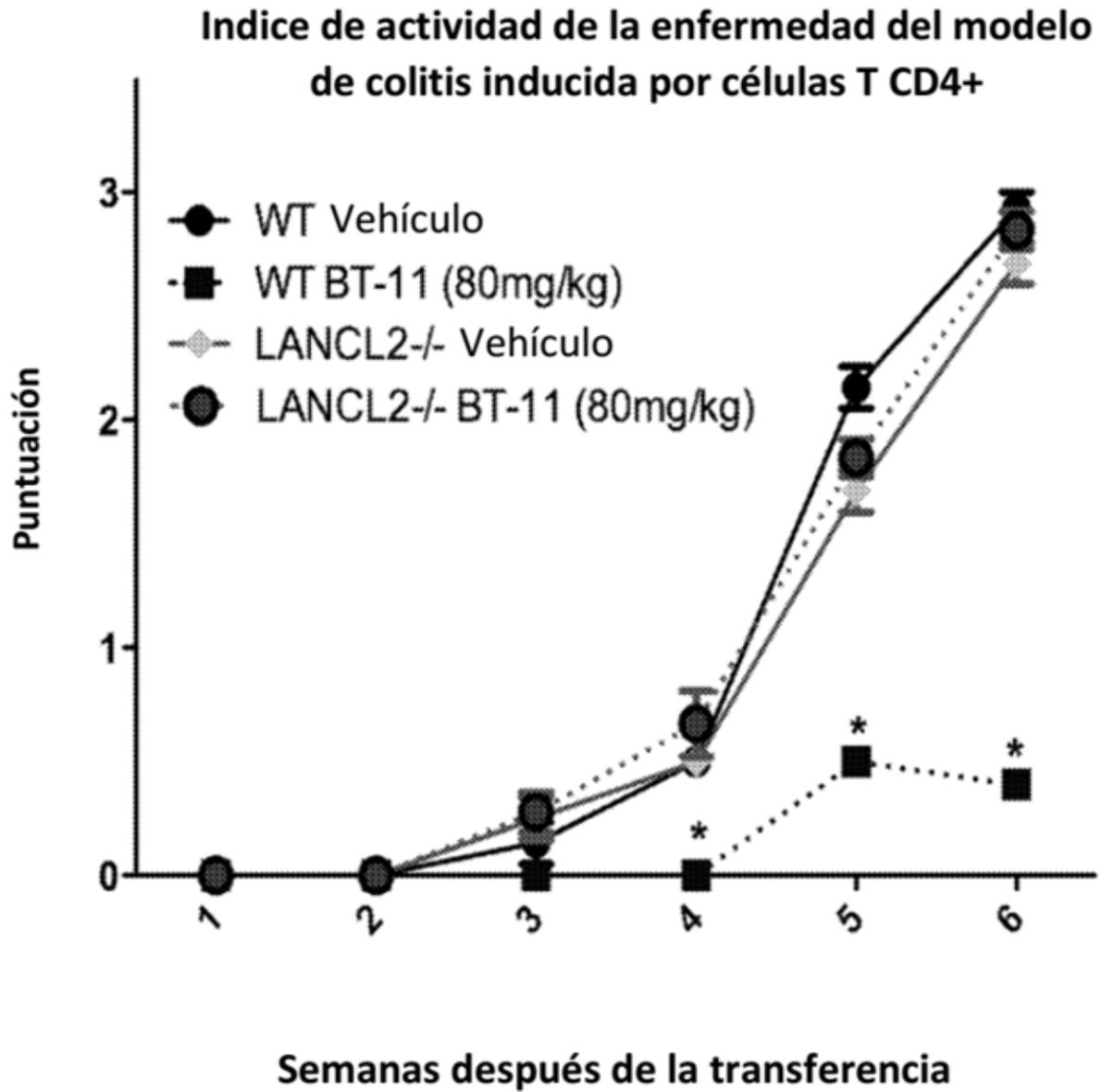


Figura 25

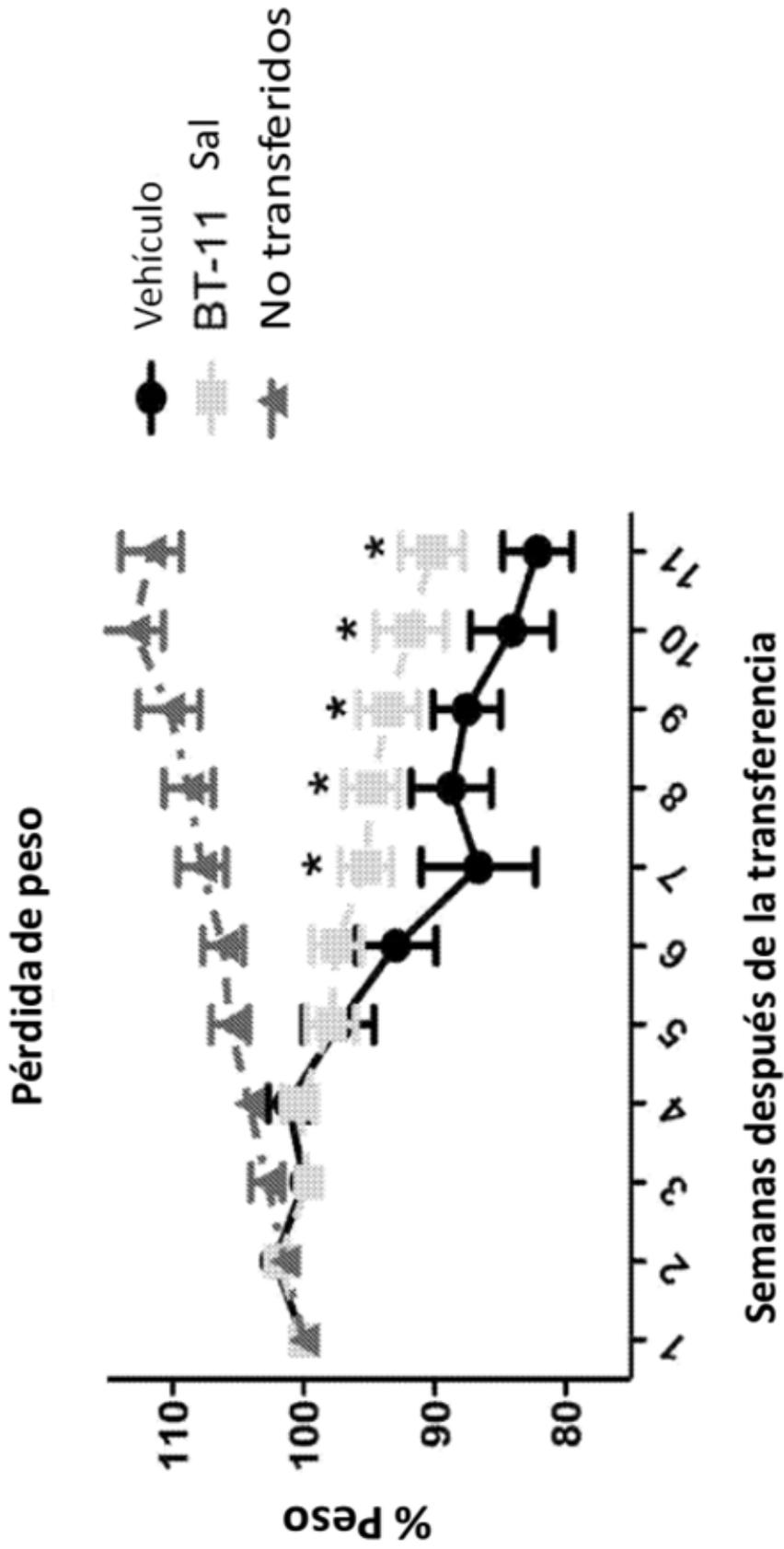


Figura 26

