



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 938 445**

⑮ Int. Cl.:

A61K 31/417 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)
A61K 45/00 (2006.01)
A61P 31/00 (2006.01)
A61P 9/10 (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01)

⑫

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑥ Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.07.2018 PCT/NL2018/050515**

⑦ Fecha y número de publicación internacional: **31.01.2019 WO19022600**

⑨ Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.07.2018 E 18770099 (2)**

⑩ Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.11.2022 EP 3658141**

⑮ Título: **Tratamiento de estados patológicos mediante acción selectiva directa e indirecta sobre la interacción SIRPA-CD47**

⑩ Prioridad:

**24.07.2017 NL 2019333
15.05.2018 NL 2020938**

⑮ Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
11.04.2023

⑮ Titular/es:

**STICHTING HET NEDERLANDS KANKER
INSTITUUT- ANTONI VAN LEEUWENHOEK
ZIEKENHUIS (50.0%)
Plesmanlaan 121
1066 CX Amsterdam, NL y
ACADEMISCH ZIEKENHUIS LEIDEN H.O.D.N.
LUMC (50.0%)**

⑯ Inventor/es:

**RAABEN, MATTHIJS;
SCHEEREN, FERENC ALEXANDER;
LOGTENBERG, MEIKE EMMA WILLEMIJN;
BRUMMELKAMP, THIJN REINOUT;
SCHUMACHER, ANTONIUS NICOLAAS MARIA y
LEUSEN, JEANNETTE HENRICA WILHELMINA**

⑯ Agente/Representante:

TOMAS GIL, Tesifonte Enrique

ES 2 938 445 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

Tratamiento de estados patológicos mediante acción selectiva directa e indirecta sobre la interacción SIRPA-CD47

5

CAMPO DE LA INVENCIÓN

[0001] La presente invención está relacionada con los campos de la medicina y la inmunología, en particular con el campo del eje de señalización CD47-SIRPA. En concreto, la presente invención se refiere a principios activos o compuestos, así como a composiciones farmacéuticas que comprenden dichos compuestos, que son capaces de reducir o inhibir o bloquear la actividad enzimática de la proteína glutaminil péptido ciclotransferasa (QPCT) y/o la proteína similar a la glutaminil-péptido ciclotransferasa (QPCTL) o la expresión del gen QPCT y/o el gen QPCTL. También se proporcionan métodos para cribar o seleccionar dichos compuestos. La presente invención se refiere además a una composición farmacéutica que comprende un primer principio activo (por ejemplo, un fármaco como un anticuerpo anti-CD47 o un anticuerpo anti-PD-L1) para usar en un método para tratar una afección en un sujeto que podría beneficiarse de la reducción de la señalización o unión entre SIRPA y CD47 en el sujeto (por ejemplo, cáncer), donde el método de tratamiento comprende reducir la expresión o la actividad enzimática de QPCTL y/o QPCT en la célula con CD47 en la superficie (por ejemplo, mediante el uso de los compuestos como se da a conocer en el presente documento (inhibidores de QPCT y/o inhibidores de QPCTL)).

10

20 Los compuestos y las composiciones farmacéuticas de la invención pueden ser particularmente útiles para tratar a un sujeto que padece una enfermedad o afección en la que está involucrado el eje de señalización CD47-SIRPA como, por ejemplo, varios tipos de cáncer, ateroesclerosis, enfermedades fibróticas y enfermedades infecciosas.

15

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

[0002] El cáncer es una de las principales causas de muerte en todo el mundo y representó más de 8,8 millones de muertes en 2015. A lo largo de los años se han desarrollado varias terapias para tratar y/o curar el cáncer, incluidas, por ejemplo, la quimioterapia, la radiación, la cirugía y la inmunoterapia contra el cáncer.

25

[0003] La inmunoterapia contra el cáncer representa un tipo de tratamiento contra el cáncer diseñado para estimular las defensas inmunitarias naturales del cuerpo para combatir el cáncer. En general, el propósito de la inmunoterapia contra el cáncer es mejorar la capacidad del sistema inmunitario, incluido el sistema inmunitario innato, de detectar y destruir específicamente las células cancerosas (por ejemplo, mediante fagocitosis) sin afectar a las células sanas.

30

[0004] Sin embargo, las células cancerosas pueden evadir la inmunovigilancia de muchas maneras, por ejemplo, al evadir la fagocitosis por parte de las células fagocitarias (por ejemplo, macrófagos o neutrófilos) a través de la expresión de las llamadas señales "antifagocíticas" o "don't eat me". Un ejemplo destacado de señal de ese tipo es la proteína transmembrana "grupo de diferenciación 47" (abreviado como "CD47"). La CD47 se expresa prácticamente en todas las células del cuerpo y participa en una variedad de procesos celulares, que incluyen la apoptosis, la proliferación, la adhesión y la migración, así como respuestas angiogénicas e inmunitarias. La CD47 se une o interactúa con varios ligandos y la proteína reguladora de señales alfa (SIRPA) se considera un ligando principal para la CD47. La SIRPA es un receptor transmembrana inhibidor presente en células mieloides como macrófagos, monocitos, neutrófilos, basófilos, eosinófilos, eritrocitos y células dendríticas. La interacción entre CD47 y SIRPA media o transmite señales "antifagocíticas" o "don't eat me" entre dos células, que finalmente inhiben la fagocitosis.

35

[0005] En el caso del cáncer, se descubrió que las células cancerosas aumentan la expresión de CD47 en su superficie celular en comparación con los niveles de CD47 que se encuentran en las células normales/sanas. Como resultado, las células cancerosas pueden evadir la destrucción por parte del sistema inmunitario o evadir la inmunovigilancia, por ejemplo, al eludir la fagocitosis por células inmunitarias como las células fagocitarias (por ejemplo, macrófagos, neutrófilos). Este fenómeno no se limita al cáncer. También se descubrió que las células enfermas en enfermedades distintas al cáncer como, por ejemplo, la ateroesclerosis, las enfermedades fibróticas y las enfermedades infecciosas causadas por patógenos (por ejemplo, virus), también aumentan la expresión de CD47 en su superficie celular en comparación con los niveles de CD47 que se encuentran en las células normales/sanas para evadir la fagocitosis por los fagocitos.

40

[0006] En el caso del cáncer, los enfoques actuales para antagonizar las interacciones CD47-SIRPA se han dirigido principalmente a la CD47. Por ejemplo, actualmente se están desarrollando o probando en ensayos clínicos varios anticuerpos anti-CD47 destinados a interferir o bloquear las interacciones CD47-SIRPA. Aunque son prometedoras, tales estrategias no son óptimas, ya que se sabe que los anticuerpos tienen poca penetración en los tejidos, especialmente en tumores sólidos debido a su gran peso molecular. Además, tales anticuerpos, en particular los anticuerpos dirigidos contra la CD47, carecen de especificidad, ya que la CD47 está ampliamente distribuida por todo el cuerpo, incluido el tejido sano, lo que puede causar toxicidad "on target" (toxicidad debida a la interacción con la diana) para las células normales. Otras desventajas asociadas con el uso de anticuerpos

45

50

55

60

65

anti-CD47 incluyen la falta de biodisponibilidad oral y efectos secundarios indeseables como el desarrollo de anemia (que puede ocurrir como resultado de una pérdida dependiente de la dosis de glóbulos rojos y plaquetas), así como hemaglutinación (agrupación de glóbulos rojos).

5 [0007] Por lo tanto, existe la necesidad de terapias que actúen sobre la CD47 que no causen un nivel significativo de toxicidad y/o disminución de las plaquetas y/o hemaglutinación (agrupación de glóbulos rojos) y/o disminución de los glóbulos rojos y/o anemia cuando se administran a un sujeto y/o que tengan potencial de biodisponibilidad oral. También existe la necesidad de métodos para cribar o seleccionar tales compuestos, así como métodos para identificar sujetos que puedan beneficiarse del tratamiento con una cantidad eficaz de dichos compuestos.

10 **RESUMEN DE LA INVENCIÓN**

[0008] En el presente documento se describen métodos y composiciones para reducir la unión entre CD47 y SIRPa mediante la reducción de la expresión o la actividad enzimática de la glutaminil-péptido ciclotransferasa (QPCT), así como su isoenzima relacionada, la similar a la glutaminil-péptido ciclotransferasa (QPCTL), o combinaciones de estas. En algunas formas de realización, la reducción de la unión entre CD47 y SIRPa da como resultado una inhibición o reducción del eje de señalización CD47-SIRPa.

20 [0009] En un aspecto, las composiciones descritas en el presente documento comprenden un principio activo para usar en un método de tratamiento de una afección en un sujeto que se beneficiaría de la reducción de la unión entre CD47 en la superficie de una primera célula y SIRPa en la superficie de una segunda célula del sujeto, donde el principio activo reduce la expresión o la actividad enzimática de la glutaminil-péptido ciclotransferasa (QPCT) así como su isoenzima relacionada, la similar a la glutaminil-péptido ciclotransferasa (QPCTL), o combinaciones de estas, en dicha primera célula con CD47 en la superficie.

25 [0010] En algunas formas de realización, la reducción de la expresión o la actividad enzimática de QPCT, QPCTL o combinaciones de estas comprende la reducción de la transcripción, traducción o combinaciones de estas de los genes que codifican QPCT, QPCTL o combinaciones de estas.

30 [0011] En algunas formas de realización, la composición descrita en el presente documento comprende una molécula de ARN de doble cadena, una molécula de ARN interferente pequeño (ARNip), una molécula de ARN interferente (ARNi) o combinaciones de estas diseñadas para reducir la expresión de QPCT, QPCTL o combinaciones de estas. En algunas formas de realización, la composición descrita en el presente documento comprende un inhibidor de QPCT, QPCTL o combinaciones de estas.

35 [0012] En este documento también se describen composiciones que comprenden un inhibidor de CD47 (por ejemplo, un anticuerpo anti CD47 o un anticuerpo IgA anti CD47) para usar en un método para tratar una afección en un sujeto, en el que el sujeto se beneficiaría de la reducción de la unión entre CD47 en la superficie de una primera célula y SIRPa en la superficie de una segunda célula, y donde el inhibidor de CD47 es un inhibidor que se une a dicha CD47 en la superficie de dicha primera célula y, por lo tanto, reduce la unión de dicha CD47 a dicha SIRPa en la superficie de dicha segunda célula, y donde el método de tratamiento comprende reducir la expresión o la actividad enzimática de QPCTL, QPCT o combinaciones de estas en dicha primera célula. En algunas formas de realización, el inhibidor de CD47 es un anticuerpo.

45 [0013] En este documento también se describen composiciones que comprenden un inhibidor de SIRPa (por ejemplo, un anticuerpo anti SIRPa (o "SIRPa" o "SIRP alfa")) para usar en un método para tratar una afección en un sujeto, donde el sujeto se beneficiaría de la reducción de la unión entre CD47 en la superficie de una primera célula (por ejemplo, una célula enferma como una célula cancerosa) y SIRPa en la superficie de una segunda célula (por ejemplo, macrófagos, monocitos, neutrófilos, basófilos, eosinófilos, células dendríticas), y donde el inhibidor de SIRPa es un inhibidor que se une a dicha SIRPa en la superficie de dicha segunda célula y, por tanto, reduce la unión de dicha SIRPa a dicha CD47 en la superficie de dicha primera célula, y donde el método de tratamiento comprende además reducir la expresión o la actividad enzimática de QPCTL, QPCT o combinaciones de estas en dicha primera célula. En algunas formas de realización, el inhibidor de SIRPa es un anticuerpo.

55 [0014] En algunas formas de realización, la afección que se beneficiaría de la reducción de la unión entre CD47 en la superficie de una primera célula y SIRPa en la superficie de una segunda célula del sujeto se selecciona del grupo que consiste en cáncer, ateroesclerosis, enfermedades fibróticas y enfermedades infecciosas.

60 [0015] En algunas formas de realización, la reducción de la unión entre CD47 y SIRPa se dirige a la célula que expresa CD47 para fagocitosis o se dirige a células que expresan CD47 para citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (CCDA) o se dirige a células que expresan CD47 para fagocitosis celular dependiente de anticuerpos (abreviada como FCDA).

65 [0016] También se describen en este documento métodos *in vitro* para seleccionar o cribar principios activos que reduzcan la unión entre CD47 en la superficie de una primera célula y SIRPa en la superficie de una segunda

célula, comprendiendo el método cribar principios activos que reduzcan la expresión o la actividad enzimática de QPCTL, QPCT o combinaciones de estas.

5 [0017] También se describe en este documento el uso de un inhibidor de QPCTL, QPCT o combinaciones de estas para reducir la unión entre CD47 en la superficie de una primera célula y SIRPa en la superficie de una segunda célula de un sujeto.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

10 [0018]

15 **Figura 1.** En la figura 1 se muestra un cribado genético haploide basado en flujo para los niveles de CD47 en células HAP1. Cribado mediante citometría de flujo para moduladores de la expresión de CD47 en la superficie celular de células HAP1. Los puntos representan genes individuales, el eje X indica el número total de sitios de inserción de trampa génica por gen, el eje Y indica la frecuencia de eventos de inserción de trampa génica independientes en el canal CD47ALTO dividida por la frecuencia de eventos de inserción en el gen respectivo en el canal CD47BAJO (índice de mutación, MI). Los puntos indican aquellos genes que están significativamente enriquecidos (valor P corregido por PDR) dentro de la población CD47ALTO (parte superior del gráfico) y CD47BAJO (parte inferior del gráfico), respectivamente. QPCTL (negrita) y CD47 son ejemplos de genes enriquecidos en la población CD47BAJO.

20 **Figura 2A.** En la figura 2A se muestran los cambios en la intensidad de fluorescencia media (MFI) relativa, evaluada mediante citometría de flujo, de los niveles de CD47 en células HAP 1 (WT, CD47 KO cl23, QPCTLKO cl10 y QPCTLKO cl21) después de la tinción inmunohistológica con varios anticuerpos anti-CD47, incluido el clon CC2C6, clon B6H12 y clon 2D3. "Sin teñir" se refiere a células HAP 1 (WT) que no se sometieron a tinción inmunohistológica con diversos anticuerpos anti-CD47, incluidos el clon CC2C6, el clon B6H12 y el clon 2D3.

25 **Figura 2B.** En la figura 2B se muestran los cambios relativos en la intensidad de fluorescencia media (MFI), evaluada mediante citometría de flujo, de la unión de SIRPa-Fc en células HAP1 (tipo salvaje (WT), CD47 KO cl23, QPCTLKO cl10 y QPCTLKO cl21). "Sin teñir" se refiere a células HAP 1 (WT), que no se unieron a SIRPa-Fc.

30 **Figura 3A.** En la figura 3A se muestran los cambios en la intensidad de fluorescencia media relativa (MFI), evaluada mediante citometría de flujo, de los niveles de CD47 en células A375 (WT, CD47 KO cl2 y QPCTLKO cl4.1) después de la tinción inmunohistológica con varios anticuerpos anti-CD47, incluido el clon CC2C6, clon B6H12 y clon 2D3. "Sin teñir" se refiere a células A375 (WT) que no se sometieron a tinción inmunohistológica con varios anticuerpos anti-CD47, incluidos el clon CC2C6, el clon B6H12.2 y el clon 2D3. Las células A375 se refieren a una línea celular de melanoma humano.

35 **Figura 3B.** En la Figura 3B se muestran los cambios relativos de la intensidad de fluorescencia media (MFI), evaluada mediante citometría de flujo, de la unión de SIRPa-Fc en células A375 (WT, CD47KO cl2 y QPCTLKO cl4.1). "Sin teñir" se refiere a células A375 (WT) que no se unieron a SIRPa-Fc. Las células A375 se refieren a una línea celular de melanoma humano.

40 **Figura 4A.** En la figura 4A se muestran los cambios en la intensidad de fluorescencia mediana relativa (MFI), evaluada mediante citometría de flujo, de los niveles de CD47 en células RKO (WT, CD47KO cl12 y QPCTLKO cl1) después de la tinción inmunohistológica con varios anticuerpos anti-CD47, incluido el clon CC2C6 y el clon 2D3. "Sin teñir" se refiere a células RKO (WT) que no se sometieron a tinción inmunohistológica con varios anticuerpos anti-CD47, incluido el clon CC2C6 y el clon 2D3. Las células RKO se refieren además a una línea celular de carcinoma rectal humano.

45 **Figura 4B.** En la Figura 4B se muestran los cambios relativos de la intensidad de fluorescencia media (MFI), evaluada mediante citometría de flujo, de la unión de SIRPa-Fc en células RKO (WT, CD47KO cl2 y QPCTLKO cl4.6). "Sin teñir" se refiere a células RKO (WT) que no se unieron a SIRPa-Fc. Las células RKO se refieren además a una línea celular de carcinoma rectal humano.

50 **Figura 5.** En la Figura 5 se muestran los cambios en la intensidad de fluorescencia mediana relativa (MFI), evaluada mediante citometría de flujo, de la unión de SIRPa-Fc en células HAP1 WT (sometidas a tinción inmunohistoquímica con los anticuerpos anti-CD47 clon CC2C6 o clon 2D3 antes de la unión con SIRPa-Fc). "Sin teñir" se refiere a células HAP1 WT, que no se unieron a SIRPa-Fc y no se tiñeron inmunohistoquímicamente con los anticuerpos anti CD47 clon CC2C6 o clon 2D3. "Sin ac" se refiere a células HAP1 WT que no se sometieron a inmunohistoquímica con los anticuerpos anti-CD47 clon CC2C6 o clon 2D3 pero que se unieron a SIRPa-Fc.

55

5 **Figura 6.** En la Figura 6 se muestran los cambios en la intensidad de fluorescencia media relativa (MFI), evaluada mediante citometría de flujo, de los niveles de CD47 en células HAP1 QPCTL KO (cl10 y cl21) que no estaban transducidas (UT) o transducidas con la variante 1 del transcripto QPCTL ("QPCTL(1)") o la variante 2 del transcripto QPCTL ("QPCLT(2)") después de la tinción inmunohistoquímica con los anticuerpos anti-CD47 clon CC2C6 y clon 2D3, así como después de la unión a SIRPa-Fc. "WT UT" se refiere a células HAP 1 WT no transducidas con el transcripto QPCTL QPCTL(1) o QPCLT(2).

10 **Figura 7.** En la Figura 7 se muestran los cambios relativos en la intensidad de fluorescencia media (MFI), evaluada mediante citometría de flujo, de los niveles de CD47 en células HAP1 CD47 KO (cl4, cl17 y cl23) que no estaban transducidas (UT) o transducidas con CD47 de tipo salvaje ("CD47 WT") o un transcripto mutante de CD47 ("CD47 MUT") que no puede ser modificado por QPCTL, después de la tinción inmunohistoquímica con los anticuerpos anti CD47 clon CC2C6 y clon 2D3, así como después de la unión a SIRPa-Fc.

15 **Figura 8 A.** En la Figura 8A se muestran los cambios en la intensidad de fluorescencia media (MFI), evaluada mediante citometría de flujo, de los niveles de CD47 en células HAP1 tratadas durante 48 horas con un vehículo o PBD150 1000 μ M o PBD150 100 μ M o control de isotipo, seguido de tinción inmunohistoquímica con el anticuerpo anti-CD47 clon CC2C6.

20 **Figura 8 B.** En la Figura 8B se muestran los cambios en la intensidad de fluorescencia media (MFI), evaluada mediante citometría de flujo, de los niveles de CD47 en células HAP1 tratadas durante 120 horas con vehículo o 72 horas con PBD150 1000 μ M seguido de 48 horas con PBD150 1000 μ M o 72 horas con PBD150 1000 μ M seguido de 48 horas sin PBD150 o 120 horas con control de isotipo, seguido de tinción inmunohistoquímica con el anticuerpo anti-CD47 clon CC2C6.

25 **Figura 9.** En la figura 9 se muestran los cambios en la intensidad de fluorescencia media (MFI), evaluada mediante citometría de flujo, de los niveles de CD47 en células A375, células A549, células DLD1, células HAP1 y células RKO tratadas durante 72 horas con vehículo (DMSO) o 72 horas con PBD150 1000 μ M, donde se añadió DMSO o PBD150 nuevo cada 24 horas, seguido de tinción con el anticuerpo anti CD47 clon CC2C6, 2D3 o SIRPa-Fc.

30 **Figura 10.** Identificación de QPCTL como modulador de la unión de CD47-SIRPa. (A) Cribado genético haploide mediante citometría de flujo para moduladores de CD47, según lo detectado por la unión del clon CC2C6 del anticuerpo anti-CD47 (α CD47-CC2C6). Los puntos representan genes individuales; el eje x indica el número de inserciones disruptivas por gen; El eje y muestra la frecuencia de inserciones independientes en células con alta expresión de CD47 (canal CD47-CC2C6^{ALTO}) frente a la frecuencia de inserciones en células con baja expresión de CD47 (canal CD47-CC2C6^{BAJO}) para cada gen. Los puntos azul claro y naranja indican genes con un enriquecimiento significativo de inserciones (P corregido por $FDR < 0,05$) dentro de las poblaciones de CD47-CC2C6^{ALTO} y CD47-CC2C6^{BAJO}, respectivamente. Los puntos verdes representan CD47 y QPCTL.

35 (B) Gráfico de citometría de flujo de la unión superficial del anticuerpo anti-CD47 clon B6H12 (α CD47-B6H12) y α CD47-CC2C6 a células HAP1 WT, CD47 KO y QPCTL KO (cl21).

40 (C) Unión del anticuerpo anti-CD47 clon 2D3 (α CD47-2D3), α CD47-B6H12 y α CD47-CC2C6 a la superficie celular de células HAP1 WT, CD47 KO o QPCTL KO, según lo determinado por citometría de flujo. Los valores indican la MFI en relación con las células WT teñidas con el mismo reactivo.

45 (D) Unión de SIRPa-Fc humana (hSIRPa-Fc) a la superficie celular de células HAP1 WT, CD47 KO o QPCTL KO (cl10 y cl21), según lo determinado por citometría de flujo. Los valores indican la MFI en relación con las células WT.

50 (E) Unión de α CD47-2D3, α CD47-B6H12, α CD47-CC2C6 y hSIRPa-Fc a la superficie celular de células A375 de melanoma WT, CD47 KO y QPCTL KO ("cl4.1" y "cl4.6") y a células A431 de carcinoma epidermoide WT, CD47 KO y QPCTL KO (cl6), determinada por citometría de flujo. Los valores indican la MFI en relación con las células WT teñidas con el mismo reactivo.

55 Los datos son representativos de uno (A) o al menos dos (B, C, D, E) experimentos independientes y se analizaron mediante la prueba t no pareada (C, D, E). Los datos representan la media \pm DE de triplicados. *** $P < 0,001$.

MI: índice de mutación; MFI, intensidad de fluorescencia media; WT, de tipo salvaje; KO, "knockout" o con gen inactivado.

60 **Figura 11.** La formación de piroglutamato ocurre temprano en el ciclo de vida de la proteína CD47 y depende completamente de la QPCTL.

65 (A) Análisis por SDS-PAGE de inmunoprecipitados de α CD47-B6H12 (B) o α CD47-CC2C6 (C) de células A375 de melanoma WT o QPCTL KO (cl4.1) que sobreexpresan CD47-HA después de un período de caza de 0, 1, 2 o 4 horas (h) posterior a un marcaprocesos con 35 S metionina/cisteína de 30'.

(B) Análisis por SDS-PAGE de inmunoprecipitados de α CD47-B6H12 (B) o α CD47-CC2C6 (C) de células A375 de melanoma WT o QPCTL KO (cl4.1) con sobreexpresión de CD47-HA después de una caza de 0 o 30' posterior a un marcaje con 35 S metionina/cisteína de 10'.

5 OE, sobreexpresión; B, α CD47-B6H12; C, α CD47-CC2C6.

Figura 12. La inhibición de QPCTL por moléculas pequeñas afecta a la unión de SIRP α a CD47 (A) Unión de α CD47-2D3, α CD47-CC2C6 y hSIRP α -Fc a la superficie celular de células (A375) de melanoma, de carcinoma epidermoide (A431) y de linfoma de Burkitt (Raji) tratadas con (DMSO) (-) o tratadas con SEN177 (+), determinada por citometría de flujo. Los valores indican la MFI en relación con las células WT teñidas con el mismo reactivo.

(B) Gráfico de citometría de flujo de la unión de α CD47-B6H12 y α CD47-CC2C6 a la superficie celular de células de melanoma (A375) tratadas con control o tratadas con SEN177.

15 (C) Análisis por enfoque isoelectrónico de inmunoprecipitados de α CD47-B6H12 de células de melanoma (A375) WT que sobreexpresan CD47-HA, QPCTL KO que sobreexpresan CD47-HA o CD47 KO sin tratar (-) o tratadas con SEN177 (+).

20 (D) Análisis por SDS-PAGE de inmunoprecipitados de α CD47-B6H12 (B) o α CD47-CC2C6 (C) de células de melanoma (A375) que sobreexpresan CD47-HA de WT, QPCTL KO (cl4.1) o CD47 KO después de un marcaje con 35 S metionina/cisteína de 30' en presencia (+) o ausencia (-) de SEN177.

25 Los datos son representativos de al menos dos experimentos independientes. Los datos se analizaron mediante la prueba t de dos colas no pareada (A). Los datos representan la media \pm DE de triplicados (A). * $P<0,05$; ** $P<0,01$; *** $P<0,001$.

Figura 13. Mayor control de los tumores con deficiencia de QPCTL por parte de las células inmunitarias innatas y adaptativas.

(A) Lisis específica de células pro-B murinas WT, CD47 KO y QPCTL KO que expresan Her2 (Ba/F3-Her2) por neutrófilos humanos en presencia o ausencia de IgA1 anti-Her2 en un ensayo de liberación de 51 Cr de 4 horas.

30 (B) Lisis específica de células pro-B murinas que expresan Her2 (Ba/F3-Her2) tratadas con control (DMSO) (-) o tratadas con SEN177 (+) por neutrófilos humanos en presencia o ausencia de IgA1 anti-Her2 en un ensayo de liberación de 51 Cr de 4 horas.

35 (C) Destrucción *in vivo* de células diana en ratones a los que se inyectó con una mezcla 1:1 de células pro-B murinas que expresan Her2 (Ba/F3-Her2) WT y QPCTL KO y tratados con control (PBS) o anticuerpo IgA1 anti-Her2. Los datos representan la proporción entre Ba/F3-Her2 QPCTL KO y WT en ratones tratados con PBS (puntos) o IgA1 anti-Her2 (cuadrados). $n = 6$ animales por grupo.

40 (D) Gráficos de análisis de flujo representativos de (C) de linfocitos Tumorales WT y QPCTL KO recuperados en ratones tratados con control (PBS) o IgA1 anti-Her2.

(E) Número de PMN(Ly-6G $^{+}$ CD11b $^{+}$), eosinófilos (SSC ALTO Siglec-F $^{+}$) y macrófagos (F4/80 $^{+}$ CD11b $^{+}$) peritoneales presentes en receptores de una mezcla 1:1 de células pro-B murinas que expresan Her2 WT y QPCTL KO tratadas con PBS (-) o con anticuerpo IgA1 anti-Her2 (+), 16 horas después del tratamiento.

45 Los datos se analizaron mediante una prueba t de dos colas no apareada (A, B, C, E). Los datos representan la media \pm DE de triplicados (A, B) de un donante representativo, o media \pm DE de ratones independientes (E, F). * $P<0,05$; ** $P<0,01$; *** $P<0,001$.

Figura 14. Unión de α CD47-2D3, α CD47-B6H12, α CD47-CC2C6 y hSIRP α -Fc a la superficie celular de células WT, CD47 o QPCTL KO de cáncer de pulmón (A549) (A), de cáncer colorrectal (DLD1) (B) y de carcinoma rectal (RKO) (C) determinada por citometría de flujo. Los valores indican la MFI en relación con las células WT teñidas con el mismo reactivo. MFI, intensidad de fluorescencia media; WT, de tipo salvaje; KO, knockout.

Figura 15. Unión de α CD47-2D3 y α CD47-CC2C6 a la superficie celular de células WT, QPCTL KO o QPCTL KO de melanoma (A375) (A), de carcinoma epidermoide (A431) (B) y de cáncer de pulmón (A549) (C) reconstituidas con ADNc marcado con FLAG de la isoforma 1 de QPCTL (OE var.1) o la isoforma 2 de QPCTL (OE var.2), según lo determinado por citometría de flujo. (D) Análisis de transferencia Western de células WT, QPCTL KO o QPCTL KO de melanoma (A375) reconstituidas con ADNc marcado con FLAG de la isoforma 1 de QPCTL (OE var.1) o la isoforma 2 de QPCTL (OE var.2). (E) Unión de α CD47-CC2C6 a la superficie celular de células HAP1 QPCTL KO reconstituidas con QPCTL var.1 o una variante de QPCTL catalíticamente inactiva (QPCTL var.1 D326E), según lo determinado por citometría de flujo. (F) Unión de α CD47-CC2C6 a la superficie celular de células QPCTL KO de melanoma (A375) reconstituidas con QPCTL var.1 o QPCTL var.1 (D326E), según lo determinado por citometría de flujo. Los valores en A-C, E, F indican la MFI en relación con las células WT teñidas con el mismo reactivo.

OE, sobreexpresión.

Figura 16. (A) Unión de α CD47-2D3, α CD47-CC2C6 y hSIRPa-Fc a la superficie celular de células de cáncer de pulmón (A549), colorrectal (DLD1), HAP1, carcinoma rectal (RKO) y cáncer de mama (SKBR3) tratadas con control (DMSO) (-) o tratadas con SEN177 (+), según lo determinado por citometría de flujo. (B) Unión de α CD47-2D3, α CD47-CC2C6 y hSIRPa-Fc a la superficie celular de células de melanoma (A375) tratadas con control (DMSO) (-), tratadas con SEN177 o tratadas con PQ912, según lo determinado por citometría de flujo. (C) Gráfico de citometría de flujo de la unión superficial del anticuerpo anti-CD47 clon B6H12 (α CD47-B6H12) y α CD47-CC2C6 a células de melanoma (A375) tratadas con control o tratadas con PQ912. (D) Unión de α CD47-2D3, α CD47-CC2C6 y hSIRPa-Fc a la superficie celular de células de carcinoma epidermoide (A431) y de cáncer de pulmón (A549) de tipo salvaje y con inactivación (*knockout*) de QPCTL tratadas con (DMSO) (-) o tratadas con SEN177 (+), determinada por citometría de flujo. Los valores en A, B, D indican la MFI en relación con las células WT teñidas con el mismo reactivo.

Figura 17. (A) Unión de anticuerpo anti-CD47 de ratón MIAP301 (α CD47-MIAP301) y SIRPa-Fc de ratón (mSIRPa-Fc) a la superficie celular de poblaciones KO de células de melanoma murino (B16F10) WT, CD47 KO y QPCTL (KO#1 y KO#2), y células pro-B de ratón que expresan Her2 (Ba/F3-Her2) WT, CD47 KO y QPCTL KO (cl8 y cl30), según lo determinado por citometría de flujo. (B) Unión de α CD47-MIAP301 y mSIRPa-Fc a la superficie celular de células WT, QPCTL KO o QPCTL KO de melanoma murino (B16F10) reconstituidas con el ADNc de QPCTL murino (OE), según lo determinado por citometría de flujo. (C) Unión de α CD47-MIAP301 y mSIRPa-Fc a la superficie celular de células de melanoma murino (B16F10) o pro-B murinas que expresan Her2 (Ba/F3-Her2) tratadas con control (DMSO) (-) o tratadas con SEN177 (+), según lo determinado por citometría de flujo. (D) Lisis específica de células pro-B murinas (Ba/F3-Her2) CD47 KO o QPCTL KO tratadas con control (DMSO) (-) o tratadas con SEN177 (+) por neutrófilos humanos en presencia de IgA1 anti-Her2 en un ensayo de liberación de ^{51}Cr de 4 horas. (E) Lisis específica de células pro-B murinas (Ba/F3-Her2) WT, CD47 KO o QPCTL KO por células inmunitarias murinas aisladas de sangre total en presencia o ausencia de IgA1 anti-Her2 en un ensayo de liberación de ^{51}Cr de 4 horas. (F) Lisis específica de células pro-B murinas (Ba/F3-Her2) tratadas con control (DMSO) (-) o tratadas con SEN177 (+) por células inmunitarias murinas aisladas de sangre total en presencia o ausencia de IgA1 anti-Her2 en un ensayo de liberación de ^{51}Cr de 4 horas. Los valores en A-C indican la MFI en relación con las células WT teñidas con el mismo reactivo. Los datos son representativos de al menos dos experimentos independientes (D-F). Los datos fueron analizados por prueba de t (A, C, F) o ANOVA pareado unidireccional con medidas repetidas, comparación múltiple (E) a 10/ $\mu\text{g/mL}$ IgA1 anti-Her2 (E, F) y representación \pm DE de triplicados (A - F). * $P<0,05$; ** $P<0,01$; *** $P<0,001$.

Figura 18. (A) Representación esquemática de la configuración *in vivo*. (B) Número absoluto (ver Fig. 13C) de linfocitos tumorales recuperados en ratones inyectados con mezclas 1:1 de linfocitos Ba/F3-Her2 WT y QPCTL KO que se trataron con PBS (-) o IgA1 anti-Her2 (+). (C) Número (ver Fig. 13C y 13D) de CD8 T (CD3^+ CD8^+), CD4 T (CD3^+ CD4^+) o B (B220^+ MHCII $^+$) presentes en ratones que recibieron una mezcla 1:1 de linfocitos Ba/F3-Her2 WT y QPCTL KO, y que se trataron con control (-) o con IgA1 anti-Her2 (+). (D) Proporción de destrucción *in vivo* de células diana en ratones inyectados con una mezcla 1:1 de células WT y CD47-KO, o una mezcla 1:1 de linfocitos Ba/F3-Her2 WT y QPCTL-KO, y que se trataron con PBS (-) o anticuerpo IgA1 anti-Her2 (+). Los puntos representan ratones tratados con control (PBS), los cuadrados representan ratones tratados con IgA1 anti-Her2. $n = 5-6$ animales por grupo. (E) Número absoluto (ver Fig. 18D) de linfocitos tumorales recuperados en ratones inyectados con una mezcla 1:1 de células WT y CD47-KO, o una mezcla 1:1 de linfocitos Ba/F3-Her2 WT y QPCTL-KO, y que se trataron con PBS (-) o anticuerpo IgA1 anti-Her2 (+). Los puntos representan ratones tratados con control (PBS), los cuadrados representan ratones tratados con IgA1 anti-Her2. (F) Número absoluto (ver Fig. 18D) de PMN peritoneales (Ly-6G^+ / CD11b^+), eosinófilos ($\text{SSC}^{\text{ALTO}}/\text{Siglec-F}^+$), macrófagos (F4/80^+ CD11b^+), CD8 T ($\text{CD3}^+/\text{CD8}^+$), CD4 T ($\text{CD3}^+/\text{CD4}^+$) o B ($\text{B220}^+/\text{MHCII}^+$) presentes en receptores de una mezcla 1:1 de linfocitos Ba/F3-Her2 WT y QPCTL KO que se trataron con control (-) o con IgA1 anti-Her2 (+), 16 horas después del tratamiento. Los puntos representan ratones tratados con control (PBS), los cuadrados representan ratones tratados con IgA1 anti-Her2. Los datos son representativos de dos experimentos independientes (B, C) o uno (D, E, F). Los datos se analizaron mediante una prueba t (B, C, D), ANOVA unidireccional seguido de pruebas de comparaciones múltiples (E, F) y representan \pm DE de ratones individuales (B-F). * $P<0,05$; ** $P<0,01$; *** $P<0,001$.

Figura 19. Se representa la intensidad de fluorescencia media normalizada para células HAP1 (a,e), A375 (b,c) o RKO (d) incubadas durante 48 horas con PQ912 (a-d) o SEN-177 (e) y teñidas con el clon 2D3 anti CD47 humana, que reconoce la CD47 total (barras grises) y el clon CC2C6 anti CD47 humana conjugado con Alexa647, que reconoce CD47 piroglutamilada (barras negras) (a,b,d,e) o incubada con proteína recombinante SIRPa-Fc humana y posteriormente teñidas con anticuerpo secundario de conejo anti humano conjugado con APC (barras negras) (c).

Figura 20. Se representa la intensidad de fluorescencia media normalizada para células HAP1 (a-h), A375 (i-m) o RKO (n) incubadas durante 48 horas con los compuestos 000016 (a,h,k,n), 000035 (b,i,l), 000037 (c,

5 j, m), 000034 (d), 000051 (e), 000054 (f) o 000055 (g) y teñidas con el clon 2D3 anti CD47 humana conjugado con FITC, reconociendo la CD47 total (barras grises) y con el clon CC2C6 anti CD47 humana conjugado con Alexa647, que reconoce la CD47 piroglutamilada (barras negras) (a-j,n) o incubadas con proteína recombinante SIRPa-Fc humana y posteriormente teñidas con anticuerpo secundario de conejo anti humano conjugado con APC (barras negras) (k-m).

10 **Figura 21.** Se representa la intensidad de fluorescencia media normalizada para células HAP1 (a-c), A375 (d,e) o RKO (f) incubadas durante 48 horas con los compuestos 000024 (a,d,e,f), 000027 (b) o 000050 (c) y teñidas con el clon 2D3 anti CD47 humana conjugado con FITC, que reconoce la CD47 total (barras grises) y el clon CC2C6 anti CD47 humana conjugado con Alexa647, que reconoce la CD47 piroglutamilada (barras negras) (a-d, f) o incubadas con proteína recombinante SIRPa-Fc humana y posteriormente teñidas con anticuerpo secundario de conejo anti humano conjugado con APC (barras negras) (e).