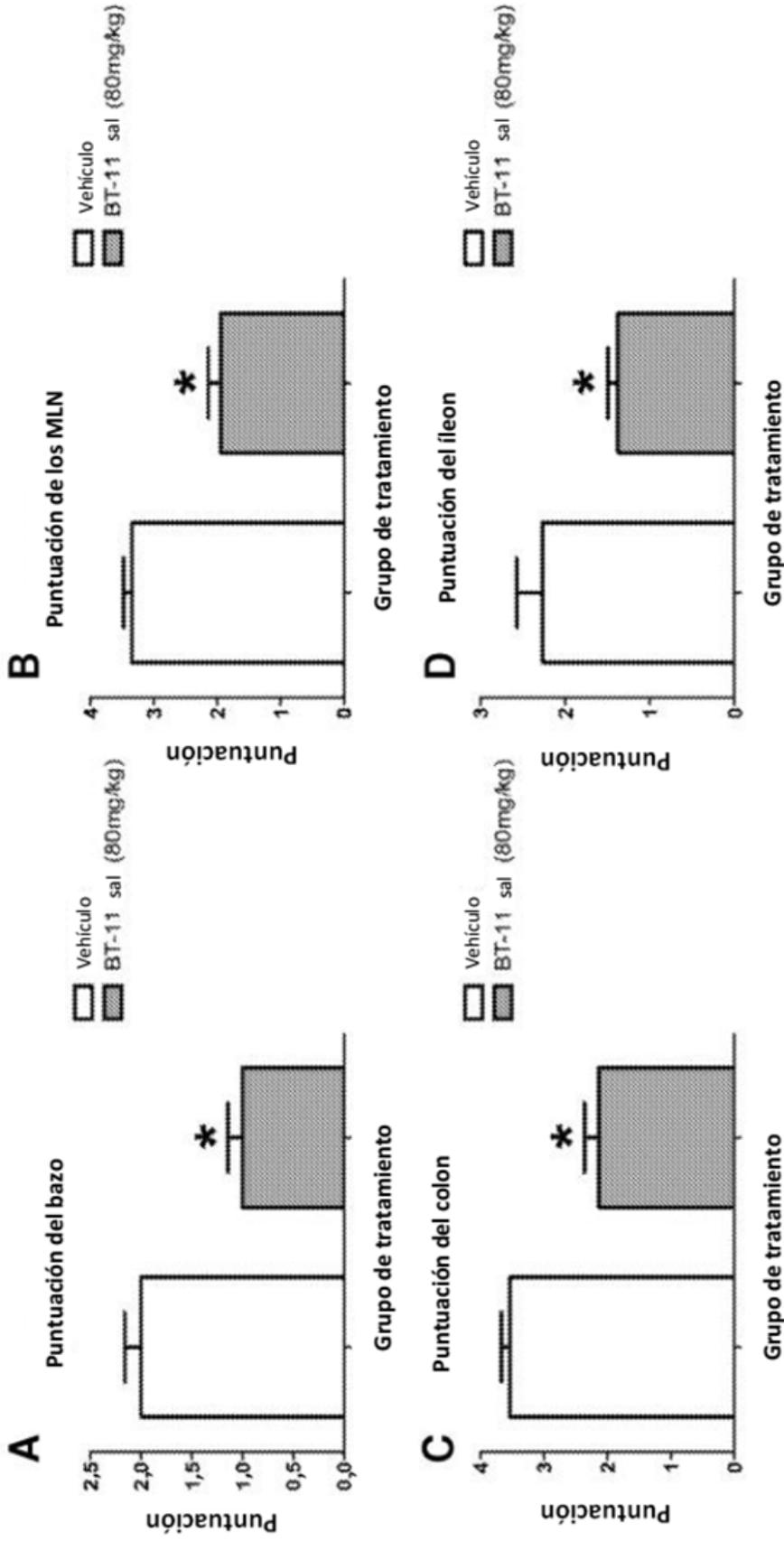


Figura 27

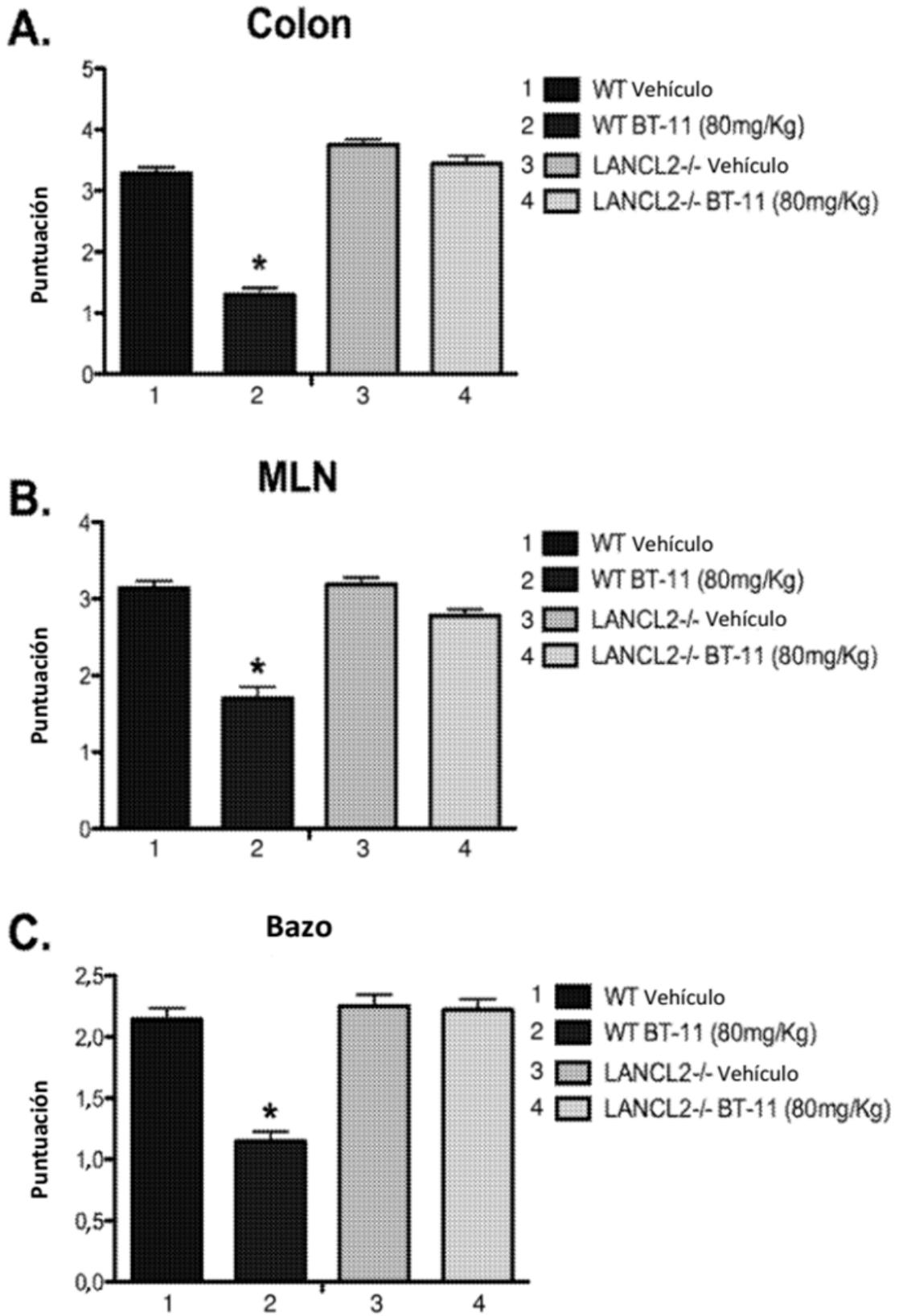


Figura 28