15 **Figura 22.** Se representa la intensidad de fluorescencia media normalizada para células HAP1 (a-i), A375 (j-o) o RKO (p) incubadas durante 48 horas con los compuestos 000011 (a, j, m, p), 000010 (b, k, n), 000036 (c,l,o), 000020 (d), 000021 (e), 000022 (f), 000023 (g), 000025 (h) o 000026 (i) y teñidas con el clon 2D3 anti CD47 humana conjugado con FITC, que reconoce la CD47 total (barras grises) y el clon CC2C6 anti CD47 humana conjugado con Alexa647, que reconoce la CD47 piroglutamilada (barras negras) (a-l,p) o incubadas con proteína recombinante SIRPa-Fc humana y posteriormente teñidas con anticuerpo secundario de conejo anti humano conjugado con APC (barras negras) (m-o).

20 **Figura 23.** Se representa la intensidad de fluorescencia media normalizada para células HAP1 (a-k), A375 (l-n) o RKO (o,p) incubadas durante 48 horas con los compuestos 000012 (a,l,n,o), 000030 (b,m,p), 000013 (c), 000014 (d), 000029 (e), 000031 (f), 000032 (g), 000048 (h), 000049 (i), 000052 (j) o 000053 (k) y teñidas con el clon 2D3 anti CD47 humana conjugado con FITC, que reconoce la CD47 total (barras grises) y el clon CC2C6 anti CD47 humana conjugado con Alexa647, que reconoce la CD47 piroglutamilada (barras negras) (a-m,o,p) o incubadas con proteína recombinante SIRPa-Fc humana y posteriormente teñidas con anticuerpo secundario de conejo anti humano conjugado con APC (barras negras) (n).

25 **Figura 24.** Se representa la intensidad de fluorescencia media normalizada para células HAP1 (a-d), A375 (e,f) o RKO (g) incubadas durante 48 horas con los compuestos 000044 (a,e,f,g), 000060 (b), 000064 (c) , o 000066 (d) y teñidas con el clon 2D3 anti CD47 humana conjugado con FITC, que reconoce la CD47 total (barras grises) y el clon CC2C6 anti CD47 humana conjugado con Alexa647, que reconoce la CD47 piroglutamilada (barras negras) (a-e,g) o incubadas con proteína recombinante SIRPa-Fc humana y posteriormente teñidas con anticuerpo secundario de conejo anti-humano conjugado con APC (barras negras) (f).

30 **Figura 25.** La intensidad de fluorescencia media normalizada se representa para las células HAP1 incubadas durante 48 horas con los compuestos 000015 (a), 000033 (b), 000046 (c) o 000040 (d) y teñidas con el clon 2D3 anti CD47 humana conjugado con FITC, que reconoce la CD47 total (barras grises) y el clon CC2C6 anti CD47 humana conjugado con Alexa647, que reconoce la CD47 piroglutamilada (barras negras).

35 **Figura 26.** Actividad de isoQC normalizada en comparación con el control en presencia de los compuestos indicados, analizada a la concentración máxima indicada entre paréntesis (barras blancas) y concentraciones diez y cien veces más bajas (barras grises y negras, respectivamente).

40 **Figura 27.** Actividad de pGAPasa normalizada en comparación con el control en presencia de los compuestos indicados, analizada a la concentración máxima indicada entre paréntesis (barras blancas) y concentraciones diez y cien veces más bajas (barras grises y negras, respectivamente).

45 **Figura 28.** Unión a la superficie celular de hSIRPa-Fc y α CD47-CC2C6, donde ambas reconocen la CD47 piroglutamilada y α CD47-2D3 (que reconoce pan-CD47 específico) para seis cultivos a corto plazo de xenoinjertos de melanoma tratados con SEN177.

50 55 DESCRIPCIÓN DETALLADA

Definiciones

60 [0019] Varios términos relacionados con los métodos, composiciones, usos y otros aspectos de la presente invención se utilizan a lo largo de la memoria descriptiva y las reivindicaciones. Dichos términos deben tener su significado habitual en la técnica a la que se refiere la invención, a menos que se indique lo contrario. Otros términos definidos específicamente deben interpretarse de manera coherente con la definición proporcionada en este documento. Cualquier método y material similar o equivalente a los descritos en este documento se puede utilizar en la práctica para probar la presente invención. Para los fines de la presente invención, los siguientes términos se definen a continuación.

5 [0020] Como se usa en este documento, las formas singulares "un", "una" y "el/la" incluyen referentes plurales a menos que el contexto dicte claramente lo contrario. Por ejemplo, un método para administrar un fármaco incluye la administración de una pluralidad de moléculas (por ejemplo, 10, 100, 1000, 10 de miles, 100 de miles, millones o más moléculas).

10 [0021] Como se usa en este documento, el término "y/o" indica que pueden darse uno o más de los casos establecidos, solos o en combinación con al menos uno de los casos establecidos, hasta con todos los casos establecidos.

15 [0022] Tal como se usa en el presente documento, "comprender" y sus conjugaciones se usan en su sentido no limitativo para indicar que se incluyen los elementos que siguen a la palabra, pero no se excluyen los elementos que no se mencionan específicamente. También abarca el más limitante "consistir en".

20 [0023] El término "alrededor de" y "aproximadamente", como se usa en el presente documento, se refiere a un valor medible, como una cantidad, una duración temporal y similares, y pretende abarcar variaciones de $\pm 20\%$ o $\pm 10\%$, más preferiblemente $\pm 5\%$, incluso más preferiblemente $\pm 1\%$, y aún más preferiblemente $\pm 0,1\%$ del valor especificado, ya que tales variaciones son apropiadas para realizar los métodos descritos.

25 [0024] El término "técnicas convencionales" o "métodos conocidos por los expertos" como se usa en este documento se refiere a una situación en la que los métodos para llevar a cabo las técnicas convencionales usadas en los métodos de la invención serán evidentes para los expertos. La práctica de técnicas convencionales en biología molecular, bioquímica, cultivo celular, genómica, secuenciación, selección de fármacos y campos relacionados es ampliamente conocida por los expertos en la técnica.

30 [0025] El término "células enfermas", como se usa en el presente documento, se refiere a una célula que se encuentra en un individuo enfermo (que padece una enfermedad o afección patológica, por ejemplo, cáncer) y que es anormal en términos de su estructura y/o funcionamiento y/o metabolismo y/ genoma en comparación con una célula que tiene una estructura, función, metabolismo y genoma que son característicos de una célula que se encuentra en un individuo sano (que no padece una enfermedad o afección, por ejemplo, cáncer). En el contexto de la presente invención, los ejemplos no limitantes de células enfermas incluyen células cancerosas o tumorales (por ejemplo, en el caso del cáncer), células del músculo liso vascular enfermas y células endoteliales enfermas (por ejemplo, en el caso de la ateroesclerosis), células enfermas infectadas por un patógeno tal como un virus (por ejemplo, en el caso de enfermedades infecciosas), células enfermas que experimentan fibrosis (por ejemplo, en el caso de enfermedades fibróticas), y otros. Se entiende además que el fenotipo, los aspectos físicos o las características de las células enfermas varían dependiendo de la enfermedad o afección (por ejemplo, cáncer, ateroesclerosis, enfermedades fibróticas y enfermedades infecciosas, etc.). Por ejemplo, en el caso del cáncer, las células enfermas se dividen sin descanso, formando tumores sólidos o inundando la sangre con células anormales (por ejemplo, que expresan marcadores específicos en su superficie celular, tienen una morfología alterada, un ciclo celular alterado, un genoma alterado, etc., que son distintas de las células (sanas) derivadas de individuos sanos o no enfermos (por ejemplo, que no padecen cáncer)). Los expertos saben cómo distinguir, utilizando técnicas y conocimientos estándar (por ejemplo, utilizando marcadores específicos para cada enfermedad), una célula enferma de una célula no enferma o sana, dependiendo de las enfermedades o afecciones, por ejemplo, cáncer, ateroesclerosis, enfermedades fibróticas y enfermedades infecciosas, etc., incluyendo varios tipos de cáncer, tipos de enfermedades fibróticas así como tipos de enfermedades infecciosas. Además de la presencia de marcadores específicos para la enfermedad en cuestión, las células enfermas también expresan o sobreexpresan CD47 (aunque la sobreexpresión no es necesaria para detectar una célula enferma según la presente invención) en su superficie.

40 [0026] El término "señal don't eat me" o "señal antifagocítica", tal como se usa en este documento, es un término de uso común en inmunología para referirse a una señal (por ejemplo, señal(es) molecular o química(s)) que impide(n) o interfiere(n) o evita(n) o reduce(n) la acción de los fagocitos (por ejemplo, macrófagos, neutrófilos) hacia una célula o sustancias o materiales determinados, por ejemplo, que reduce(n) o evita(n) o bloquea(n) o inhibe(n) la fagocitosis.

45 [0027] El término "molécula pequeña" como se usa en este documento, se refiere a un término comúnmente usado en biología molecular y farmacología para referirse a un compuesto orgánico que tiene un peso molecular bajo (< 900 daltons) con un tamaño del orden de 1 nm. Las moléculas pequeñas son populares por su capacidad para regular los procesos biológicos, lo que explica por qué la mayoría de los medicamentos son moléculas pequeñas. Debido a su límite superior de peso molecular de aproximadamente 900 daltons, las moléculas pequeñas pueden difundirse rápidamente a través de las membranas celulares para alcanzar los sitios de acción intracelulares (por ejemplo, el aparato de Golgi). Aunque no es esencial, a menudo se recomienda un límite inferior de peso molecular de aproximadamente 500 dalton para los candidatos para el desarrollo de fármacos de molécula pequeña en función de la observación de que las tasas de retirada clínica se reducen significativamente si el peso molecular se mantiene por debajo de este límite de 500 dalton. Las moléculas pequeñas se seleccionan o clasifican en función de su capacidad para unirse a una diana biológica específica, como una

5 proteína específica (por ejemplo, la proteína QPCTL o QPCT) o ácido nucleico (por ejemplo, el gen QPCTL o QPCT), y de su capacidad para actuar como efecto (por ejemplo, activador o inhibidor) para alterar la actividad o función de la diana (por ejemplo, bloquear o reducir la actividad enzimática, evitar la unión a una diana, evitar la modificación postraduccional de una diana, etc.). Las moléculas pequeñas pueden ser naturales (como metabolitos secundarios) o artificiales (por ejemplo, fármacos); pueden tener un efecto beneficioso contra una enfermedad (por ejemplo, fármacos para el tratamiento del cáncer) o pueden ser perjudiciales (por ejemplo, teratógenos y carcinógenos). Los oligómeros muy pequeños también pueden considerarse moléculas pequeñas, como dinucleótidos, péptidos como el antioxidante glutatión y disacáridos como la sacarosa. Las moléculas pequeñas también se pueden utilizar como herramientas de investigación para analizar la función biológica, así como en el desarrollo de nuevos agentes terapéuticos. Algunas pueden inhibir una función específica de una proteína multifuncional o interrumpir las interacciones proteína-proteína (por ejemplo, bloquear la interacción o la unión entre CD47 y SIRPa), etc. En la presente invención, la molécula pequeña puede ser un inhibidor enzimático, es decir, una molécula que se une a una enzima y disminuye su actividad.

10 15 [0028] El término "muestra biológica" o "muestra de un sujeto" o "biopsia", como se usa en el presente documento, abarca una variedad de tipos de muestras (por ejemplo, muestras biológicas de cáncer) obtenidas de un organismo o un sujeto y que pueden usarse en un diagnóstico o estudio de seguimiento o estudios de cribado como se da a conocer en el presente documento. El término abarca la sangre y otras muestras líquidas de origen biológico, muestras de tejido sólido, como una muestra de biopsia o cultivos de tejidos o células derivadas de estos y su progenie. El término abarca muestras que han sido manipuladas de alguna manera después de su obtención, como por tratamiento con reactivos, solubilización o enriquecimiento de ciertos componentes. El término abarca una muestra clínica y también incluye células en cultivo celular, sobrenadantes celulares, lisados celulares, suero, plasma, fluidos biológicos y muestras de tejido.

20 25 [0029] Los términos "tratamiento", "tratar" y similares, como se usan en este documento, generalmente se refieren a la obtención de un efecto farmacológico y/o fisiológico deseado (por ejemplo, la reducción del tamaño del tumor o la remisión del cáncer). El efecto puede ser profiláctico en términos de prevención total o parcial de una enfermedad (por ejemplo, un tipo de cáncer) o un síntoma de esta y/o puede ser terapéutico en términos de estabilización o cura parcial o total de una enfermedad (por ejemplo, cáncer que comprende células positivas para CD47 o en el que está involucrado el eje de señalización CD47-SIRPa) y/o un efecto adverso atribuible a la enfermedad. "Tratamiento", como se usa en el presente documento, también cubre cualquier tratamiento de una enfermedad (por ejemplo, cáncer, como un cáncer que comprende células positivas para CD47 o en el que está involucrado el eje de señalización CD47-SIRPa) en un mamífero, particularmente un ser humano, e incluye: (a) prevenir la aparición de una enfermedad o síntoma en un sujeto que puede estar predisposto a la enfermedad o síntoma pero a quien aún no se le ha diagnosticado; (b) inhibir o aliviar o reducir el síntoma o las consecuencias de la enfermedad, es decir, detener su desarrollo (por ejemplo, reducir el tamaño del tumor); o (c) aliviar el síntoma de la enfermedad, es decir, provocar la regresión de la enfermedad o síntoma.

30 35 40 [0030] Con respecto a las composiciones farmacéuticas utilizadas en los tratamientos descritos en el presente documento, se entenderá que estas pueden presentarse en formas de dosis unitaria que contengan una cantidad predeterminada de principio activo por dosis unitaria. Como saben los expertos en la materia, la cantidad de ingrediente activo por dosis dependerá de la enfermedad que se esté tratando, la vía de administración y la edad, peso y estado del paciente. Dichas composiciones farmacéuticas pueden prepararse mediante cualquiera de los métodos ya conocidos en la técnica.

45 50 [0031] Los compuestos usados en los tratamientos descritos en el presente documento pueden administrarse por cualquier vía apropiada. Las vías adecuadas incluyen oral, rectal, nasal, tópica, bucal, sublingual, vaginal, parenteral, subcutánea, intramuscular, intravenosa, intradérmica, intratecal, por inhalación y epidural. Una vía de administración preferida puede depender, por ejemplo, del estado del paciente y de la enfermedad que se vaya a tratar. También se entenderá que, en el caso de tratamientos combinados, cada uno de los compuestos activos puede administrarse por la misma vía o por vías diferentes.

55 60 [0032] Las composiciones farmacéuticas pueden presentarse como cápsulas, comprimidos, polvos, gránulos, soluciones, suspensiones en líquidos acuosos o no acuosos, formas comestibles, emulsiones líquidas de aceite en agua, emulsiones líquidas de agua en aceite, solución, jarabes y elixires, en forma microencapsulada, sistemas de administración liposomales, tales como vesículas unilamelares pequeñas, vesículas unilamelares grandes y vesículas multilamelares, parches transdérmicos, ungüentos, cremas, suspensiones, lociones, polvos, soluciones, pastas, geles, gotas, esprays, aerosoles, aceites, pastillas para chupar, pastillas, enjuagues bucales, supositorios, enemas, soluciones inyectables estériles acuosas y no acuosas, etc.

65 [0033] Se apreciará que las composiciones pueden incluir otros agentes convencionales en la técnica teniendo en cuenta el tipo de formulación.

[0034] Dependiendo del agente que se vaya a administrar, las composiciones farmacéuticas y los compuestos descritos en el presente documento se pueden proporcionar de forma adecuada varias veces al día, una vez al día, una vez cada dos días, una vez cada una, dos o tres semanas, una vez cada uno, dos, tres o cuatro meses,

y así sucesivamente. En algunas formas de realización, el tratamiento con el compuesto se realiza durante un cierto período de tiempo, por ejemplo, durante una, dos, cuatro, cinco semanas o meses y luego se interrumpe durante un cierto período de tiempo, por ejemplo, durante una, dos, tres, cuatro, cinco semanas o meses.

5 [0035] Con respecto a cualquiera de los tratamientos combinados que se describen en el presente documento, los compuestos presentes en dicho tratamiento combinado pueden emplearse en combinación de acuerdo con la invención mediante la administración simultánea en una composición farmacéutica que incluye ambos compuestos. Alternativamente, la combinación puede administrarse por separado en composiciones farmacéuticas separadas, cada una de las cuales incluye diferentes compuestos, y de manera secuencial, en la que un primer compuesto se administra primero y el otro después. La administración secuencial puede ser cercana en el tiempo (por ejemplo, simultánea) o remota en el tiempo. Además, no importa si los compuestos se administran en la misma forma farmacéutica o mediante la misma vía de administración.

10 15 [0036] Así, en una forma de realización, una o más dosis de un primer compuesto se administran simultáneamente o por separado con una o más dosis de un segundo (o tercer, cuarto,...) compuesto.

20 [0037] Convenientemente, las combinaciones de esta invención se administran dentro de un "período especificado" (el intervalo de tiempo entre la administración del primer compuesto de la combinación y el último compuesto de la combinación). Por ejemplo, dentro de 1, 2, 6, 8, 12, 24 horas, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete días, uno, dos, tres, cuatro semanas, uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis o más meses. Por ejemplo, un primer compuesto se puede administrar a diario, mientras que el segundo compuesto se administra semanalmente; en dicho ejemplo, el período especificado en el que se proporciona la combinación de la invención es de una semana.

25 30 [0038] De forma alternativa, los compuestos de la combinación se administran secuencialmente. Por ejemplo, el primer compuesto se proporciona al paciente durante un período determinado, por ejemplo, durante dos o más días o semanas consecutivos, seguido de la administración del siguiente compuesto de la combinación de la invención como se describe en el presente documento, por ejemplo durante un período de dos, tres o cuatro días o semanas. Como se ha mencionado, en este documento también se contempla un descanso del fármaco utilizado entre la administración de los compuestos (ya sea solos o en combinación con las invenciones).

35 [0039] Un ejemplo de un régimen de administración puede ser que un primer compuesto se administre durante 1 a 30 días consecutivos, seguido de un descanso opcional del fármaco, seguido de la administración del segundo compuesto durante 1 a 30 días consecutivos, seguido de un descanso opcional del fármaco. Otro ejemplo puede ser que un primer compuesto se administre una vez cada dos semanas durante 2 a 10 semanas y, opcionalmente, un segundo compuesto se administre a diario durante 1 a 30 días consecutivos o más.

40 [0040] Se entenderá que una administración de "período especificado" y una administración "secuencial" pueden ir seguidas de una pauta posológica repetida o pueden ir seguidas de una pauta posológica alternada, y una interrupción del fármaco puede preceder a la pauta posológica repetida o a la pauta posológica alternada.