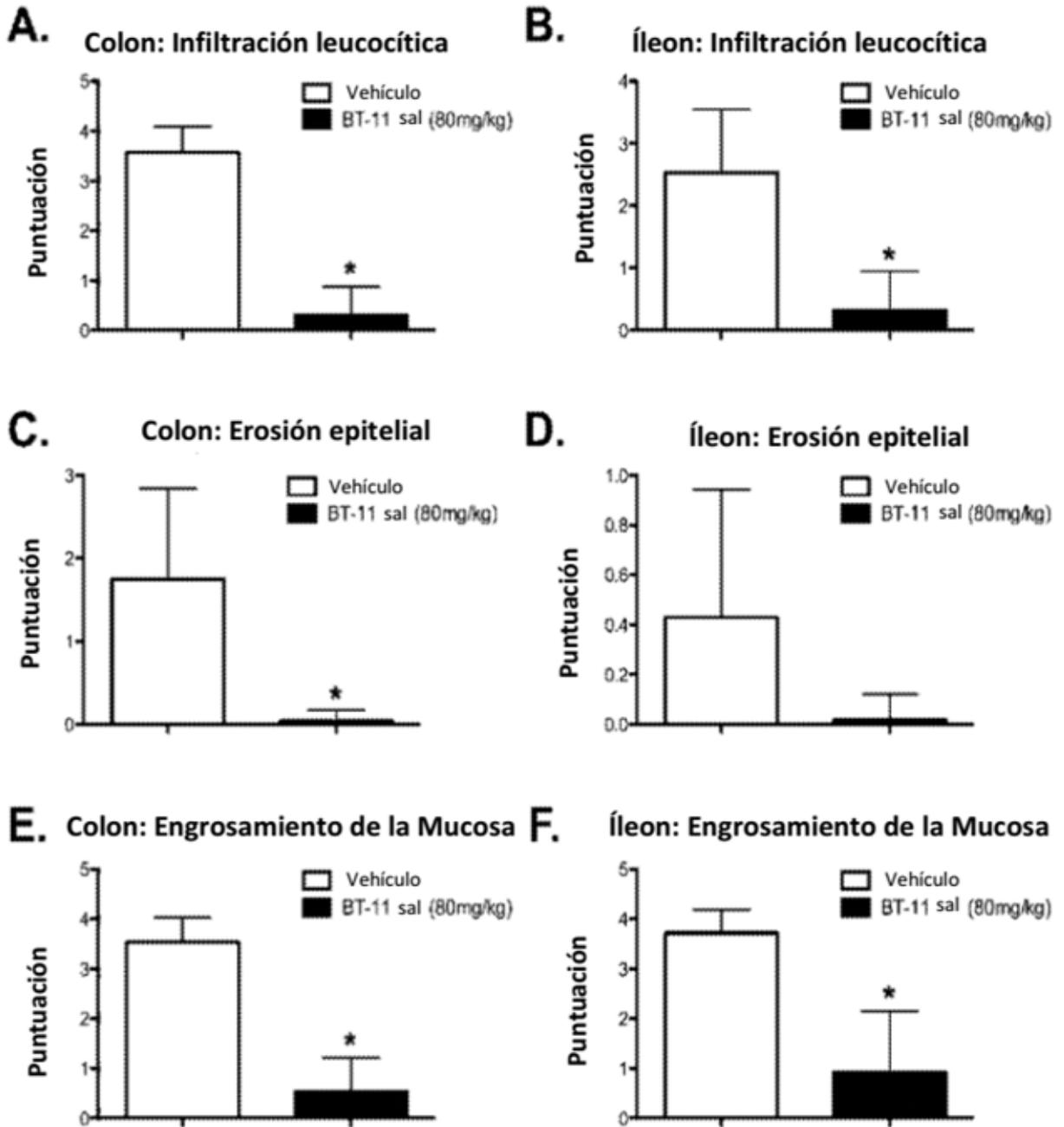


Figura 29

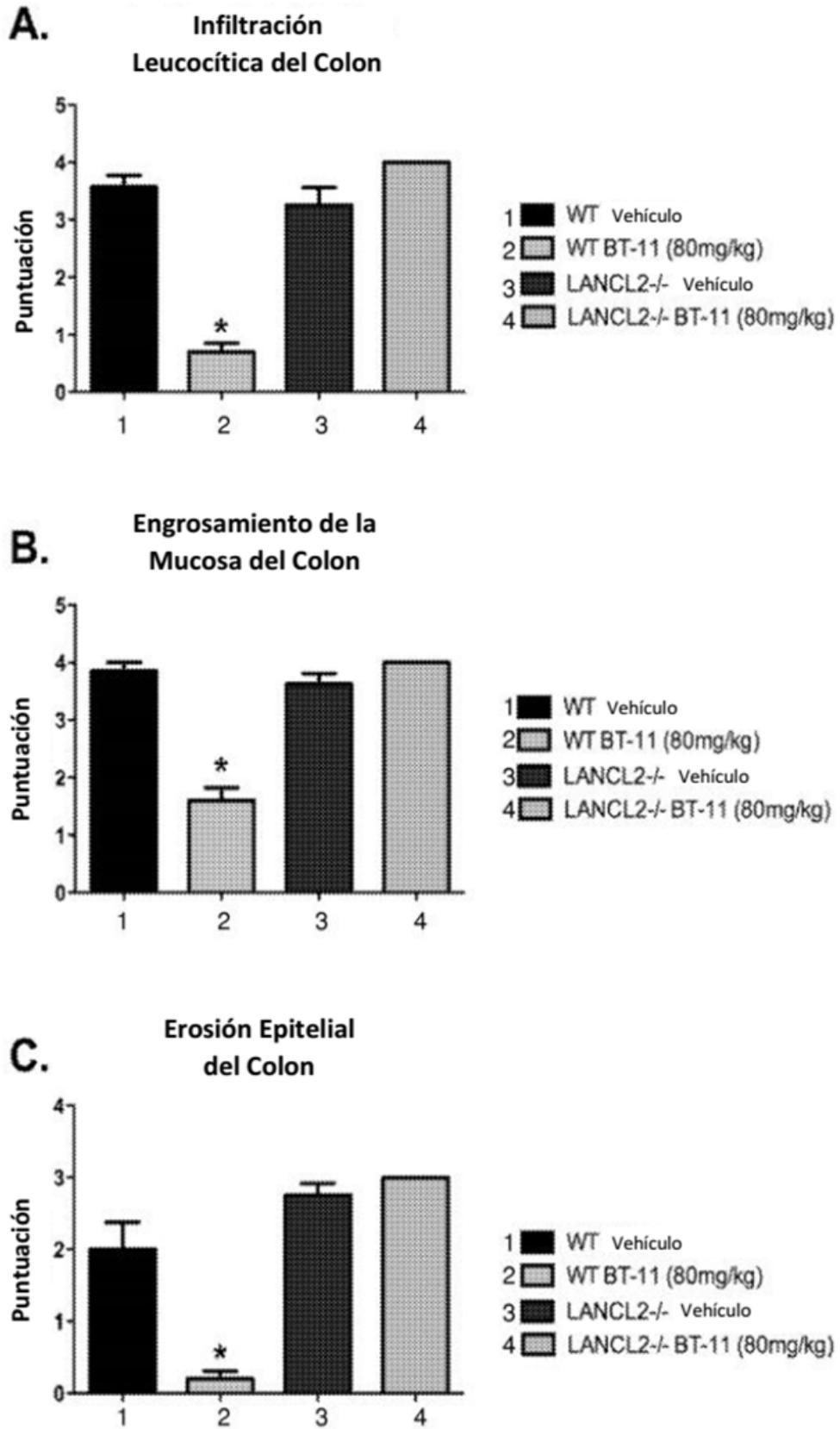


Figura 30

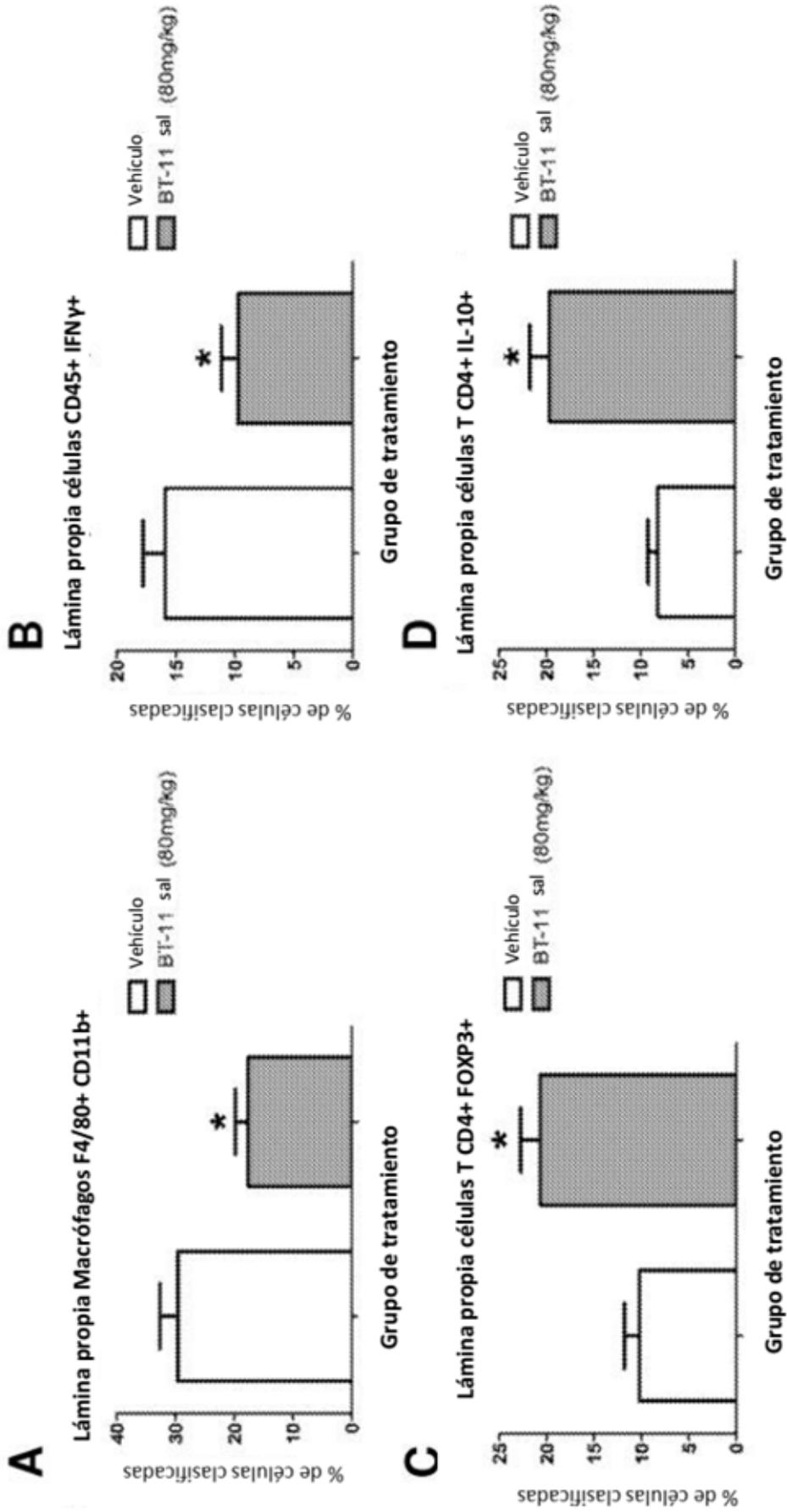