45 [0041] Los términos "receptor", "individuo", "sujeto", "hospedador" y "paciente" se usan en este documento de manera intercambiable y se refieren a cualquier sujeto mamífero (por ejemplo, humano, rata, ratón, gato, perro, caballo, etc.) para quienes se desea un diagnóstico, tratamiento o terapia, particularmente humanos. El término "afección o enfermedad en la que está implicado el eje de señalización CD47-SIRPa" como se usa en el presente documento se refiere a cualquier afección o enfermedad en la que las células (por ejemplo, células enfermas tales como células cancerosas, células del músculo liso vascular enfermas, células endoteliales enfermas, células enfermas infectadas por patógenos (por ejemplo, virus), células enfermas que experimentan fibrosis, etc.) utilizan el eje de señalización CD47-SIRPa, por ejemplo, para transmitir "señales antifagocíticas" o "señales don't eat me" con el fin de evadir o escapar o evitar la fagocitosis por fagocitos (por ejemplo, macrófagos, neutrófilos). Los ejemplos no limitativos de afecciones o enfermedades en las que está implicado el eje de señalización CD47-SIRPa incluyen diversos tipos de cáncer, ateroesclerosis, diversas enfermedades fibróticas así como diversas enfermedades infecciosas, de las que se citan ejemplos específicos en el presente documento. El término "afección o enfermedad en la que está implicado el eje de señalización CD47-SIRPa" 50 55 60 también abarca afecciones en las que es beneficioso realizar el agotamiento de células o el reemplazo de células del cuerpo, y en las que la expresión de CD47 en dichas células agotadas (por ejemplo, células madre hematopoyéticas) o dichas células reemplazadas (por ejemplo, células madre hematopoyéticas) impide o reduce la eficacia o el beneficio de dicho agotamiento o reemplazo. Los ejemplos no limitantes de dichas afecciones incluyen trasplante de células madre hematopoyéticas, transfusión de sangre u otra administración de otros productos sanguíneos para tratar deficiencias de células sanguíneas (tales como, por ejemplo, trombocitopenia).

65 [0042] El término "una afección en un sujeto que se beneficiaría de la reducción de la señalización o la unión entre CD47 y SIRPa" como se usa en el presente documento se refiere a cualquier afección o enfermedad en la que las células enfermas utilizan o aprovechan el eje de señalización CD47-SIRPa, por ejemplo para evadir la destrucción, por ejemplo, la fagocitosis por fagocitos (por ejemplo, macrófagos) al expresar señales antifagocíticas como CD47 (por ejemplo, al expresar o sobreexpresar CD47 en su superficie celular) para

transmitir una señal "don't eat me". En el contexto de la presente invención, los ejemplos no limitantes de afecciones o enfermedades en un sujeto que se beneficiarían de la reducción de la señalización o la unión entre CD47 y SIRPa incluyen varios tipos de cáncer (por ejemplo, leucemia, leucemia mieloide aguda (LMA), leucemia mieloide crónica, leucemia linfoblástica aguda (LLA), linfoma no Hodgkin (LNH), mieloma múltiple (MM), cáncer de ovario, gliomas, cáncer de colon, cáncer de mama, leiomiosarcoma, tumores neuroendocrinos pancreáticos, cáncer de pulmón de células pequeñas y cáncer de vejiga, carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (HNSCC), cáncer gástrico, cáncer de esófago, LLA de linfocitos T, glioma, mesotelioma, glioblastoma, melanoma y cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC), y otros), diversos tipos de enfermedades fibróticas (por ejemplo, fibrosis pulmonar idiopática (FPI), esclerodermia, mielofibrosis, fibrosis renal, fibrosis hepática, fibrosis pulmonar, fibrosis pancreática, fibrosis cardíaca y fibrosis de la vejiga, y otras), varios tipos de enfermedades infecciosas causadas por patógenos como un virus (por ejemplo, enfermedades infecciosas causadas por lentivirus, virus linfotrópico T humano (HTLV), hepadnavirus, virus de la hepatitis B, virus del herpes, virus del papiloma humano, virus de La Crosse, Yersinia sp., Yersinia pestis, Yersinia pseudotuberculosis, Yersinia enterocolitica, Franciscella sp, Helicobacter sp., Helicobacter pylori, Pasteurella sp., Vibrio sp., Vibrio cholerae, Vibrio parahemolyticus, Legionella sp., Legionella pneumophila, Listeria sp., Listeria monocytogenes, Mycoplasma sp., Mycoplasma hominis, Mycoplasma pneumoniae, Mycobacterium sp., Mycobacterium tuberculosis, Mycobacterium leprae, Rickettsia sp., Rickettsia rickettsii, Rickettsia typhi, un Plasmodium, un Trypanosoma, un Giardia, un Toxoplasma, una Leishmania y otras), ateroesclerosis y otras.

20 [0043] El término "célula con CD47 en la superficie" o "célula que expresa o sobreexpresa CD47 en su superficie", como se usa en el presente documento, se refiere al fenotipo de dicha célula, tal como una célula enferma como se da a conocer en el presente documento, donde el fenotipo se define por la presencia de la proteína o polipéptido CD47, preferiblemente en la superficie celular de dicha célula. Los ejemplos no limitantes de células que expresan o sobreexpresan CD47 en su superficie incluyen células enfermas tales como células cancerosas, células de músculo liso vascular enfermas, células endoteliales enfermas, células enfermas infectadas por un patógeno (por ejemplo, virus) y células enfermas que sufren fibrosis. Las células que expresan CD47 pueden identificarse mediante citometría de flujo utilizando un anticuerpo anti-CD47 adecuado como ligando de afinidad o mediante inmunohistoquímica utilizando un anticuerpo anti-CD47 adecuado o mediante técnicas de hibridación *in situ* usando sondas de ARNm de CD47 adecuadas, o mediante cualquier otro método adecuado que conduzca a la detección de proteína CD47 o fragmentos de la misma y/o del gen CD47 (ADN o ARNm) o variantes de este. Las células examinadas para el fenotipo CD47 pueden ser células derivadas de muestras de biopsia estándar, incluyendo muestras de tejido o células y/o muestras de sangre extraídas de un sujeto.

35 [0044] El término "principio activo", como se usa en el presente documento, se refiere a un compuesto tal como un compuesto farmacéutico o un fármaco o terapéutico eficaz, que tiene actividad biológica o farmacológica en un sistema vivo. Para ser un fármaco eficaz (con actividad biológica), un compuesto no solo debe ser activo contra una diana específica, sino que también debe poseer las propiedades ADME (Absorción, Distribución, Metabolismo y Excreción) adecuadas necesarias para que sea adecuado para su uso como fármaco en un sistema vivo (por ejemplo, en seres humanos). Se entiende además que la actividad biológica de un compuesto o principio activo dado depende generalmente de la dosis. Además, el término "principio activo capaz de reducir la expresión o la actividad enzimática de la proteína QPCTL y/o la proteína QPCT o la expresión del gen QPCTL y/o el gen QPCT en una célula que expresa CD47 en su superficie", y términos relacionados, como se usa en el presente documento también se refiere a cualquier compuesto, como los descritos en el presente documento, capaz de regular a la baja o reducir o bloquear la actividad enzimática de la proteína QPCTL y/o la proteína QPCT o regular a la baja o reducir o bloquear la expresión del gen QPCTL y/o el gen QPCT en una célula (por ejemplo, una célula cancerosa) en contacto o tratada con dicho compuesto, en al menos aproximadamente un 5 % o hasta aproximadamente un 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, o aproximadamente 95 % o más o más (preferiblemente al menos 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % y más) en comparación con el nivel de actividad enzimática de la proteína QPCTL y/o la proteína QPCT o el nivel de expresión del gen QPCTL y/o el gen QPCT en una célula (por ejemplo, una célula cancerosa) que no se ha puesto en contacto ni se ha tratado con dicho compuesto.

55 [0045] El término "principio activo (compuestos como se da a conocer en este documento) capaz de reducir la unión entre CD47 y SIRPa" y términos relacionados, como se usa en este documento, también se refiere a cualquier compuesto, como los descritos en este documento, capaz de regular a la baja o reducir o bloquear la unión entre CD47 en la superficie de una primera célula (por ejemplo, una célula cancerosa) y SIRPa en la superficie de una segunda célula (por ejemplo, una célula inmunitaria tal como un macrófago) cuando dicha primera célula se pone en contacto o se trata con dicho compuesto, y en donde la unión entre CD47 y SIRPa está regulada a la baja, reducida o bloqueada en al menos un 5 % o hasta un 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, o aproximadamente 95 % o más o más (preferiblemente al menos 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % y más) en comparación con el nivel de unión entre CD47 en la superficie de una primera célula (por ejemplo, una célula cancerosa) y SIRPa en la superficie de una segunda célula (por ejemplo, macrófagos, neutrófilos) cuando dicha primera célula no se pone en contacto ni se trata con dicho compuesto.

[0046] El término "principio activo (compuestos como se da a conocer en este documento) capaz de "modular (por ejemplo, potenciar o regular al alza o aumentar) la fagocitosis de una célula enferma" y términos relacionados, como se usa en este documento, también se refiere a cualquier compuesto, como los descritos en este documento, capaz de modular, potenciar o aumentar la fagocitosis de una célula enferma, cuando dicha célula enferma se pone en contacto o se trata con dicho compuesto, y en el que la modulación (por ejemplo, regulación al alza, refuerzo o aumento) de la fagocitosis de una célula enferma se potencia o se regula al alza o se aumenta o modula en al menos un 5 % o hasta un 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 % o aproximadamente 95 % o más o más (preferiblemente al menos 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % y más) en comparación con el nivel de fagocitosis de una célula enferma cuando dicha célula enferma no se pone en contacto o no se trata con dicho compuesto. La fagocitosis o los niveles de fagocitosis de las células enfermas se pueden medir usando técnicas estándar (por ejemplo, Ring et al (2017), Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, Vol. 114(49), E10578-E10585, <http://doi.org/10.1073/pnas.1710877114>; Ho et al (2015), The Journal of Biological Chemistry, Vol. 290(20), pp. 12650-12663, <http://doi.org/10.1074/jbc.M115648220>; Sockolosky et al (2016), Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, Vol. 113(19), E2646-54, <http://doi.org/10.1073/pnas.1604268113>).

[0047] El término "fagocitosis de una célula enferma", como se usa en el presente documento, abarca todos los medios por los cuales una célula (por ejemplo, una célula enferma) puede eliminarse del cuerpo o sistema como resultado de la fagocitosis por una célula fagocitaria (por ejemplo, un macrófago, monocito, neutrófilo, basófilo, eosinófilo o una célula dendrítica). Por ejemplo, la fagocitosis de una célula enferma se puede lograr mediante un proceso en el que una célula fagocitaria engulle una partícula sólida o una célula (por ejemplo, una célula enferma) para formar un compartimento interno conocido como fagosoma. El fagosoma del material ingerido (por ejemplo, una célula) se fusiona luego con un lisosoma para formar un fagolisosoma. Dentro del fagolisosoma, las enzimas y los peróxidos tóxicos digieren el material ingerido (por ejemplo, la célula enferma), lo que da como resultado su eliminación del cuerpo. Otro ejemplo mediante el cual se puede lograr la fagocitosis de una célula enferma es a través de "fagocitosis celular dependiente de anticuerpos" (abreviada como FCDA). Brevemente, la FCDA involucra a los receptores Fc, que son proteínas que se encuentran en la superficie de algunas células que incluyen, entre otros, linfocitos B, células dendríticas foliculares, linfocitos citolíticos naturales, macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, basófilos, plaquetas humanas y mastocitos. El receptor Fc se une específicamente a una parte de un anticuerpo conocida como región Fc (fragmento, cristalizable). La fagocitosis celular dependiente de anticuerpos se produce cuando los receptores Fc de las células (por ejemplo, linfocitos B, células dendríticas foliculares, linfocitos citolíticos naturales, macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, basófilos y otros) se unen a anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos anti CD47, como anticuerpos IgA anti CD47) que están unidos a células enfermas (por ejemplo, células cancerosas) o células infectadas o patógenos invasores. Esto, a su vez, estimula las células fagocíticas (por ejemplo, macrófagos, neutrófilos) o células citotóxicas para que destruyan células enfermas (por ejemplo, células cancerosas) o microbios, o células infectadas mediante fagocitosis mediada por anticuerpos o citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos. En la presente invención, se ha descubierto que la destrucción de células enfermas (por ejemplo, células cancerosas) mediante FCDA (usando compuestos como se da a conocer en este documento) es mayor o mejora cuando los receptores Fc de las células (por ejemplo, macrófagos, neutrófilos) se unen a anticuerpos IgA (por ejemplo, cualquier tipo de anticuerpos IgA, por ejemplo, un anticuerpo IgA anti CD47) en comparación con los anticuerpos IgG.

[0048] El término "principio activo (compuestos como se da a conocer en este documento) capaz de "modular (por ejemplo, potenciar o regular al alza o aumentar) la destrucción o muerte de una célula enferma mediante FCDA" y términos relacionados, como se usa en este documento, también se refiere a cualquier compuesto, como los descritos en el presente documento, capaz de modular, potenciar o aumentar la destrucción o la muerte de una célula enferma mediante FCDA, cuando dicha célula enferma se pone en contacto o se trata con dicho compuesto, y donde la modulación (por ejemplo, regulación al alza, potenciación o aumento) de la destrucción o la muerte de una célula enferma mediante FCDA se potencia o regula al alza o se incrementa o modula en al menos un 5 % o hasta aproximadamente un 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, o aproximadamente 95 % o más o más (preferiblemente al menos 50 %, 60 %, 70 %, 80%, 90% y más) en comparación con el nivel de destrucción o muerte de una célula enferma mediante FCDA cuando dicha célula enferma no se pone en contacto ni se trata con dicho compuesto. La destrucción o muerte o los niveles de destrucción o muerte de células enfermas mediante FCDA se pueden medir utilizando técnicas estándar (por ejemplo, Treffers et al (2017), European Journal of Immunology., Vol. 48. 10.1002/eji.201747215, por ejemplo, utilizando macrófagos como células efectoras para analizar la FCDA). En algunas formas de realización, la "modulación (por ejemplo, refuerzo, regulación al alza o aumento) de la destrucción de una célula enferma (por ejemplo, células cancerosas) mediante FCDA (utilizando compuestos como se da a conocer en el presente documento) implica o utiliza anticuerpos IgA (por ejemplo, el anticuerpo IgA1 anti-Her2 o el anticuerpo IgA anti-CD47, y otros).

[0049] El término "principio activo (compuestos como se da a conocer en este documento) capaz de "modular (por ejemplo, potenciar o regular al alza o aumentar) la destrucción de una célula enferma mediada por células inmunitarias" y términos relacionados, como se usa en este documento, también se refiere a cualquier compuesto, tal como los descritos en el presente documento, capaz de modular, potenciar o aumentar la muerte

mediada por células inmunitarias de una célula enferma, cuando dicha célula enferma se pone en contacto o se trata con dicho compuesto, y donde la modulación (por ejemplo, regulación al alza, refuerzo o aumento) de la muerte mediada por células de una célula enferma se potencia o regula al alza o aumenta o modula en al menos aproximadamente un 5 % o hasta aproximadamente un 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, o aproximadamente 95 % o más (preferiblemente al menos 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90% y más) en comparación con el nivel de destrucción mediada por células inmunitarias de una célula enferma cuando dicha célula enferma no se pone en contacto ni se trata con dicho compuesto. La muerte de células enfermas mediada por células inmunes se puede medir utilizando técnicas estándar (Treffers et al (2017), European Journal of Immunology., vol. 48. 10.1002/ej.201747215, utilizando neutrófilos como células efectoras para analizar la CCDA o macrófagos como células efectoras para analizar la FCDA; Ring et al (2017), Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, Vol. 114(49), E10578-E10585, <http://doi.org/10.1073/pnas.1710877114> (para analizar la fagocitosis); Ho et al (2015), The Journal of Biological Chemistry, Vol. 290(20), pp. 12650-12663, <http://doi.org/10.1074/jbc.M115.648220> (para analizar la fagocitosis); Sockolosky et al (2016), Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, Vol. 113(19), E2646-54, <http://doi.org/10.1073/pnas.1604268113> (para analizar la fagocitosis). En algunas formas de realización, la "modulación" (por ejemplo, refuerzo, regulación al alza o aumento) de la destrucción de una célula enferma (por ejemplo, células cancerosas) mediante FCDA (utilizando compuestos como se da a conocer en el presente documento) implica o utiliza anticuerpos que son IgA (por ejemplo, anticuerpo IgA1 anti-Her2 o anticuerpo IgA anti-CD47, y otros).

[0050] El término "destrucción de una célula enferma mediada por células inmunitarias" como se usa en el presente documento se refiere a las formas en que una célula enferma (por ejemplo, una célula cancerosa) puede ser destruida o eliminada por el sistema inmunitario (o células inmunitarias, por ejemplo, macrófagos, células mieloides) e incluye la destrucción de células o la inducción de la muerte celular mediante fagocitosis o mediante citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (CCDA) o mediante fagocitosis celular dependiente de anticuerpos (abreviada como FCDA) de células enfermas).

[0051] El término "citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (CCDA)" se refiere a un mecanismo de defensa inmunitaria mediada por células mediante el cual una célula efectora del sistema inmunitario (por ejemplo, neutrófilos como el neutrófilo con Fcγ) lisa activamente una célula diana (por ejemplo, células enfermas como células cancerosas) cuyos antígenos de la superficie de la membrana se han unido a anticuerpos específicos,

[0052] (por ejemplo, un anticuerpo anti CD47). Se demostró que la CCDA puede promoverse mediante la interferencia con las interacciones CD47-SIRPa, por ejemplo, al bloquear o reducir la interacción o la unión entre CD47 y SIRPa se obtiene una CCDA de fagocitos mejorada o aumentada (Treffers et al (2017), Eur. J. Immunol., Vol 48(2), pp 1-11). A diferencia de la FCDA, la destrucción o muerte de una célula enferma (por ejemplo, una célula cancerosa) a través de la CCDA se produce como resultado de la toxicidad directa y no a través de la fagocitosis. En la presente invención, se ha descubierto que la destrucción de células enfermas (por ejemplo, células cancerosas) mediante CCDA (usando compuestos como se da a conocer en este documento) es mayor o mejorada cuando los receptores Fc de las células (por ejemplo, neutrófilos) se unen a anticuerpos IgA (por ejemplo, cualquier tipo de anticuerpos IgA, por ejemplo, un anticuerpo IgA anti CD47) en comparación con los anticuerpos IgG.

[0053] El término "principio activo (compuestos como se da a conocer en este documento) capaz de "modular (por ejemplo, potenciar o regular al alza o aumentar) la destrucción o la muerte de una célula enferma mediante CCDA" y términos relacionados, como se usa en este documento, también se refiere a cualquier compuesto, como como los descritos en el presente documento, capaz de modular, potenciar o aumentar la destrucción o la muerte de una célula enferma mediante CCDA, cuando dicha célula enferma se pone en contacto o se trata con dicho compuesto, y donde la modulación (por ejemplo, regulación al alza, potenciación o aumento) de la destrucción o muerte de una célula enferma mediante CCDA se potencia o regula al alza o se incrementa o modula en al menos un 5 % o hasta aproximadamente un 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, o aproximadamente 95 % o más o más (preferiblemente al menos un 50 %, 60 %, 70 %, 80%, 90% y más) en comparación con el nivel de destrucción o muerte de una célula enferma mediante FCDA cuando dicha célula enferma no se pone en contacto ni se trata con dicho compuesto. La destrucción o muerte o los niveles de destrucción o muerte de células enfermas mediante CCDA se pueden medir utilizando técnicas estándar (por ejemplo, Treffers et al (2017), Eur. J. Immunol., Vol 48(2), pp 1-11, utilizando neutrófilos como células efectoras). En algunas formas de realización, la "modulación" (por ejemplo, refuerzo, regulación al alza o aumento) de la muerte de una célula enferma (por ejemplo, células cancerosas) mediante CCDA (utilizando compuestos como se da a conocer en el presente documento) implica o utiliza anticuerpos IgA (por ejemplo, IgA1 anti-Her2). anticuerpo o anticuerpo IgA anti-CD47, y otros).

[0054] En el contexto de la presente invención, en algunas formas de realización, los compuestos que se dan a conocer en este documento (por ejemplo, compuestos seleccionados de compuestos con la Fórmula (I), (II), (III), (IV), (V), (VI), (VII), o (VIII), o un compuesto descrito en la Tabla A, B, C, D o E, por ejemplo, PBD150, PQ912,

PQ1565, 000051, 000054, 00016, 000034, 000035, 000037, 000055, 000024, 000027, 000050, 000020, 000021, 000022, 000023, 000025, 000010, 000026, 000011, 000036, 000029, 000048, 000049, 000012, 000030, 000031, 000013, 000014, 000032, 000052, 000053, 000064, 000044, y 000066 pueden usarse ventajosamente para promover o aumentar o potenciar o estimular la CCDA por fagocitos de células enfermas (por ejemplo, células cancerosas) como se da a conocer en el presente documento.

[0055] En el contexto de la presente invención, los términos "células fagocíticas", "células fagocitarias" y "fagocitos" se usan indistintamente en este documento para referirse a células que son capaces de realizar la fagocitosis. Los ejemplos no limitativos de fagocitos incluyen macrófagos, células mononucleares (por ejemplo, histiocitos y monocitos), leucocitos polimorfonucleares (por ejemplo, neutrófilos) y células dendríticas, basófilos, eosinófilos y otros.

[0056] El término "principio activo (compuestos como se da a conocer en este documento) capaz de "modular, prevenir, inhibir o reducir la formación de un residuo piroglutamilo (pGlu) en el extremo N-terminal de la proteína CD47 expresada en la superficie de una célula enferma", y términos relacionados, tal como se usan en el presente documento, también se refieren a cualquier compuesto, como los descritos en el presente documento, capaz de regular a la baja, reducir, bloquear o modular la formación de un residuo pGlu en el extremo N-terminal de la proteína CD47 expresada en la superficie de un célula enferma, cuando dicha célula enferma se pone en contacto o se trata con dicho compuesto, y donde la formación de un residuo pGlu en el extremo N-terminal de la proteína CD47 expresada en la superficie de una célula enferma se regula a la baja o se reduce o bloquea en al menos alrededor del 5% o hasta alrededor del 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% o aproximadamente 95% o más o más (preferiblemente al menos 50%, 60%, 70%, 80%, 90% y más) en comparación con el nivel de formación de un residuo pGlu en el extremo N-terminal de la proteína CD47 expresada en la superficie de una célula enferma, cuando dicha célula enferma no se pone en contacto ni se trata con dicho compuesto. La formación de un residuo piroglutamilo (pGlu) en el extremo N-terminal de la proteína CD47 expresada en la superficie de una célula enferma se puede medir utilizando métodos estándar, por ejemplo, citometría de flujo usando un anticuerpo anti CD47 capaz de unirse al residuo pGlu en CD47 (por ejemplo, el anticuerpo clon CC2C6, como se da a conocer en este documento).

[0057] El término "células enfermas", como se usa en el presente documento, se refiere, por ejemplo, a células cancerosas u otras células enfermas tales como células de músculo liso vascular enfermas, células endoteliales enfermas, células enfermas infectadas por un patógeno (por ejemplo, virus), células enfermas que experimentan fibrosis, que expresan o sobreexpresan CD47 en su superficie celular, y que se derivan de células enfermas o son como ellas (por ejemplo, líneas de células cancerosas) derivadas de sujetos que padecen una enfermedad o afección en la que está implicado el eje de señalización CD47-SIRP α , como por ejemplo, cáncer, ateroesclerosis, enfermedades fibróticas así como enfermedades infecciosas.

[0058] El término "glutaminil-péptido ciclotransferasa" (abreviada como "proteína QPCT" o "proteína QC", también conocida como glutaminil ciclase) como se usa en el presente documento se refiere a una enzima (EC 2.3.2.5) que está codificada por el gen QPCT (NM_012413, en humanos), y que se encuentra en forma secretada debido a la ausencia de un ancla a la membrana en su secuencia (es decir, no unida a la membrana). La proteína QPCT se expresa abundantemente en tejidos neuroendocrinos (por ejemplo, la hipófisis) y se la ha asociado a enfermedades como la artritis reumatoide, la osteoporosis y la enfermedad de Alzheimer. También se ha descubierto que la QPCT se expresa, aunque en menor medida, en linfocitos de sangre periférica y otras células sanguíneas. También se ha demostrado que la QPCT se expresa en células de cáncer de tiroides (Kehlen et al (2013), Endocrine-Related Cancer, vol. 20, pp. 79-90) y células de melanoma (Gillis J. S. (2006) Journal of Translational Medicine, vol. 4:27, p. 1-7).

[0059] El término "similar a la glutaminil-péptido ciclotransferasa" (que se abrevia como "proteína QPCTL" o "proteína QCL", también conocida como "iso-glutaminil ciclase") tal como se usa en el presente documento se refiere a la forma isoenzima (es decir, una enzima que difiere en la secuencia de aminoácidos pero que cataliza la misma reacción química) de la QPCT (E.C. 2.3.2.5). La proteína QPCTL está codificada por el gen QPCTL (NM_017659, en humanos). La proteína QPCTL se expresa de manera ubicua en todo el cuerpo, pero es particularmente abundante en los linfocitos de la sangre periférica y otras células sanguíneas. También se ha demostrado que la proteína QPCTL es expresada por células cancerosas (Kehlen et al (2013), Endocrine-Related Cancer, vol. 20, pp. 79-90). A diferencia de la proteína QPCT (que se secreta), la proteína QPCTL se localiza exclusivamente dentro del complejo de Golgi (por ejemplo, se une al aparato de Golgi y no se secreta dentro ni fuera de la célula) debido a la presencia de un ancla a la membrana en su secuencia. QPCTL (una proteína de 382 aminoácidos) comparte una identidad de secuencia del 46 % (ADN) con la proteína QPCT y muestra una actividad enzimática casi idéntica *in vitro*, es decir, ambas proteínas son responsables de las modificaciones postraduccionales que consisten en catalizar la formación de residuos piroglutamilo (o piroglutamato (pE o pGlu)) en la porción N-terminal de varios péptidos/proteínas (Cynis et al (2008), J. Mol Biol, vol. 379, pp. 966-89; Stephan et al (2009), FEBS Journal, vol. 276, pp. 6522-36).

[0060] Se entiende que el término "reducir la expresión o la actividad enzimática de QPCTL, QPCT o combinaciones de estas en la célula con CD47 expresada en su superficie" incluye reducir la transcripción y/o

traducción de los genes que codifican QPCTL, QPCT o combinaciones de estas, como se da a conocer en este documento.

5 [0061] El término "inhibidor de CD47", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier principio activo o compuesto capaz de unirse a la CD47 expresada en la superficie de una célula (por ejemplo, una célula enferma como una célula cancerosa) para dificultar o prohibir la unión de CD47 a SIRPa, reduciendo o impidiendo así la unión de CD47 a SIRPa expresada en la superficie de otra célula (por ejemplo, un macrófago). En el contexto de la presente invención, los ejemplos no limitantes de inhibidores de CD47 incluyen anticuerpos anti-CD47 y proteínas de fusión basadas en SIRPa (por ejemplo, Hu5F9-G4 (Forty Seven, Inc.); CC-90002 (Celgene); TTI-621 (Trillium Therapeutics Inc.), así como otros actualmente en desarrollo, incluidos Novimmune, NI-1701 (biespecífico CD47-CD19), NI-1801 (biespecífico CD47-meso), anti-CD47 de Tioma Therapeutics, SRF231 anti-CD47 de Surface oncology. En algunas formas de realización, el inhibidor de CD47 es un anticuerpo IgA anti CD47.

10 15 [0062] El término "inhibidor de SIRP alfa" (abreviado como SIRPa o SIRP α) como se usa en el presente documento se refiere a cualquier principio activo o compuesto capaz de unirse a SIRPa expresada en la superficie de una célula (por ejemplo, macrófagos, monocitos, neutrófilos, basófilos, eosinófilos, células dendríticas) para dificultar o impedir la unión de SIRPa a CD47, reduciendo o impidiendo así la unión de SIRPa a CD47 expresada en la superficie de otra célula (por ejemplo, una célula enferma, tal como una célula cancerosa). En el contexto de la presente invención, los ejemplos no limitativos de inhibidores de SIRPa incluyen anticuerpos anti-SIRPa (por ejemplo, OSE-172 de Ose Immunotherapeutics, Nantes, Francia); otros ejemplos no limitantes incluyen la proteína quimérica (fusión) CD47Fc humana recombinante, que consiste en una proteína CD47 modificada genéticamente acoplada a un dominio Fc (por ejemplo, Trillium Therapeutics).

20 25 [0063] El receptor de "Muerte Programada-1 (PD-1, por sus siglas en inglés)", como se usa en el presente documento, se refiere a un receptor inmunoinhibidor que pertenece a la familia CD28. PD-1 se expresa *in vivo* en linfocitos T previamente activados, pero también en las células mieloides, y se une a dos ligandos, PD-L1 y PD-L2. El término "PD-1", como se usa en el presente documento, incluye PD-1 humano (hPD-1), variantes, isoformas y especies homólogas de hPD-1 y análogos que tienen al menos un epítopo común con hPD-1. La secuencia completa de hPD-1 se puede encontrar con el número de acceso de GENBANK U64863. PD-1 se expresa en células inmunitarias como los linfocitos T activados (incluidos los linfocitos T efectores), los linfocitos B, las células mieloides, los timocitos y los linfocitos citolíticos naturales (NK) (Suya Dai et al (2014) *Cellular Immunology*, Vol: 290, pp. 72-79; Giancetti et al (2013), *Autoinmun. Rev.* 12 (2013) 1091-1100).

30 35 [0064] "Ligando de muerte programada-1 (PD-L1, por sus siglas en inglés)", como se usa en el presente documento, se refiere a uno de los dos ligandos de tipo glucoproteína de la superficie celular para PD-1 (el otro es PD-L2) que regula a la baja la activación de las células inmunitarias y la secreción de citocinas al unirse a PD-1. El término "PD-L1", tal como se usa en el presente documento, incluye PD-L1 humano (hPD-L1), variantes, isoformas y especies homólogas de hPD-L1 y análogos que tienen al menos un epítopo común con hPD-L1. La secuencia completa de hPD-L1 se puede encontrar con el número de acceso Q9NZQ7 de GENBANK. PD-L1 se expresa en una variedad de células que incluyen células de linaje hematopoyético como linfocitos T activados, linfocitos B, monocitos, células dendríticas (DC), mastocitos y macrófagos. PD-L1 también se expresa en tejido periférico no hematopoyético, como células cardíacas, células del músculo esquelético, células de los islotes pancreáticos, células de la placenta, células pulmonares, hepatocitos, células epiteliales, células renales, células madre mesenquimales, células hepáticas y otras (Suya Dai et al (2014) *Cellular Immunology*, Vol: 290, pp. 72-79).

40 45 50 55 60 65 [0065] El término "eje PD-1/PD-L1", como se usa en el presente documento, consiste en el receptor PD-1 y su ligando PD-L1. El término "señalización del eje PD-1/PD-L1" es una forma de comunicación entre células (señalización celular), por ejemplo entre una primera célula que expresa PD-1 y una segunda célula que expresa PD-L1, y que implica la liberación de una señal bioquímica (por ejemplo, liberación de proteínas, lípidos, iones, neurotransmisores, enzimas, gases, etc.), que a su vez provoca un efecto (por ejemplo, inhibición, activación, bloqueo, etc.) en una o ambas células. Un ejemplo de "señalización del eje PD-1/PD-L1" es cuando el PD-L1 expresado en la superficie celular de una primera célula (por ejemplo, células cancerosas o células inmunitarias infiltrantes de cáncer) se une a su receptor PD-1 expresado en la superficie celular de una segunda célula (por ejemplo, un linfocito T, como un linfocito T efecto). La unión de PD-L1 a su receptor PD-1 transmite una señal inhibidora al linfocito T que resulta en una disminución de la proliferación de linfocitos T (por ejemplo, linfocitos T efectores) así como de la actividad de los linfocitos T (por ejemplo, secreción de citocinas y quimiocinas como se ha descrito en este documento; Wei F et al (2013) *PNAS*; Vol: 110, E2480-2489). Por lo tanto, un posible resultado final de la señalización del eje PD-1/PD-L1 es la atenuación o inhibición de la actividad o función inmunitaria mediada por linfocitos T (por ejemplo, linfocitos T efectores). Tal situación puede ser perjudicial en el contexto del cáncer. Además, se ha planteado la hipótesis de que PD-1 también puede mediar en una señal antifagocítica en los macrófagos (Gordon et al. (2017), *Nature*, vol. 545, pp. 495-499) y se ha demostrado que la inhibición del eje de señalización CD47-SIRPa mejora el efecto antitumoral del bloqueo del eje PD-1 - PD-L1 (Manguso et al. (2017), *Nature*, vol. 547, pp. 413-418).

[0066] La expresión "proporcionar al sujeto un principio activo que reduce la expresión o la actividad enzimática de QPCTL, QPCT o combinaciones de estas en una célula con CD47 en la superficie" como se usa en el presente documento se refiere a proporcionar a dicho sujeto una cantidad eficaz de dicho principio activo.

5 [0067] El término "cantidad eficaz" o "cantidad eficaz desde el punto de vista terapéutico" como se usa en este documento se refiere a una cantidad de un compuesto determinado (por ejemplo, un principio activo y su composición farmacéutica como se da a conocer en este documento) que es eficaz, en dosis y durante un período de tiempo particular necesario, para lograr el resultado terapéutico deseado (por ejemplo, tratar el cáncer, por ejemplo, reducir el tamaño del tumor o estimular o aumentar la fagocitosis de células cancerosas que expresan la proteína CD47, o tratar la ateroesclerosis o enfermedades fibróticas o enfermedades infecciosas causadas por patógenos (por ejemplo, virus)). Una cantidad eficaz desde el punto de vista terapéutico del agente o compuesto farmacológico (por ejemplo, un principio activo como se da a conocer en este documento) puede variar según factores como el estadio de la enfermedad, el tipo de enfermedad, la edad, el sexo y el peso del individuo, y la capacidad del agente farmacológico para obtener una respuesta deseada en el individuo. Una cantidad eficaz desde el punto de vista terapéutico de un compuesto dado también es aquella en la que cualquier efecto tóxico o perjudicial (si lo hay) del agente o compuesto farmacológico (por ejemplo, un compuesto como se da a conocer en el presente documento) se ve compensado por los efectos terapéuticos beneficiosos.

20 [0068] El término "compuesto de prueba", como se usa en el presente documento, se refiere a una molécula definida químicamente cuya capacidad para: 1) reducir, inhibir o bloquear la actividad enzimática de la proteína QPCTL y/o la proteína QPCT o la expresión del gen QPCTL y/o el gen QPCT en una célula, y/o 2) reducir o inhibir o bloquear o prevenir la formación de un residuo piroglutamilo en el extremo N-terminal de la proteína CD47 expresada en una célula se evalúa en un ensayo o método de acuerdo con la invención. Los compuestos de prueba incluyen, entre otros, fármacos, ligandos (naturales o sintéticos), polipéptidos, péptidos, péptidos miméticos, polisacáridos, sacáridos, glucoproteínas, ácidos nucleicos, polinucleótidos, anticuerpos, inhibidores enzimáticos y moléculas orgánicas pequeñas. El compuesto de prueba también puede ser un fármaco candidato o un compuesto principal, un producto químico intermedio, un contaminante ambiental o una mezcla de compuestos. En una forma de realización, el compuesto de prueba puede estar comprendido dentro de una biblioteca existente de compuestos. En otra forma de realización, los compuestos de prueba pueden estar comprendidos dentro de una nueva biblioteca de compuestos. En otras palabras, los compuestos de prueba pueden ser compuestos conocidos o compuestos (nuevos) desconocidos. En una forma de realización, el compuesto de prueba puede ser cualquiera de los principios activos (capaces de reducir la expresión o la actividad enzimática de QPCT y/o QPCTL) y sus composiciones farmacéuticas como se da a conocer en el presente documento, por ejemplo, compuestos seleccionados de las Tablas A, B, C, D y/o E, por ejemplo, PBD150, PQ912 y PQ1565, y los compuestos 000051, 000054, 00016, 000034, 000035, 000037, 000055, 000024, 000027, 000050, 000020, 000021, 000022, 000023, 000025, 000010, 000026, 000011, 000036, 000029, 000048, 000049, 000012, 000030, 000031, 000013, 000014, 000032, 000052, 000053, 000064, 000044 o 000066, como se da a conocer en este documento. Dichos compuestos también pueden denominarse "compuesto de referencia".

40 [0069] El término "compuesto de referencia", como se usa en el presente documento, se refiere a un compuesto que se sabe (*a priori*) que: 1) reduce, inhibe o bloquea la actividad enzimática de la proteína QPCTL y/o QPCT o la expresión de QPCTL y/o QPCT y/o 2) reduce o inhibe o previene o bloquea la formación de un residuo piroglutamilo en el extremo N-terminal de la proteína CD47. Dichos compuestos de referencia pueden ser útiles para validar y/u optimizar el método como se da a conocer en el presente documento con el fin de encontrar, detectar o seleccionar compuestos nuevos (no conocidos *a priori*) capaces de: 1) reducir o inhibir la actividad enzimática de la proteína QPCTL y/o QPCT o la expresión del gen QPCTL y/o QPCT en una célula, y/o 2) reducir o inhibir la formación de un residuo piroglutamilo en el extremo N-terminal de la proteína CD47 expresada en una célula.

50 CD47

55 [0070] El término ""grupo de diferenciación 47" ("Cluster of Differentiation 47", abreviado como "CD47") como se usa en el presente documento se refiere a una proteína transmembrana de 50 kDa (receptor) codificada por el gen CD47 (referencia Ensembl: ENSG00000196776 en humanos). La proteína CD47 también se conoce como proteína asociada a integrina (IAP). La CD47 pertenece a la superfamilia de las inmunoglobulinas (Ig) y se caracteriza por la presencia de un dominio IgV N-terminal extracelular, cinco dominios transmembrana y una cola intracelular C-terminal corta.

60 [0071] La CD47 se expresa en todos los tejidos y células de mamíferos normales/sanos (por ejemplo, humanos, ratones, ratas, etc.) (por ejemplo, glóbulos rojos como los eritrocitos), según lo revelado por la expresión de ARNm de CD47 y los estudios de tinción inmunohistoquímica de CD47 (Wiersma et al (2015), Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology, Vol, vol. 19, pp. 417-431; Lindberg et al (1993), Journal of Cell Biology, vol. 123, pp. 485-496).