Figura 31

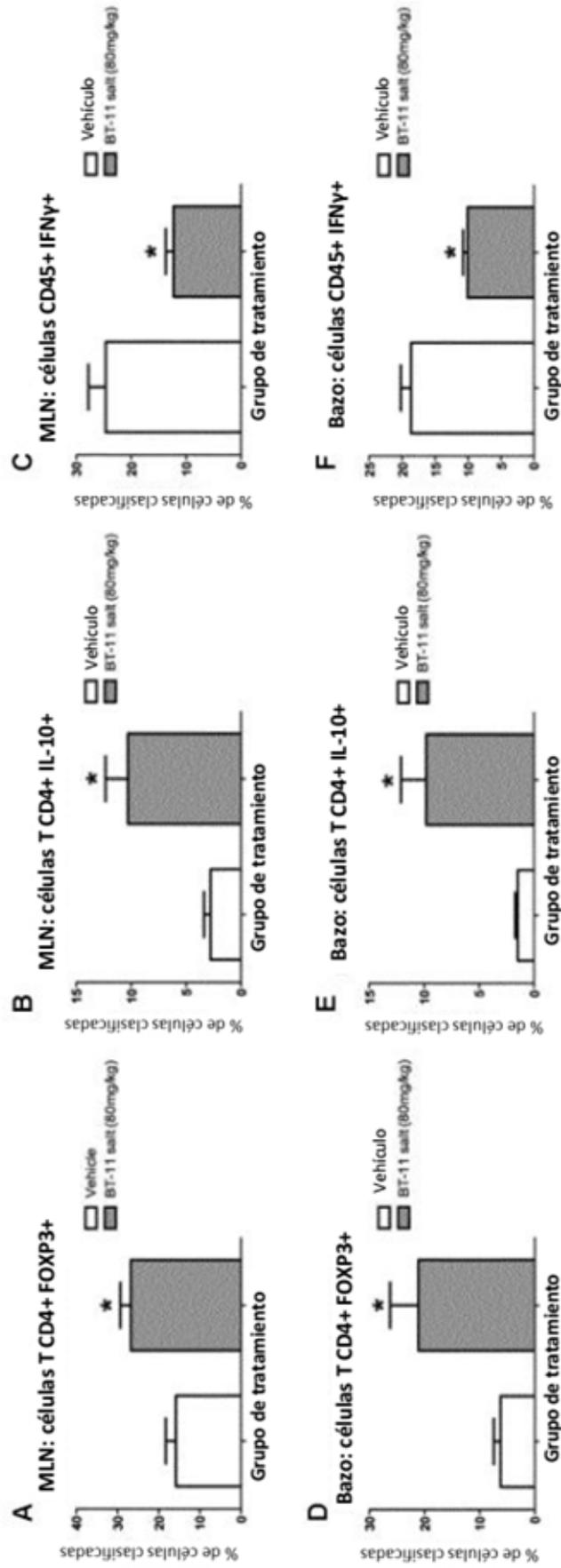


Figura 32

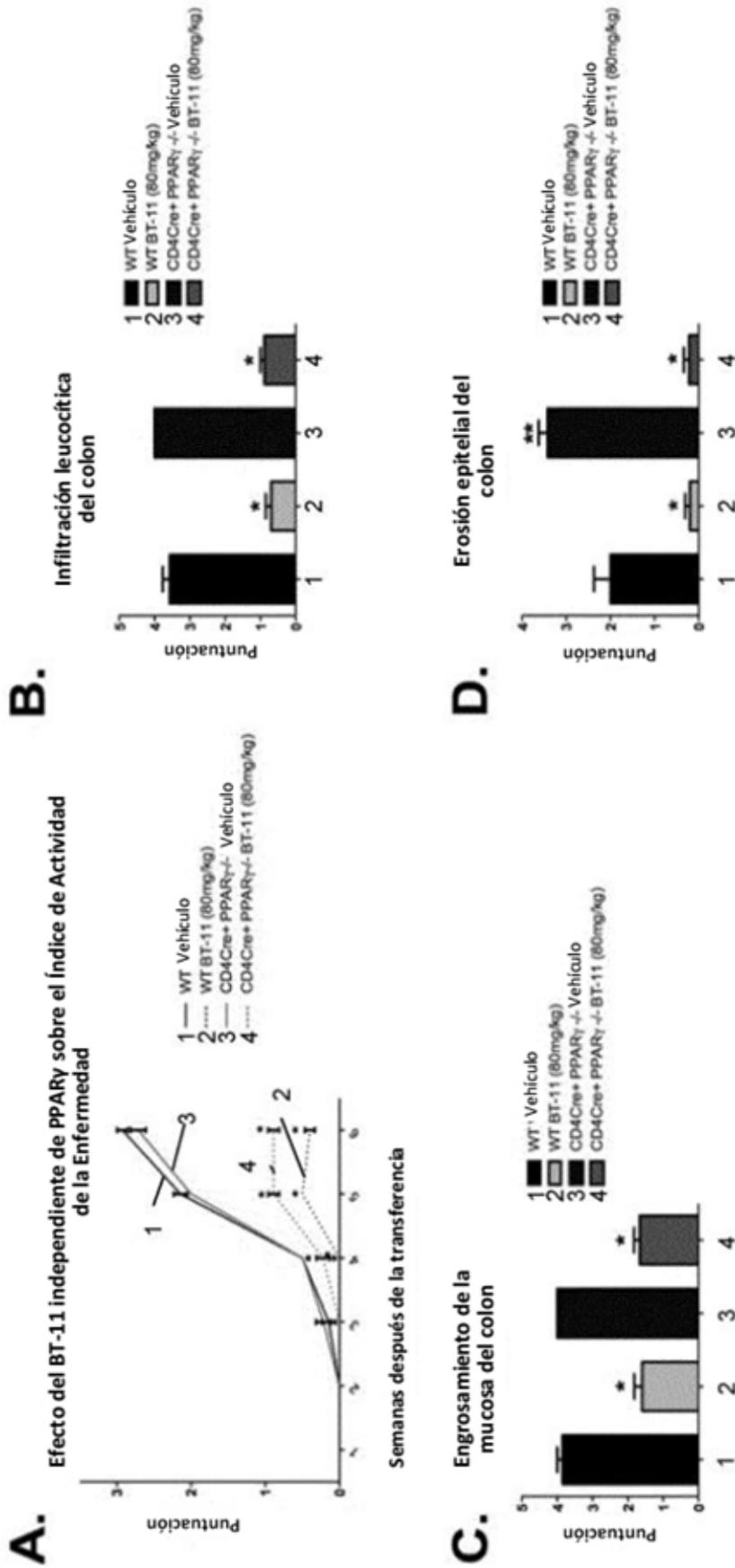