65

[0072] También se ha descubierto que la CD47 se expresa en varios tipos de cáncer, como por ejemplo, leucemia, leucemia mieloide aguda (LMA), leucemia mieloide crónica, leucemia linfoblástica aguda (LLA), linfoma no Hodgkin (LNH), mieloma múltiple (MM), cáncer de ovario, gliomas, cáncer de colon, cáncer de mama, leiomirosarcoma, tumores neuroendocrinos pancreáticos, cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de vejiga, HNSCC, cáncer gástrico, cáncer de esófago, T-ALL, glioma, mesotelioma, glioblastoma, melanoma, NSCLC et al (Chao et al (2012), Current Opinion Immunol., Vol.24, pp. 225-3; Matlung et al. (2017), Immunol Rev. Vol.276, pp. 145-164).

[0073] Se ha documentado que las células cancerosas regulan al alza la expresión de (o sobreexpresan) CD47 en su superficie celular, lo que da como resultado niveles de CD47 más altos en comparación con los niveles de CD47 que se encuentran en las células normales (que son relativamente bajos) (Majeti et al (2009), Cell, Vol.138, pp. 286-99; Chao et al (2012), Curr Opin Immunol, Vol.24, pp. 225-32). La sobreexpresión de CD47 en el cáncer se observó por primera vez en el cáncer de ovario en la década de 1980. Poels et al (1986), J. Natl. Cancer Inst Vol.76, pp. 781-91). En el contexto de la presente invención, el término "sobreexpresión de CD47" en una célula enferma (por ejemplo, células cancerosas pero también células del músculo liso vascular enfermas, células endoteliales enfermas, células enfermas infectadas por un patógeno (por ejemplo, virus), células enfermas en tejidos con fibrosis, también puede expresar señales antifagocíticas como CD47) se refiere a los niveles de CD47 en dicha célula, que son más altos que los niveles de CD47 que se encuentran en células normales (por ejemplo, células no enfermas o sanas del mismo tipo celular) como 1,5 veces superior, 2,0 veces superior, 2,5 veces superior, 3 veces superior o más.

SIRP α

[0074] El término "proteína reguladora de señales alfa" (abreviada como "SIRP α " o "SIRP a", también denominada CD172a o SHPS-1) como se usa en el presente documento se refiere a una glucoproteína transmembrana reguladora de la familia SIRP, que está codificada por el gen SIRP α (referencia Ensembl: ENSG00000198053 en humanos). SIRP α se caracteriza por la presencia de tres dominios extracelulares similares a Ig, un dominio transmembrana y una cola intracelular que contiene cuatro motivos inhibidores basados en inmunorreceptores de tirosina (ITIM) (Barclay y Van den Berg (2014), Annu Rev Immunol, vol. 32, pp. 25-50). La familia SIRP comprende 3 miembros, a saber, SIRP α , SIRP β y SIRP γ , que están estrechamente relacionados en términos de secuencia y estructura general, pero tienen una actividad diferente. Los estudios de cristalografía de rayos X han demostrado que, a pesar de las similitudes de secuencia y dominio, SIRP α , SIRP β y SIRP γ difieren en su capacidad para unirse a CD47. Mientras que SIRP α se une a CD47 con una afinidad razonablemente alta, la unión de SIRP β y SIRP γ a CD47 es insignificante o no es posible debido a las diferencias en la estructura tridimensional (por ejemplo, bucles) de la proteína. Hatherley et al (2008), Molecular cell, vol. 31, pp. 266-77).

[0075] SIRP α se expresa principalmente en las células mieloides (por ejemplo, macrófagos, monocitos, neutrófilos, basófilos, eosinófilos, células dendríticas), neuronas y cardiomiositos (*in vitro*) derivados de células madre pluripotentes inducidas (Matozaki et al (2009), Trends Cell Biol., Vol.19 (2), pp. 72-80; y Dubois et al (2011), Nature Biotechnology, vol. 29, pp. 1011-1018). SIRP α actúa como receptor inhibidor al interactuar o unirse a CD47, es decir, como parte del eje de señalización CD47-SIRP α , como se describe en este documento. Esta interacción conduce a la inhibición de la muerte celular por parte de las células inmunitarias, como la inhibición de la muerte celular a través de la fagocitosis de células que expresan CD47 en su superficie celular (por ejemplo, células cancerosas positivas para CD47) por parte de células inmunitarias como fagocitos (por ejemplo, macrófagos, neutrófilos) y también la inhibición de la destrucción a través de la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (CCDA) de células que expresan CD47 en su superficie celular, como se explica en el presente documento.

Eje de señalización CD47-SIRP α

[0076] El término "sistema o eje o vía de señalización CD47-SIRP α " como se usa en el presente documento se refiere a un eje o sistema de señalización caracterizado por la interacción o unión entre la CD47 expresada en la superficie celular de una célula (por ejemplo, expresada en la superficie celular de una célula enferma como una célula cancerosa) y SIRP α expresada en la superficie celular de otra célula diferente (por ejemplo, expresada en la superficie celular de una célula inmunitaria como un fagocito (por ejemplo, macrófagos, neutrófilos) e incluye las respuestas moleculares (por ejemplo, eventos de fosforilación, expresión de genes y de proteínas, reclutamiento, transporte, etc.) y respuestas fisiológicas (por ejemplo, generación de una señal "don't eat me" que tiene como resultado la inhibición de la fagocitosis, CCDA y FCDA, por ejemplo, las células positivas para CD47 involucradas en la señalización de CD47-SIRP α evadirán la fagocitosis por parte de una célula inmunitaria, como un macrófago y/o la muerte celular mediante CCDA derivada o provocada por esta interacción).

[0077] La CD47 tiene varios ligandos de unión, incluida la proteína reguladora de señales alfa (SIRP α). Dependiendo de su ligando de unión, así como de su patrón de expresión (por ejemplo, nivel de expresión, ubicación), la CD47 desempeña varias funciones biológicas, incluidas la apoptosis, la proliferación, la adhesión, la migración y las respuestas angiogénica e inmunitaria.

[0078] Una función destacada de la CD47 es controlar la actividad fagocítica a través de su interacción o unión con SIRPa. Cuando la CD47 interactúa o se une a SIRPa (interacción CD47-SIRPa), inicia una cascada de eventos de señalización en las células (es decir, la célula que expresa CD47 y la célula que expresa SIRPa). Específicamente, la interacción CD47-SIRPa causa la fosforilación de la tirosina de los motivos inhibidores basados en tirosina (ITIM) del inmunorreceptor citoplasmático SIRPa, lo que a su vez conduce a la activación o reclutamiento concomitante de la tirosina fosfatasa 1 que contiene el dominio 2 de homología con Src (SHP-1) y tirosina fosfatasa 2 que contiene el dominio 2 de homología con Src (SHP-2). SHP-1 y SHP-2 son proteínas tirosina fosfatases citoplasmáticas, que median eventos de señalización que causan la inhibición de la fagocitosis, por ejemplo, desfosforilando la miosina-IIA (Wiersma et al (2015), Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology, vol. 19, pp. 417-431). La miosina-IIA es una característica importante del sistema contráctil actina-miosina, que media en la absorción de material (por ejemplo, células que hay que eliminar) por los fagocitos (por ejemplo, macrófagos, neutrófilos) durante la fagocitosis.

[0079] Por lo tanto, por estas razones (es decir, porque desencadena una cascada de eventos de señalización que conducen a la inhibición de la fagocitosis al unirse o interactuar con SIRPa), la CD47 a menudo se denomina "señal don't eat me" o "señal antifagocítica". Además, la unión de CD47 a SIRPa también puede inhibir la muerte de células que expresan CD47 por otros mecanismos, como CCDA. En todos los mecanismos de muerte celular dependientes de la interacción CD47-SIRPa, la inhibición de esta interacción puede aprovecharse para potenciar la muerte de las células que expresan CD47.

[0080] En condiciones normales, el eje de señalización CD47-SIRPa desempeña un papel importante en la prevención de la destrucción de células sanas/normales que expresan CD47 (por ejemplo, glóbulos rojos o eritrocitos sanos). Por otro lado, la regulación a la baja (natural) de CD47 en células dañadas, envejecidas y superfluas (por ejemplo, glóbulos rojos viejos) asegura su destrucción oportuna del cuerpo.

[0081] En situaciones patológicas, como en el contexto del cáncer, las células cancerosas (por ejemplo, células cancerosas positivas para CD47 o que expresan CD47 en su superficie celular) pueden utilizar el sistema o eje de señalización CD47-SIRPa para evadir la inmunovigilancia, por ejemplo, para escapar de la fagocitosis por parte de células inmunitarias como los macrófagos. Como se ha mencionado antes, se ha demostrado que, como resultado de la expresión o sobreexpresión de CD47, las células cancerosas pueden evadir la destrucción por parte del sistema inmunitario o evadir la inmunovigilancia (por ejemplo, al evadir la fagocitosis) al activar el sistema o eje de señalización CD47-SIRPa (es decir, mediante la unión entre CD47 y SIRPa) (Oldenborg et al (2000) Science, vol. 288, pp. 2051-2054; Jaiswal et al (2009) Cell, Vol.138, pp. 271-285). En general, se ha descubierto que la expresión (expresión aumentada o sobreexpresión) de CD47 en varios tipos de cáncer, por ejemplo, leucemia, leucemia mieloide aguda (LMA), leucemia mieloide crónica, leucemia linfoblástica aguda (LLA), linfoma no Hodgkin (LNH), mieloma múltiple (MM), cáncer de ovario, gliomas, cáncer de colon, cáncer de mama, leiomiosarcoma, tumores neuroendocrinos pancreáticos, cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de vejiga, HNSCC, cáncer gástrico, cáncer de esófago, T-ALL, glioma, mesotelioma, glioblastoma, melanoma, NSCLC y otros, se asocia con un peor pronóstico clínico y mayores posibilidades de resistencia (ausencia de respuesta) a quimioterapias (Majeti et al (2009), Cell, Vol.138, pp. 286-99).

Papel del eje de señalización CD47-SIRPa en el cáncer y otras afecciones

[0082] Las células cancerosas pueden evadir la inmunovigilancia de muchas maneras, por ejemplo, al evadir la fagocitosis por las células fagocitarias (por ejemplo, macrófagos, neutrófilos) a través de la expresión de las llamadas señales "antifagocíticas" o "don't eat me". Una señal destacada es la proteína transmembrana "grupo de diferenciación 47" (abreviado como "CD47"). CD47 también se conoce como proteína asociada a integrina (IAP). La CD47 se expresa virtualmente en todas las células del cuerpo, por ejemplo, los glóbulos rojos, como los eritrocitos, y participa en una serie de procesos celulares, como la apoptosis, la proliferación, la adhesión y la migración, así como en las respuestas angiogénica e inmunitaria. La CD47 se une o interactúa con varios ligandos, incluida la proteína reguladora de señales alfa (SIRPa), la trombospondina-1 (TSP-1) y las integrinas de membrana (por ejemplo, integrina av β 3, integrina α 2 β 1), y SIRPa se considera un ligando principal para CD47. SIRPa es un receptor transmembrana inhibidor presente en células mieloídes como macrófagos, monocitos, neutrófilos, basófilos, eosinófilos, eritrocitos y células dendríticas.

[0083] La interacción o unión entre CD47 y SIRPa se ha estudiado ampliamente porque media en o transmite señales "antifagocíticas" o "don't eat me" entre dos células, por ejemplo, una célula cancerosa y una célula fagocitaria (por ejemplo, macrófagos), que finalmente inhiben la fagocitosis (es decir, las células positivas para CD47 o que expresan CD47 en su superficie celular (por ejemplo, glóbulos rojos) no sufrirán fagocitosis o serán menos propensas a la fagocitosis por parte de células fagocitarias que expresan SIRPa (por ejemplo, macrófagos). Por esta razón, la CD47 a menudo se denomina "señal don't eat me" y un marcador de lo propio ("self"), ya que la pérdida de CD47 conduce a la fagocitosis homeostática de células envejecidas o dañadas. La expresión de CD47 en células normales/sanas sirve para mantener la homeostasis de los tejidos (por ejemplo, para evitar ataques inmunitarios contra tejidos o células que son constituyentes "propios" (por ejemplo, para evitar la autoinmunidad) y para eliminar del cuerpo células viejas o defectuosas o células extrañas.

[0084] Sin embargo, la expresión de CD47 no se limita a células normales/sanas. Específicamente, las células enfermas (como las células cancerosas, las células del músculo liso vascular enfermas, las células endoteliales enfermas, las células enfermas infectadas por un patógeno (por ejemplo, un virus) o las células enfermas que padecen fibrosis) también pueden expresar señales antifagocíticas como CD47 y, por lo tanto, pueden transmitir una señal "don't eat me" o "señal antifagocítica".

[0085] En el caso del cáncer, las células cancerosas aumentan la expresión de CD47 en su superficie celular en comparación con los niveles de CD47 que se encuentran en las células normales/sanas (que son relativamente bajos) (Majeti et al (2009), *Cell*, Vol.138, pp. 286-99; Chao et al (2012), *Curr Opin Immunol*, Vol.24, pp. 225-32).

Como resultado de tener su expresión de CD47, las células cancerosas pueden evadir la destrucción por parte del sistema inmunitario o evadir la inmunovigilancia, por ejemplo, al evadir la fagocitosis por parte de células inmunitarias como las células fagocitarias (por ejemplo, macrófagos, neutrófilos) (Oldenborg et al (2000) *Science*, vol. 288, pp. 2051-2054; Jaiswal et al (2009) *Cell*, Vol.138, pp. 271-285). En general, el aumento de la expresión (o sobreexpresión) de CD47 en varios tipos de cáncer (por ejemplo, cánceres hematológicos o cánceres de la sangre como la leucemia) se asocia con un peor pronóstico clínico y mayores posibilidades de resistencia (ausencia de respuesta) a las quimioterapias (Majeti et al (2009), *Cell*, Vol.138, pp. 286-99).

[0086] La expresión de CD47 en el cáncer se encontró por primera vez en el cáncer de ovario en la década de 1980 (Poels et al (1986), J. Natl. Cancer Inst. vol. 76, pp. 781-91). Desde entonces, se ha recopilado una gran cantidad de evidencia que documenta la expresión de CD47, así como la participación del eje de señalización CD47-SIRPa en muchos tipos de cáncer, incluidos, por ejemplo, leucemia, leucemia mieloide aguda (LMA), leucemia mieloide crónica, leucemia linfoblástica aguda (LLA), linfoma no Hodgkin (LNH), mieloma múltiple (MM), cáncer de ovario, gliomas, cáncer de colon, cáncer de mama, leiomirosarcoma, tumores neuroendocrinos pancreáticos, cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de vejiga, HNSCC, cáncer gástrico, cáncer de esófago, T-ALL, glioma, mesotelioma, glioblastoma, melanoma, NSCLC et al (Matlung et al. (2017), Immunol Rev. Vol.276, pp. 145-164.)

[0087] Las células enfermas en afecciones distintas al cáncer, como por ejemplo, la ateroesclerosis, las enfermedades fibróticas y las enfermedades infecciosas causadas por patógenos (por ejemplo, virus), también aumentan la expresión de CD47 en su superficie celular en comparación con los niveles de CD47 que se encuentran en las células normales/sanas para evadir la fagocitosis por los fagocitos (Kojima et al (2016) *Nature*, vol. 536, pp. 86-90; Wernig et al (2017) *PNAS*, Vol.114, pp. 4757-4762; y WO2014124028).

[0088] Estos resultados han suscitado un interés creciente en el uso del eje de señalización CD47-SIRPa como diana clínica no solo para la inmunoterapia contra el cáncer, sino también para otras afecciones, como la ateroesclerosis, las enfermedades fibróticas y las enfermedades infecciosas causadas por patógenos (por ejemplo, virus).

[0089] En el caso del cáncer, los enfoques actuales para antagonizar las interacciones CD47-SIRPa en el cáncer se han dirigido principalmente a CD47 (Chao et al (2011), Cancer Res., vol. 71, pp. 1374-84). Por ejemplo, actualmente se están desarrollando o probando en ensayos clínicos varios anticuerpos anti-CD47 destinados a interferir en o bloquear las interacciones CD47-SIRPa. El anticuerpo monoclonal (mAb) anti-CD47 B6H12 ha demostrado eficacia preclínica en varias neoplasias malignas hematológicas y modelos de tumores sólidos a través de su capacidad para bloquear la unión de SIRPa a CD47 (Chao et al (2011) Cancer Res. vol. 71, pp. 1374-1384; Edris et al (2012) PNAS, vol. 109, pp. 6656-6661; Willingham et al (2012) PNAS, vol. 109, pp. 6662-6667). Otros ejemplos no limitantes de anticuerpos anti-CD47 y terapias de proteínas basadas en SIRPa que se están desarrollando o valorando para aplicaciones clínicas incluyen Hu5F9-G4 (Forty Seven, Inc.) para el tratamiento de tumores sólidos y cáncer colorrectal avanzado, CC-90002 (Celgene) para el tratamiento de la LMA, así como de cánceres sólidos y hematológicos avanzados, y la proteína de fusión SIRPa-FC TTI-621 (Trillium Therapeutics Inc.) para el tratamiento de neoplasias malignas hematológicas. Otros ejemplos no limitativos que se están desarrollando (en etapa preclínica) incluyen Novimmune, NI-1701 (biespecífico para CD47-CD19), NI-1801 (biespecífico para CD47-meso), anti-CD47 de Tioma Therapeutics, SRF231 anti-CD47 de Surface oncology, Effi-DEM anti-SIRPa de OSE immunotherapeutics. Otro ejemplo no limitativo de compuesto anti-CD47 es ALX148 (Alexo Therapeutics, Inc., una proteína manipulada genéticamente acoplada a un dominio Fc) para el tratamiento de tumores sólidos y linfoma. Otros enfoques consisten en el uso de agentes como anticuerpos anti-SIRPa (Sarfati et al (2008), Curr Drug Targets, Vol.9, pp. 842-50, Zao et al (2011) PNAS, vol. 108, pp. 18342-18347).

[0090] Aunque son prometedoras, tales estrategias no son óptimas, ya que se sabe que los anticuerpos tienen poca penetración en los tejidos, especialmente en tumores sólidos, debido a su gran peso molecular. Además, tales anticuerpos, en particular los anticuerpos dirigidos contra CD47, carecen de especificidad, ya que CD47 se distribuye ampliamente por todo el cuerpo, incluido el tejido sano, lo que puede causar toxicidad debida a la interacción con la diana para las células normales (Ho et al (2015), *J. Biol. Chem.*, vol. 290, pp. 12650-12663).

[0091] Otras desventajas asociadas con el uso de anticuerpos anti-CD47 incluyen la falta de biodisponibilidad oral y los efectos secundarios indeseables como el desarrollo de anemia (que puede ocurrir como resultado de

una pérdida dependiente de la dosis de glóbulos rojos y plaquetas), así como hemaglutinación (agrupación de glóbulos rojos). Por ejemplo, estos efectos secundarios indeseables se observaron durante los ensayos clínicos dirigidos por Forty Seven, Inc. Específicamente, se administró un anticuerpo monoclonal anti-CD47 humanizado (Hu5F9-G4) a pacientes con diversos tumores sólidos (avanzados). Se observó que los pacientes que recibieron la dosis más alta del anticuerpo anti-CD47 (Hu5F9-G4, 3 mg/kg) experimentaron toxicidad que incluía dolor abdominal, hemaglutinación de glóbulos rojos y dolor de cabeza (Sikic et al (2016), J Clin. Oncol., vol. 34).

[0092] Las desventajas asociadas con el uso de anticuerpos anti-CD47 en el contexto de la terapia contra el cáncer, como se ha descrito antes, también se manifestarán en otras terapias en las que pueda estar indicado el uso de anticuerpos anti-CD47, como por ejemplo en el tratamiento de la ateroesclerosis, enfermedades fibróticas, así como enfermedades infecciosas causadas por patógenos (por ejemplo, virus) (Kojima et al (2016) Nature, vol. 536, pp. 86-90; Wernig et al (2017) PNAS, Vol.114, pp. 4757-4762; y WO2014124028).

[0093] Por lo tanto, existe la necesidad de terapias dirigidas a CD47 que no causen niveles significativos de toxicidad y/o depleción de plaquetas y/o hemaglutinación (agrupación de glóbulos rojos) y/o depleción de glóbulos rojos y/o anemia cuando se administren a un sujeto y/o que tengan el potencial de biodisponibilidad oral. Además, también existe la necesidad de estrategias adicionales, adyuvantes, alternativas o mejoradas que incluyan compuestos y composiciones farmacéuticas, el uso de tales compuestos y composiciones farmacológicas, y/o métodos, que carezcan de al menos algunas de las limitaciones y que confieran las siguientes ventajas o usos:

1) Bloquear, reducir o inhibir la actividad del eje de señalización CD47-SIRPa, particularmente en afecciones o enfermedades en las que está involucrado el eje de señalización CD47-SIRPa (es decir, cuando las células enfermas usan el eje de señalización CD47-SIRPa para evadir o escapar de la destrucción por parte de las células inmunitarias, como la fagocitosis por fagocitos); y/o

2) Bloquear, reducir o inhibir la interacción o unión entre CD47 y SIRPa, particularmente en afecciones o enfermedades en las que está involucrado el eje de señalización CD47-SIRPa; y/o

3) Tratar a sujetos que padecen una enfermedad o afección en la que está implicado el eje de señalización CD47-SIRPa, como por ejemplo, cáncer, ateroesclerosis, enfermedades fibróticas, así como enfermedades infecciosas; y/o

4) Modular (por ejemplo, reforzar o aumentar) la muerte mediada por células inmunitarias (por ejemplo, mediante fagocitosis o mediante citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (CCDA) o mediante fagocitosis celular dependiente de anticuerpos (abreviada como FCDA) de células enfermas (por ejemplo, células cancerosas u otras células enfermas como como células del músculo liso vascular enfermas, células endoteliales enfermas, células enfermas infectadas por un patógeno (por ejemplo, virus), células enfermas que padecen fibrosis) que expresan o sobreexpresan CD47 en su superficie celular por fagocitos (por ejemplo, macrófagos, neutrófilos) en sujetos que padecen una enfermedad o afección en la que está involucrado el eje de señalización CD47-SIRPa, como por ejemplo, cáncer, ateroesclerosis, enfermedades fibróticas así como enfermedades infecciosas. En algunas formas de realización, la "modulación (por ejemplo, refuerzo o regulación al alza o aumento) de células cancerosas mediante FCDA o CCDA (usando compuestos como se da a conocer en este documento) involucra o usa anticuerpos de tipo IgA (por ejemplo, anticuerpo IgA1 anti-Her2-*o* anticuerpo IgA anti-CD47, y otros); y/o

5) Complementar o potenciar los efectos de un tratamiento terapéutico (monoterapia) con un primer principio activo (por ejemplo, un fármaco), por ejemplo, anticuerpo anti-CD47 (por ejemplo, un anticuerpo IgA anti-CD47) o un anticuerpo anti-SIRPa u otros principios activos, incluidos, por ejemplo, anticuerpos anti-CD20, anticuerpos anti-PD-L1, anticuerpos anti-Her2, anticuerpos anti-EGFR, anticuerpo biespecífico anti-CD20-CD47, anticuerpo anti-CD56, anticuerpo biespecífico anti-TRP-1-PD-L1 y anticuerpo anti-CD271-saporina. En algunas formas de realización, el primer principio activo es un anticuerpo que es una IgA; y/o

6) Complementar o potenciar los efectos de un tratamiento terapéutico que consiste en una combinación de dos principio activos (es decir, terapia combinada), donde el primer principio activo (por ejemplo, un fármaco) es un anticuerpo anti-CD47 (por ejemplo, un anticuerpo IgA anti-CD47) o un anticuerpo anti-SIRPa y el segundo principio activo se seleccionan de los grupos que consisten en anticuerpo anti-CD20, anticuerpo anti-PD-L1, anticuerpo anti-Her2, anticuerpo anti-EGFR, anticuerpo biespecífico anti-CD20-CD47, anticuerpo anti-CD56, anticuerpo biespecífico anti-TRP-1-PD-L1 y anticuerpo anti-CD271-saporina. En algunas formas de realización, el primer y el segundo principio activo son anticuerpos de tipo IgA; y/o

7) Sustituir el uso de un anticuerpo anti-CD47 o un anticuerpo anti-SIRPa en el contexto de un tratamiento terapéutico (monoterapia con un anticuerpo anti-CD47 o un anticuerpo anti-SIRPa) o en el contexto de un tratamiento (terapia combinada) donde se administra un anticuerpo anti-CD47 o un anticuerpo anti-SIRPa en combinación con un segundo principio activo (por ejemplo, un fármaco), por ejemplo, anticuerpo anti-CD20, anticuerpo anti-PD-L1, anticuerpo anti-Her2, anticuerpo anti-EGFR, anticuerpo biespecífico anti-CD20-

CD47, anticuerpo anti-CD56, anticuerpo biespecífico anti-TRP-1-PD-L1 y anticuerpo anti-CD271-saporina. En algunas formas de realización, el segundo principio activo es un anticuerpo que es una IgA;

Papel de QPCT y/o QPCTL en el eje de señalización CD47-SIRPa

- 5 [0094] En el presente documento se describe un nuevo mecanismo para modular el eje de señalización CD47-SIRPa. En algunas formas de realización, como se describe en el presente documento, la reducción, el bloqueo o la inhibición de la actividad o la expresión de enzimas denominadas glutaminil-péptido ciclotransferasa (QPCT), así como su isoenzima relacionada, la similar a la glutaminil-péptido ciclotransferasa (QPCTL), o combinaciones de estas, se asocia a una reducción, inhibición o bloqueo de la interacción o unión entre CD47 y SIRPa. En algunas formas de realización, esta reducción de la unión entre CD47 y SIRPa da como resultado una reducción, inhibición o bloqueo del eje de señalización CD47-SIRPa.
- 10 [0095] En algunas formas de realización como se describe en el presente documento, la generación de una "señal antifagocítica" o "señal don't eat me" por parte de una célula (por ejemplo, una célula enferma en una enfermedad o afección en la que está implicado el eje de señalización CD47-SIRPa, como por ejemplo una célula cancerosa) no solo podría prevenirse o atenuarse mediante el uso de anticuerpos que interfieren con el eje de señalización CD47-SIRPa o que interfieren con la unión o interacción entre CD47 y SIRPa, sino también al interferir con las enzimas que se encuentran involucradas o que son capaces de realizar modificaciones postraduccionales de la proteína CD47, como las enzimas QPCTL y/o QPCT. En otras formas de realización como se describe en el presente documento, la reducción, el bloqueo o la inhibición de la expresión del gen QPCT y/o QPCTL y/o la proteína QPCT y/o QPCTL en una célula (por ejemplo, usando compuestos inhibidores/inhibidores de enzimas como se da a conocer en este documento, etc.) reduce, previene o bloquea la interacción o la unión entre CD47 (por ejemplo, expresada en la superficie celular de una célula enferma, como el cáncer) y SIRPa (por ejemplo, expresada en la superficie celular de otra célula, por ejemplo, macrófagos, neutrófilos).
- 15 [0096] En otras formas de realización, como se describe en el presente documento, la reducción, la prevención o el bloqueo de la actividad del eje de señalización CD47-SIRPa mediante la reducción, el bloqueo o la inhibición de la expresión del gen QPCT y/o QPCTL y/o la proteína QPCT y/o QPCTL en una célula conduce a una mayor fagocitosis de células que expresan CD47 (por ejemplo, células cancerosas) por los fagocitos (por ejemplo, macrófagos, neutrófilos) que expresan SIRPa en su superficie celular o conduce a una mayor destrucción o la muerte de células que expresan CD47 (por ejemplo, células enfermas como células cancerosas) mediante CCDA o lleva a una mayor destrucción o la muerte de células que expresan CD47 (por ejemplo, células enfermas tales como células cancerosas) mediante FCDA. En algunas formas de realización, la destrucción de una célula enferma (por ejemplo, células cancerosas) mediante FCDA o CCDA (usando compuestos como se da a conocer en este documento) implica o usa anticuerpos IgA (por ejemplo, anticuerpo IgA1 anti-Her2 o anticuerpo IgA anti-CD47, y otros). Como se describe en el presente documento, reducir o inhibir la actividad o la expresión de QPCT y/o QPCTL, por ejemplo, mediante el uso de inhibidores de la actividad de la enzima QPCT y/o QPCTL o mediante el uso de compuestos que inhiben la expresión de la enzima QPCT y/o QPCTL representa una forma eficaz de aumentar la fagocitosis de células enfermas (por ejemplo, células cancerosas) o una forma de aumentar la destrucción o muerte de células enfermas (por ejemplo, células cancerosas) mediante CCDA o FCDA, particularmente en células cancerosas, que de otro modo escaparían a la fagocitosis o muerte mediante CCDA o FCDA a través de la activación del eje de señalización CD47-SIRPa. En algunas formas de realización, la destrucción de una célula enferma (por ejemplo, células cancerosas) mediante FCDA o CCDA (usando compuestos como se da a conocer en este documento) implica o usa anticuerpos de tipo IgA (por ejemplo, anticuerpo IgA1 anti-Her2 o anticuerpo anticuerpo IgA anti-CD47, y otros).
- 20 [0097] Como se describe en el presente documento, el gen y la proteína QPCT y/o el gen y la proteína QPCTL representan dianas biológicas o dianas "medicables" en relación con enfermedades o afecciones en las que está implicado el eje CD47-SIRPa, como por ejemplo, cáncer, ateroesclerosis, enfermedades fibróticas (por ejemplo, fibrosis pulmonar idiopática, esclerodermia, mielofibrosis, fibrosis renal, fibrosis hepática, fibrosis pulmonar, fibrosis pancreática, fibrosis cardíaca y fibrosis de la vejiga), así como enfermedades infecciosas causadas por patógenos (por ejemplo, virus).
- 25 [0098] En algunas formas de realización, como se describe en el presente documento, la reducción, inhibición o bloqueo de la actividad enzimática de la proteína QPCT y/o la proteína QPCTL o la expresión del gen QPCT y/o el gen QPCTL se usa para aplicaciones clínicas o médicas importantes, tales como:
- 30 1) Reducir o bloquear o inhibir la interacción o unión entre CD47 y SIRPa; y/o
- 35 2) Reducir, bloquear o inhibir la actividad del eje de señalización CD47-SIRPa en un sujeto que padece una enfermedad o afección en la que está implicado el eje de señalización CD47-SIRPa, como por ejemplo, cáncer, ateroesclerosis, enfermedades fibróticas así como enfermedades infecciosas causadas por patógenos (por ejemplo, virus); y/o
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65

- 3) Tratar a un sujeto que padece una enfermedad o afección en la que está involucrado el eje de señalización CD47-SIRPa, como por ejemplo, cáncer; y/o
- 5 4) Modular (por ejemplo, reforzar o aumentar) la muerte mediada por células inmunitarias (por ejemplo, mediante fagocitosis o mediante citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (CCDA) o mediante fagocitosis celular dependiente de anticuerpos" (abreviada FCDA)) de células enfermas (por ejemplo, células cancerosas u otras células enfermas como como células del músculo liso vascular enfermas, células endoteliales enfermas, células enfermas infectadas por un patógeno (por ejemplo, virus), células enfermas que experimentan fibrosis) que expresan o sobreexpresan CD47 en su superficie celular por fagocitos (por ejemplo, macrófagos, neutrófilos) en sujetos que padecen una enfermedad o afección en la que está involucrado el eje de señalización CD47-SIRPa, como por ejemplo, cáncer, ateroesclerosis, enfermedades fibróticas así como enfermedades infecciosas. En algunas formas de realización, la "modulación" (por ejemplo, el refuerzo o la regulación al alza o el aumento) de la destrucción de una célula enferma (por ejemplo, células cancerosas) mediante FCDA o CCDA (usando compuestos como se da a conocer en este documento) involucra o usa anticuerpos de tipo IgA (por ejemplo, anticuerpo IgA1 anti-Her2 o santicuerpo IgA anti-CD47, y otros); y/o
- 10 5) Modular (por ejemplo, prevenir, inhibir o reducir) la formación de un residuo piroglutamilo en el extremo N-terminal de la proteína CD47 expresada en la superficie de células enfermas, como células cancerosas, células de músculo liso vascular enfermas, células endoteliales enfermas, células enfermas infectadas por un patógeno (por ejemplo, virus), células enfermas que experimentan fibrosis, etc., en un sujeto que padece una enfermedad o afección en la que está implicado el eje de señalización CD47-SIRPa, como por ejemplo, cáncer, ateroesclerosis, enfermedades fibróticas así como enfermedades infecciosas causadas por patógenos (por ejemplo, virus); y/o
- 15 6) Complementar o potenciar los efectos del tratamiento (monoterapia) con un primer principio activo o fármaco, por ejemplo, anticuerpo anti-CD47 (por ejemplo, un anticuerpo IgA anti-CD47) u otros agentes que incluyen, por ejemplo, anticuerpo anti-CD20, anticuerpo anti-PD-L1, anticuerpo anti-Her2, anticuerpo anti-EGFR, anticuerpo biespecífico anti-CD20-CD47, anticuerpo anti-CD56, anticuerpo biespecífico anti-TRP-1-PD-L1 y anticuerpo anti-CD271-saporina. En algunas formas de realización, el primer principio activo es un anticuerpo IgA; y/o
- 20 7) Complementar o potenciar los efectos del tratamiento (monoterapia) con un primer principio activo o fármaco, por ejemplo, anticuerpo anti-SIRPa u otros agentes que incluyen, por ejemplo, anti-SIRP, un anticuerpo OSE-172 de Ose Immunotherapeutics, Nantes, Francia; o proteína quimérica CD47Fc humana recombinante, que consiste en una proteína CD47 manipulada acoplada a un dominio Fc. En algunas formas de realización, el primer principio activo es un anticuerpo IgA; y/o
- 25 8) Complementar o potenciar los efectos de un tratamiento terapéutico que consiste en una combinación de dos principios activos (es decir, terapia combinada), donde el primer principio activo (por ejemplo, un fármaco) es un anticuerpo anti-CD47 (por ejemplo, un anticuerpo IgA anti-Cd47) o un anticuerpo anti-Cd47. El anticuerpo SIRPa y el segundo principio activo se seleccionan de los grupos que consisten en anticuerpo anti-CD20, anticuerpo anti-PD-L1, anticuerpo anti-Her2, anticuerpo anti-EGFR, anticuerpo biespecífico anti-CD20-CD47, anticuerpo anti-CD56, anticuerpo biespecífico anti-TRP-1-PD-L1 y anticuerpo anti-CD271-saporina. En algunas formas de realización, el primer y el segundo principio activo son anticuerpos IgA; y/o
- 30 9) Sustituir el uso de un anticuerpo anti-CD47 o un anticuerpo anti-SIRPa en el contexto de un tratamiento terapéutico (monoterapia con un anticuerpo anti-CD47 o un anticuerpo anti-SIRPa) o en el contexto de una terapia (terapia combinada) donde se administra un anticuerpo anti-CD47 o un anticuerpo anti-SIRPa en combinación con un segundo principio activo (por ejemplo, un fármaco), por ejemplo, anticuerpo anti-CD20, anticuerpo anti-PD-L1, anticuerpo anti-Her2, anticuerpo anti-EGFR, anticuerpo biespecífico anti-CD20-CD47, anticuerpo anti-CD56, anticuerpo biespecífico anti-TRP-1-PD-L1 y anticuerpo anti-CD271-saporina. En algunas formas de realización, el segundo principio activo es un anticuerpo IgA;
- 35 55 [0099] En algunas formas de realización, como se describe en el presente documento, se observan ventajas adicionales de actuar sobre el eje CD47-SIRPa mediante la inhibición de QPCTL (utilizando los compuestos que se dan a conocer en el presente documento) en el contexto de afecciones tales como la anemia o la trombocitopenia, que se han observado al actuar sobre el eje CD47-SIRPa con inhibidores. En concreto, a diferencia de los agentes que se unen directamente a CD47, como los anticuerpos o las variantes de SIRPa o SIRPa recombinantes, las moléculas CD47 maduras que ya han sido modificadas con piroglutamato no se ven afectadas. Esto representa una ventaja en el contexto en el que las células infundidas preferiblemente se conservan (por ejemplo, no se eliminan, no son la diana de macrófagos, fagocitos u otras células mieloídes). Por ejemplo, en el contexto en el que la anemia o la trombocitopenia se tratan mediante la infusión de productos de células sanguíneas, las moléculas CD47 maduras que ya están presentes en las células infundidas no serán la diana, evitando así una mayor susceptibilidad de estas células a la fagocitosis u otros mecanismos de destrucción. En otro ejemplo adicional, se ha propuesto el bloqueo del eje CD47 en combinación con anticuerpos

contra las células madre hematopoyéticas (HSC) como una estrategia para lograr el trasplante de células madre hematopoyéticas con poca o ninguna necesidad de quimioterapia. Chhabra et al (2016), *Science Translational Medicine*, Vol: 8(351), pp. 351ra105 y pueden considerarse enfoques similares para otros sistemas celulares. En tal entorno, los pacientes normalmente se someten a quimioterapia para eliminar las HSC del hospedador y permitir el injerto de las HSC infundidas. Sin embargo, la combinación de anticuerpos contra las HSC del hospedador y el bloqueo de CD47 a través de la inhibición de QPCTL mejoraría la eliminación de las HSC del hospedador sin afectar las HSC infundidas, reduciendo o eliminando la necesidad de regímenes de quimioterapia tóxicos. Una configuración preferida en dicho enfoque es que los componentes dirigidos a las células (por ejemplo, un anticuerpo que se dirige a las células madre más un modulador del eje CD47-SIRPa) no induzcan una destrucción sustancial de las células entrantes. Por lo tanto, debido a que las moléculas maduras de CD47 en las células entrantes no se ven afectadas por la inhibición de QPCTL, y debido a que los inhibidores de molécula pequeña de QPCTL pueden diseñarse de manera que la inhibición de QPCTL disminuya rápidamente en el momento de la infusión celular, el uso de inhibidores de QPCTL, como se da a conocer en este documento, representa un enfoque particularmente atractivo para lograr este objetivo, en relación con las terapias que se unen directamente a CD47 o SIRPa, lo que también aumentaría la destrucción de las células infundidas.