Figura 33

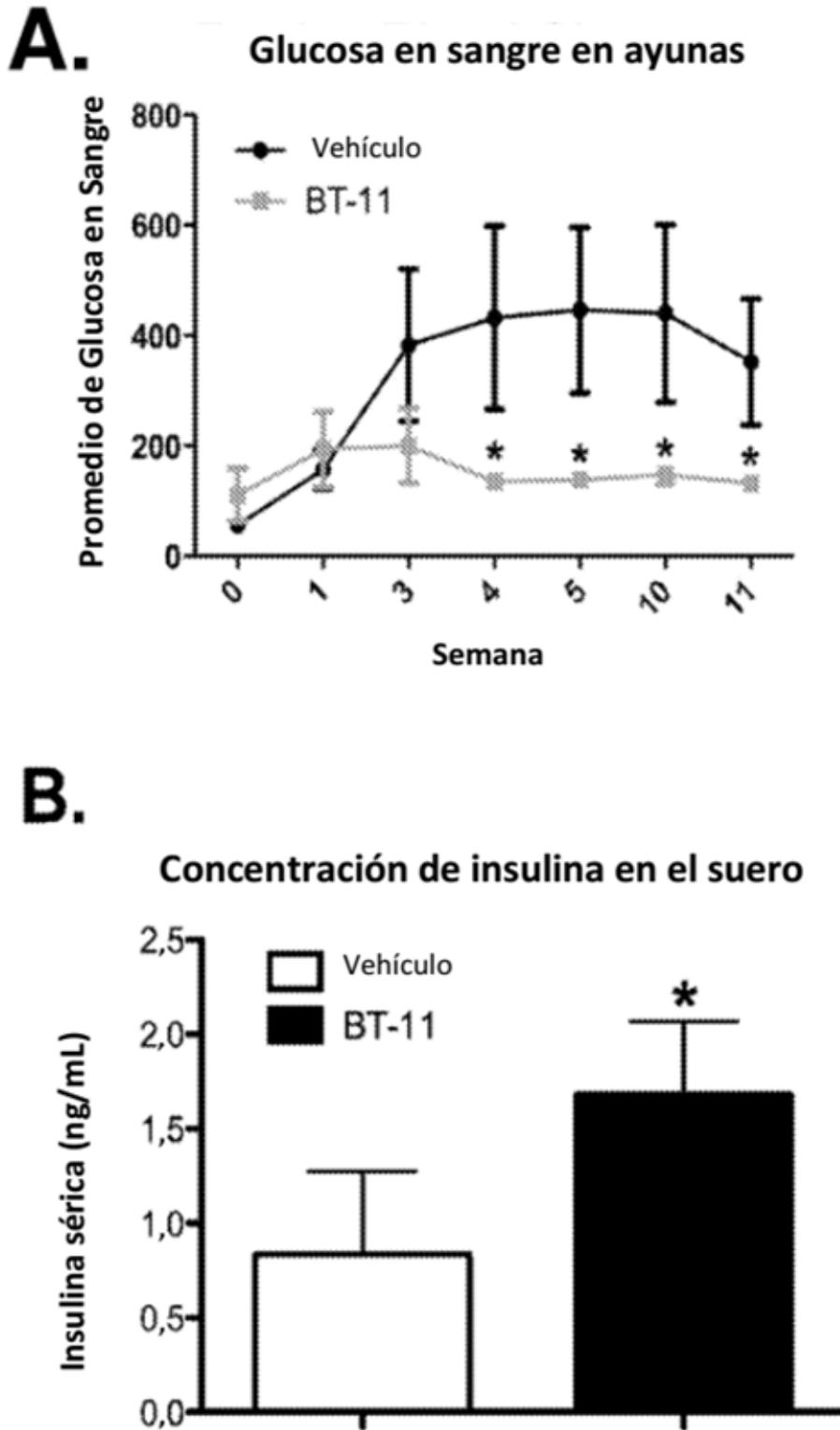


Figura 34

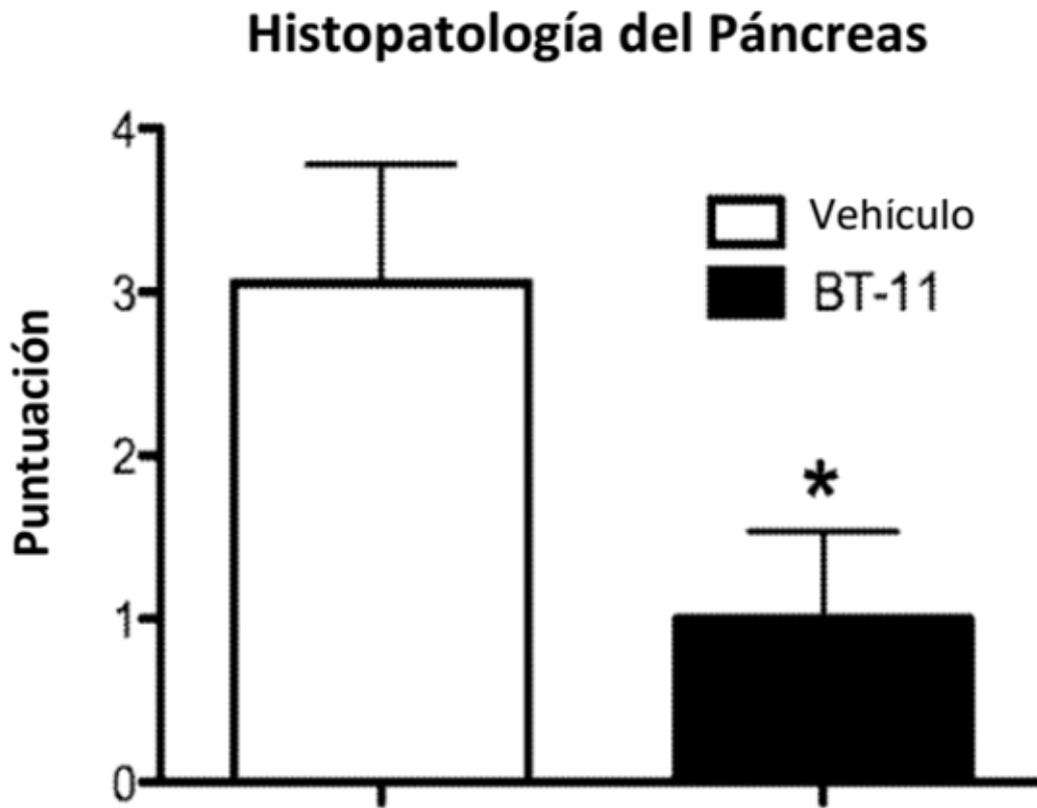


Figura 35

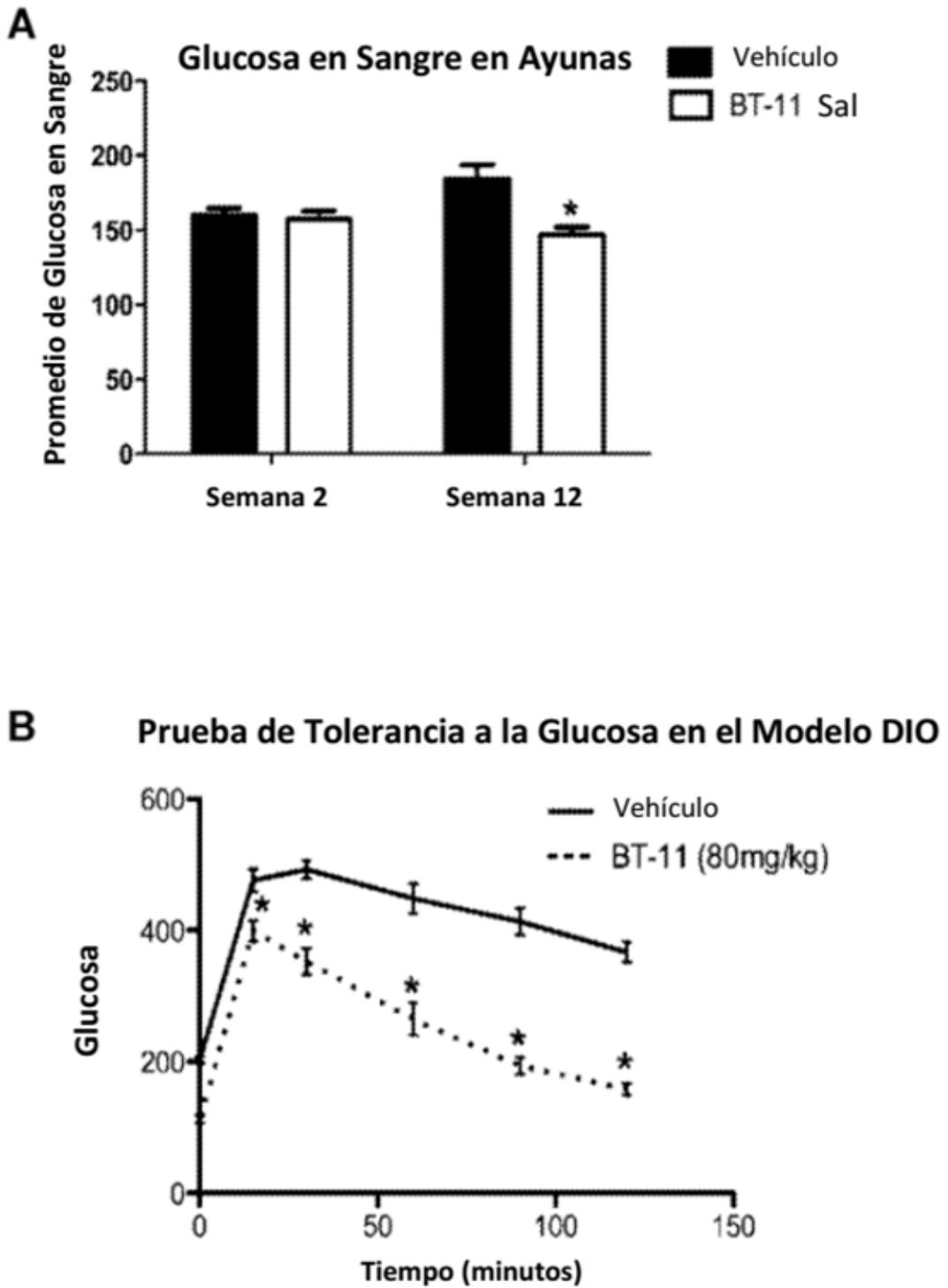


Figura 36

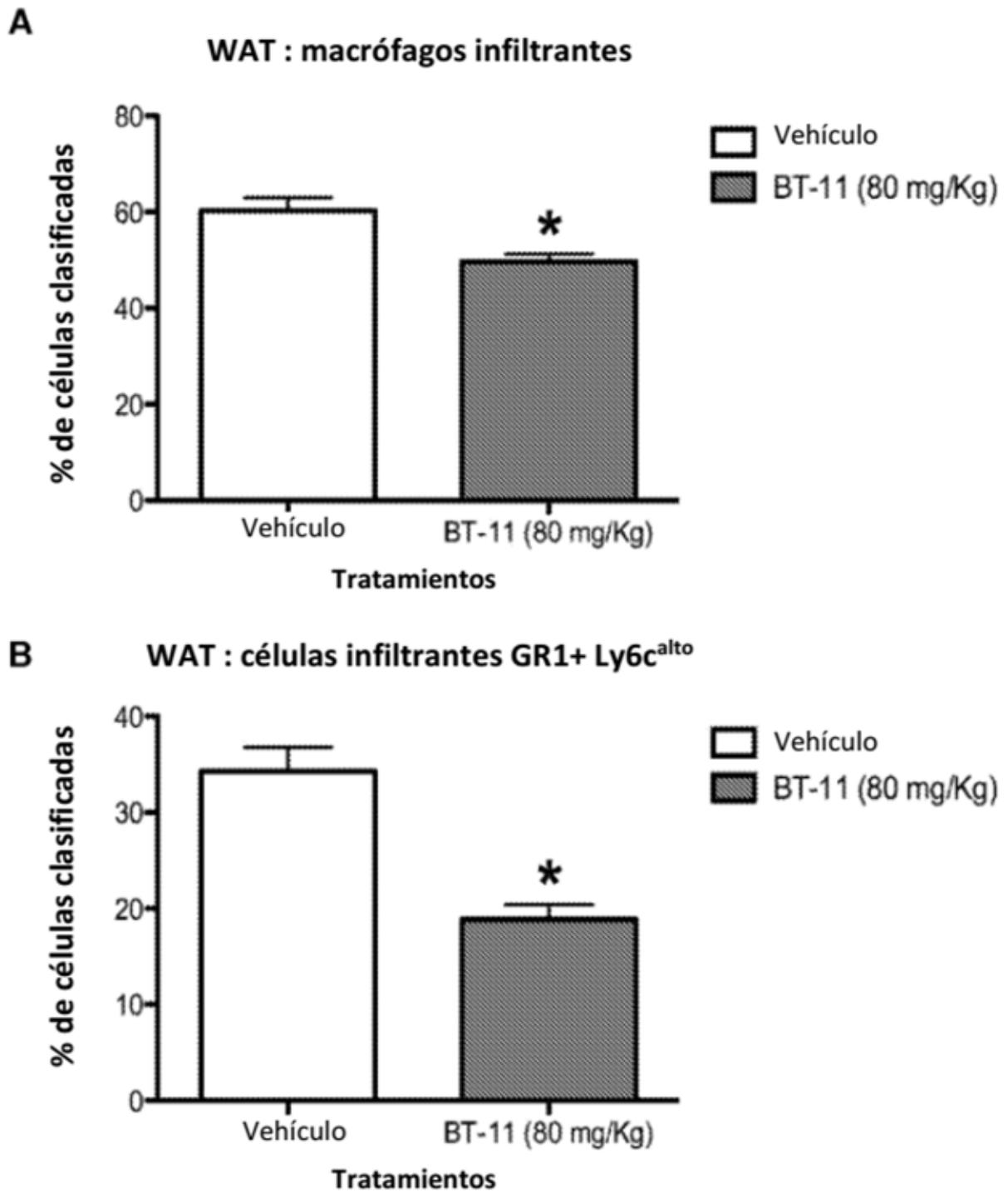


Figura 37

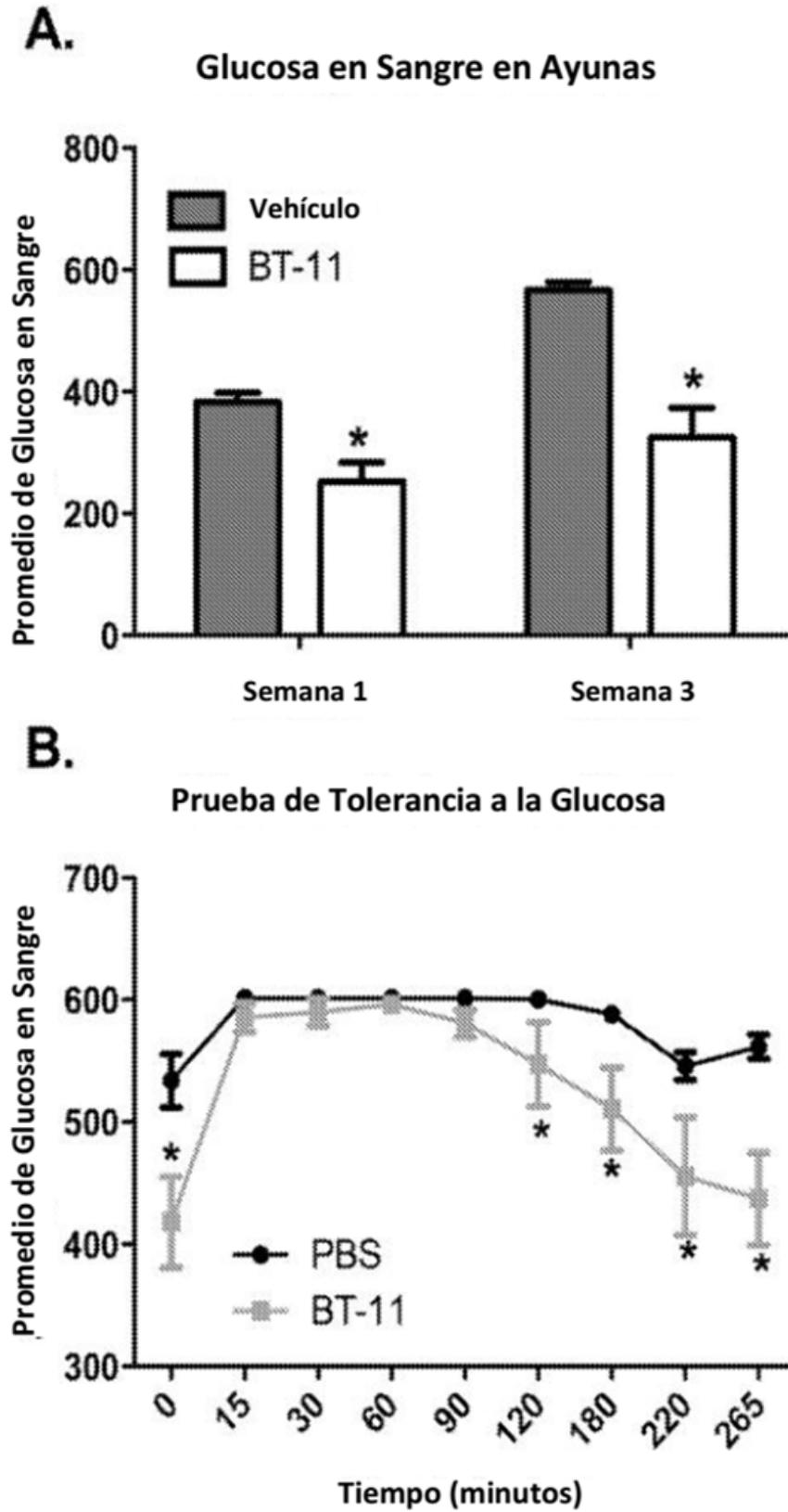


Figura 38

**WAT : Cambio en la expresión
comparado al tratamiento con vehículo**

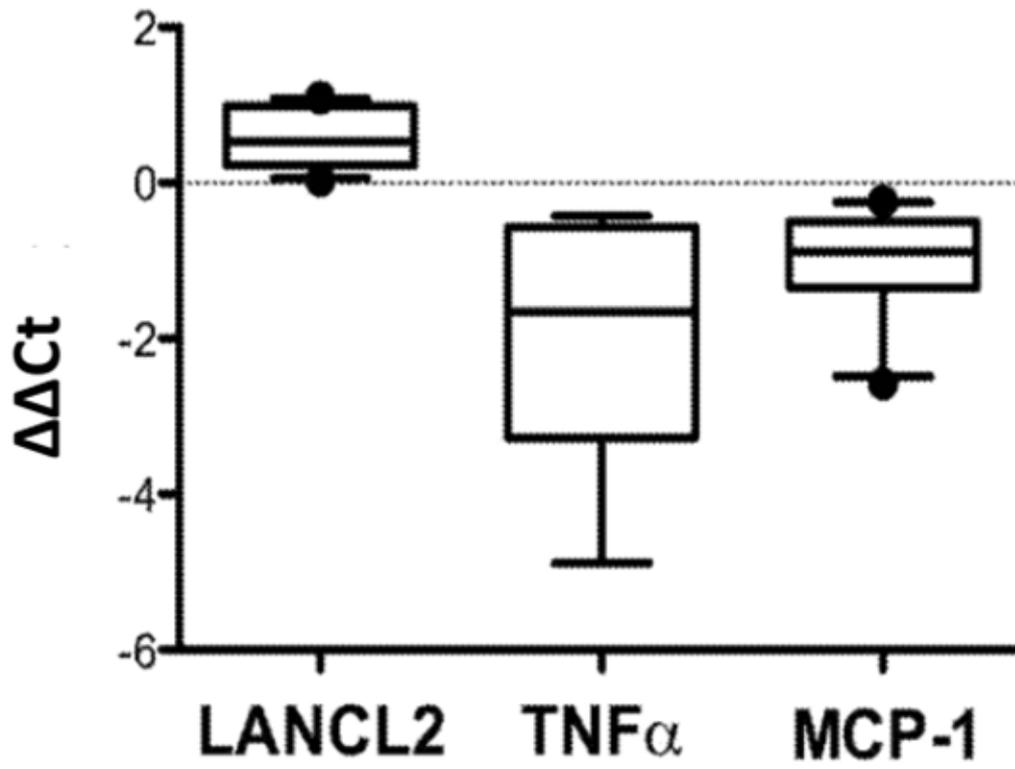


Figura 39

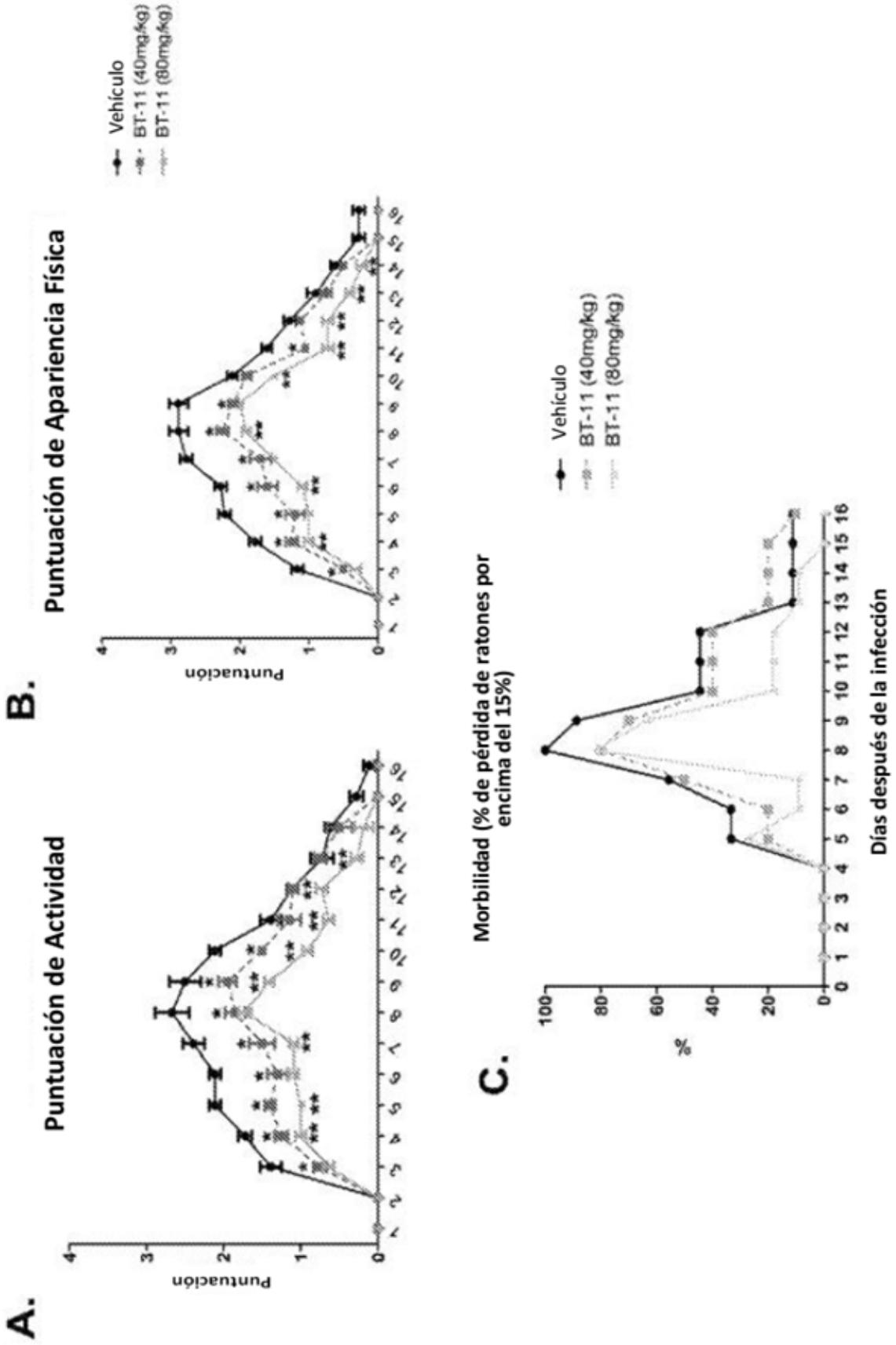


Figura 40