[0100] En algunas formas de realización como se describe en el presente documento, se observan ventajas adicionales de actuar sobre el eje CD47-SIRPa mediante la inhibición de QPCTL (usando los compuestos como se da a conocer en el presente documento) en el contexto del tratamiento de tumores (cualquier tipo de tumor como se describe en el presente documento, por ejemplo, tumores con inestabilidad microsatelital (MSI), melanoma y otros) que tienen bajos niveles de expresión del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) I o para el tratamiento de tumores que han regulado a la baja sus niveles de expresión de MHC I como resultado de inmunoterapias basadas en linfocitos T, como la terapia TIL, terapia de linfocitos T con CAR e inhibición de puntos de control de linfocitos T.

[0101] Se sabe que los fármacos dirigidos a la vía CD47-SIRPa (por ejemplo, anticuerpos contra CD47) tienen una amplia eficacia para inducir la fagocitosis de células cancerosas. Sin embargo, no todas las células cancerosas o tumores responden a dicha terapia, es decir, algunas células cancerosas o tumores muestran una resistencia intrínseca a los fármacos dirigidos a la vía CD47-SIRPa (por ejemplo, anticuerpos contra CD47), que a su vez las protege de la fagocitosis. Recientemente se ha descubierto que la resistencia a los fármacos dirigidos a la vía CD47-SIRPa estaba relacionada con los niveles de MHC de clase I en las células cancerosas resistentes. Además, también se ha demostrado que las células cancerosas que carecen de expresión tanto de CD47 como de MHC de clase I o que tienen bajos niveles de expresión tanto de CD47 como de MHC de clase I son las más sensibles a la fagocitosis (Barkal et al (2018), *Nat Immunol.*, vol. 19(1), pp 76-84). Por lo tanto, en algunas formas de realización, los compuestos que se dan a conocer en el presente documento pueden usarse ventajosamente para disminuir, reducir o bloquear la actividad de la vía CD47-SIRPa o disminuir, reducir o bloquear la unión entre CD47 y SIRPa para tratar tumores (cualquier tipo de tumor como los descritos en este documento, por ejemplo, tumores MSI, melanoma) que tienen bajos niveles de expresión del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) I, o para el tratamiento de tumores que han regulado a la baja sus niveles de expresión de MHC I como resultado de inmunoterapias basadas en linfocitos T, para aumentar o favorecer o potenciar la fagocitosis de las células cancerosas en este contexto.

[0102] En las siguientes secciones se describen formas de realización adicionales sobre las aplicaciones, usos, ventajas y métodos que aprovechan la presente invención.

45 **Uso de principios activos para alterar la modificación postraduccional de CD47**

[0103] En un aspecto descrito en el presente documento, el uso de principios activos y composiciones farmacéuticas de los mismos que son capaces de reducir la expresión o actividad enzimática de QPCTL, QPCT o combinaciones de estas en una célula que expresa o sobreexpresa CD47 en su superficie permite reducir, prevenir o bloquear la adición o la formación de residuos de piroglutamato (pE) en la porción N-terminal de CD47. En algunas formas de realización, los compuestos descritos en el presente documento son compuestos que pueden usarse para reducir, inhibir o prevenir la piroglutamilación de CD47, por ejemplo, *in vitro* o *in vivo*, por ejemplo, para tratar pacientes que se beneficiarían de dicha piroglutamilación reducida, inhibida o prevenida de CD47.

[0104] En algunas formas de realización, esto reduce aún más la interacción o unión entre CD47 y SIRPa. En algunas formas de realización, esto reduce aún más la actividad del eje de señalización CD47-SIRPa. En algunas formas de realización, esto modula, potencia o aumenta la destrucción de células enfermas mediada por células inmunitarias (por ejemplo, células cancerosas) a través de, por ejemplo, la fagocitosis de células que expresan CD47 por parte de células inmunitarias como fagocitos (por ejemplo, macrófagos, neutrófilos) o mediante citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (CCDA) de células que expresan CD47 o mediante fagocitosis celular dependiente de anticuerpos (abreviada (FCDA) de células que expresan CD47). En algunas formas de realización, la "modulación" (por ejemplo, refuerzo, regulación al alza o aumento) de la muerte de una célula enferma (por ejemplo, células cancerosas) a través de FCDA o CCDA (utilizando compuestos como se da

a conocer en el presente documento) implica o utiliza anticuerpos IgA (por ejemplo, anticuerpo IgA1 anti-Her2 o anticuerpo IgA anti-CD47, y otros).

[0105] En algunas formas de realización descritas en el presente documento, reducir o prevenir o bloquear la adición o la formación de residuos de piroglutamato (pE) en la porción del extremo N terminal de CD47 mediante el uso de un compuesto o método como se da a conocer en el presente documento da como resultado la prevención, inhibición o reducción de la "señal don't eat me" o "señal antifagocítica" transmitida por la activación del eje de señalización CD47-SIRPa. En algunas formas de realización, esto provoca un aumento en la destrucción mediada por células inmunitarias (por ejemplo, a través de la fagocitosis o CCDA o FCDA) o una mayor actividad de destrucción (por ejemplo, actividad fagocítica o actividad citotóxica) de las células inmunitarias (por ejemplo, macrófagos, células mieloides) hacia las células que expresan CD47, por ejemplo, células cancerígenas. En algunas formas de realización, la destrucción de una célula enferma (por ejemplo, células cancerosas) a través de FCDA o CCDA (usando compuestos como se da a conocer en este documento) implica o usa anticuerpos IgA (por ejemplo, anticuerpo IgA1 anti-Her2 o anticuerpo IgA anti-CD47, y otros).

15 Compuestos y Composiciones

[0106] En otro aspecto, en el presente documento se da a conocer una composición farmacéutica que comprende un principio activo para usar en un método de tratamiento de una afección en un sujeto que se beneficiaría al reducir la señalización o la unión entre CD47 y SIRPa en el sujeto, en donde el principio activo reduce la expresión o la actividad enzimática de QPCTL, QPCT, o combinaciones de estas, en una célula con CD47 en la superficie.

[0107] En algunas formas de realización, los principios activos son compuestos, como moléculas pequeñas identificadas mediante métodos de selección como los que se dan a conocer en este documento, que tienen actividad biológica en un sistema vivo y que pueden reducir la expresión o la actividad enzimática de QPCTL, QPCT o combinaciones de estas en una célula que expresa CD47 en su superficie.

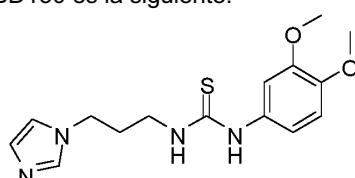
[0108] En algunas formas de realización, los principios activos son inhibidores de QPCTL, QPCT o combinaciones de estas, como PBD150, PQ912, PQ1565 (Buchholz M et al (2009), J. Med. Chem., Vol 52, pp 7069-7080; Buchholz M et al (2006), J. of Medicinal Chemistry, vol. 49, pp 664-677; Schilling et al (2008), Nature Medicine, vol. 14, pp 1106-1111; Lues et al (2015), Alzheimer's & Dementia: Translational Research & Clinical Interventions, Vol.1, pp 182-195), y otros inhibidores de QPCTL, QPCT o combinaciones de estas, como los descritos en WO2004/098625 (EP1620082), WO2004/098591 (EP1620091), WO2005/039548 (EP1675578), WO2005/075436 (EP1713780), WO2011029920 (EP2475428), WO2014140279 (EP2970235), US8889709B2, y Hoang et al (2017), J. Med. Chem, vol. 60, pp 2573-2590.

[0109] En algunas formas de realización, los principios activos (inhibidores de QPCT y/o QPCTL) son compuestos seleccionados de compuestos con la Fórmula (I), (II), (III), (IV), (V), (VI), (VII), o (VIII), o de los compuestos descritos en las Tablas A, B, C, D y/o E, como se describe en el presente documento, por ejemplo PBD150, PQ912 y PQ1565, y los compuestos 000051, 000054, 00016, 000034, 000035, 0037, 000055, 000024, 000027, 000050, 000020, 000021, 000022, 000023, 000027, 000050, 000020, 000021, 000022, 000023, 000027, 000050, 000020, 000021, 000022, 000023, 000027, 000010, 000049, 000012, 000030, 000031, 000013, 000014, 000032, 000052, 000053, 000064, 000044 o 000066.

[0110] En algunas formas de realización, los ejemplos no limitantes de principios activos que son inhibidores de QPCTL, QPCT o combinaciones de estas incluyen los siguientes compuestos:

1. PBD150

En algunas formas de realización, el principio activo es PBD150. PBD150 es un inhibidor de QPCTL y/o QPCT, que fue desarrollado por Buchholz M et al (2006), J. of Medicinal Chemistry, vol. 49, pp 664-677). Se demostró que PBD150 inhibe la QPCT y la QPCTL humanas con un valor k_i en el rango nanomolar bajo (es decir, 60 nM). La estructura química del compuesto PBD150 es la siguiente:

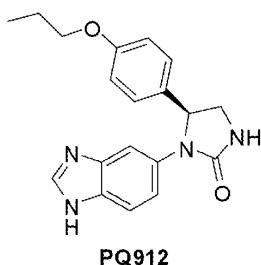


PBD150

2. PQ912

En algunas formas de realización, el principio activo es PQ912. PQ912 (también conocido como (S)-1-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-5-(4-propoxifenil)imidazolidin-2-ona) es un inhibidor de QPCT y/o QPCTL que se está desarrollando actualmente en un programa en fase clínica de Probiotdrug AG (Alemania) para la enfermedad de Alzheimer. PQ912 se desarrolló de acuerdo con un programa integral de descubrimiento de fármacos (Buchholz et al (2006), J. Med. Chem, vol. 49, pp 664-677; Buchholz et al (2009), J. Med. Chem, vol. 52, pp 7069-7080;

5 Ramsbeck et al (2013), J. Med. Chem, vol. 56, pp 6613-6625; Hoffmann et al (2017), The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, vol. 362, pp 119-130). Específicamente, se demostró que el compuesto PQ912 inhibe la actividad QPCT y QPCTL humana, de rata y de ratón, con valores k_i que oscilan entre 20 nM y 65 nM (Hoffmann et al (2017), The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, vol. 362, pp 119-130). Se ha demostrado que el compuesto PQ912 es seguro y bien tolerado por sujetos humanos y mostró un alto nivel de inhibición de QPCT y QPCTL en un estudio de fase 1 con 200 voluntarios jóvenes y ancianos sanos (Lues et al (2015), Alzheimer's & Dementia: Translational Research & Clinical Interventions, Vol.1, pp 182-195). La estructura química del compuesto PQ912 es la siguiente:



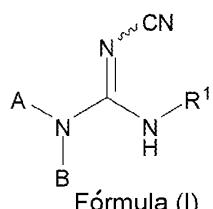
10

3. PQ1565

15 En algunas formas de realización, el principio activo es PQ1565. PQ1565 es un inhibidor de QPCT y/o QPCTL que Probiotrx AG (Alemania) está desarrollando actualmente en un programa en fase preclínica para la enfermedad de Alzheimer.

4. Compuestos inhibidores de QPCT y QPCTL como se describe en WO2008128983 y EP2160380

20 En algunas formas de realización, el principio activo es un inhibidor de QPCT y/o QPCTL como se describe en WO2008128983 y EP2160380. En algunas formas de realización, el principio activo es un compuesto que tiene la Fórmula (I) siguiente, o una de sus sales, solvatos, polimorfos, tautómeros o estereoisómeros farmacéuticamente aceptables:



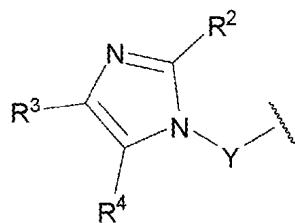
donde:

25 R¹ representa alquilo de C₁₋₁₂; alquenilo de C₂₋₁₂, donde el doble enlace no es adyacente al nitrógeno; carbociclico de C₃₋₁₂; alquilo de -C₁₋₆-carbociclico de C₃₋₁₂; heterociclico de C₃₋₁₂; alquilo de -C₁₋₆-heterociclico de C₃₋₁₂; arilo de C₆₋₁₂; heteroarilo de C₅₋₁₂; alquilarilo de -C₁₋₆-; -alquilo de -C₁₋₆-heteroarilo de C₅₋₁₂; fenilo fusionado con carbociclico de C₃₋₁₂ o fenilo fusionado con heterociclico de C₃₋₁₂; donde cualquiera de los grupos carbociclico de C₃₋₁₂ y heterociclico de C₃₋₁₂ anteriores pueden estar opcionalmente sustituidos con uno o más grupos seleccionados de metilo y oxo;

30 y donde cualquiera de los mencionados grupos fenilo, arilo de C₆₋₁₂ y heteroarilo de C₅₋₁₂ puede estar opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes seleccionados de alquilo de C₁₋₆, alquenilo de C₂₋₆, alquinilo de C₂₋₆, haloalquilo de C₁₋₆, tioalquilo de -C₁₋₆, -SO₂-alquilo de C₁₋₄, alcoxi de C₁₋₆, -O-cicloalquilo de C₃₋₈, cicloalquilo de C₃₋₈, -SO₂-cicloalquilo de C₃₋₈, alqueniloxi de C₃₋₆, alquiniloxi de C₃₋₆, -C(O)-alquilo de C₁₋₆, alcoxi de C₁₋₆ - alquilo de C₁₋₆, nitro, halógeno, ciano, hidroxilo, -C(O)OH, -NH₂, -NH-alquilo de C₄₋₄, -N(alquilo de C₁₋₄)(alquilo de C₁₋₄), -C(O)N(alquilo de C₁₋₄)(alquilo de C₁₋₄), -C(O)NH₂, -C(O)NH(alquilo de C₁₋₄), -C(O)O-alquilo de C₁₋₆, -SO-alquilo de C₁₋₄ y -SO-cicloalquilo de C₁₃₋₆;

35 o R¹ representa fenilo sustituido por fenilo, o fenilo sustituido por un grupo heteroarilo monocíclico de C₅₋₁₂ opcionalmente sustituido; en el que cualquiera de los grupos fenilo y heteroarilo de C₅₋₁₂ monocíclicos pueden estar opcionalmente sustituidos por uno o más grupos seleccionados de alquilo de C₁₋₄, halógeno y alcoxi de C₁₋₄;

40 o R¹ representa fenilo sustituido por benciloxi- en el que cualquiera de los grupos fenilo o benciloxi mencionados anteriormente puede tener opcionalmente sustituyentes en el anillo que son uno o más grupos seleccionados de alquilo de C₁₋₄, halógeno y alcoxi de C₁₋₄;



A representa

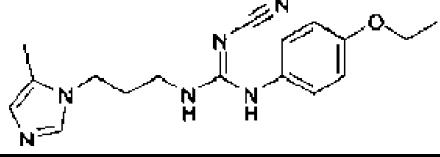
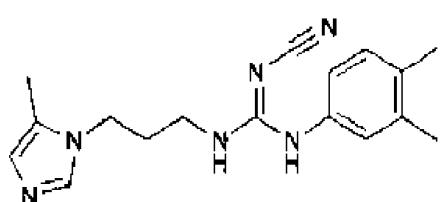
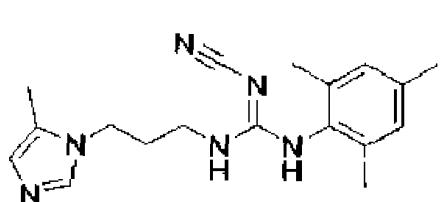
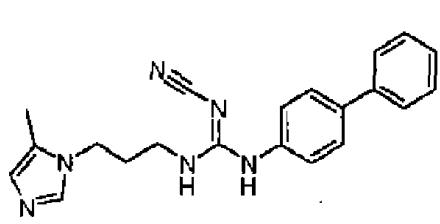
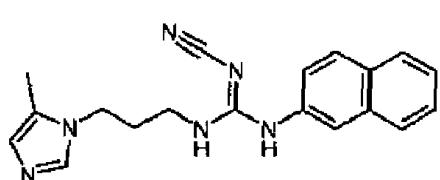
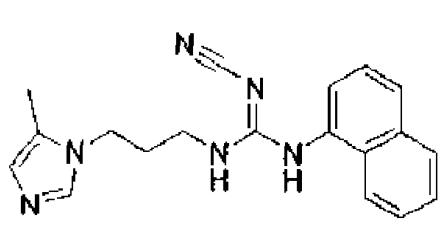
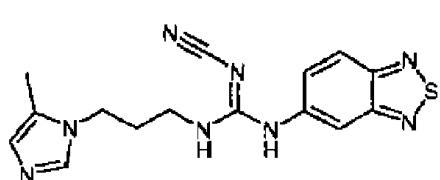
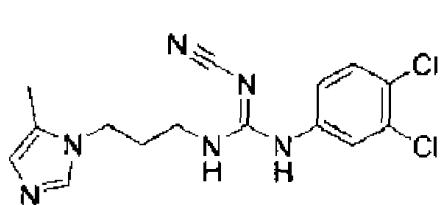
donde Y representa una cadena de alquíleno de C₂₋₅, que puede estar opcionalmente sustituida por uno o dos grupos metilo u opcionalmente puede estar sustituida por dos sustituyentes alquíleno en la misma posición en la que los dos sustituyentes alquíleno están unidos entre sí para formar un grupo espirocicloalquilo de C₃₋₅; y R², R³ y R⁴ representan independientemente H o alquilo de C₁₋₂, siempre que R² y R³ y R⁴ no representen todos H; y

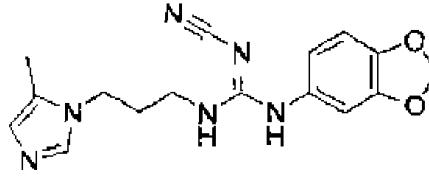
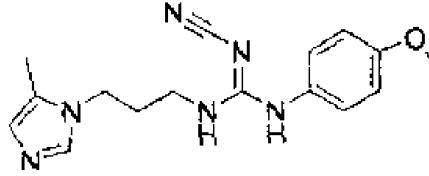
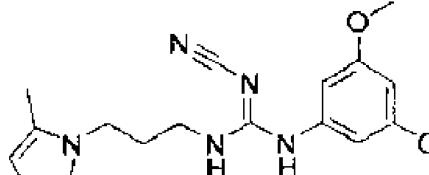
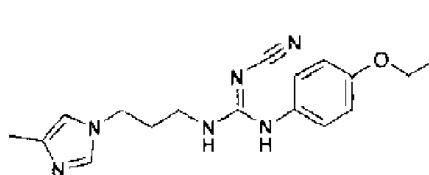
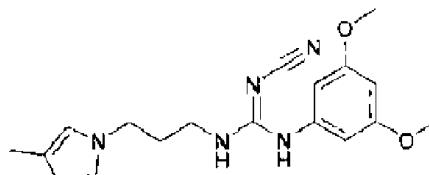
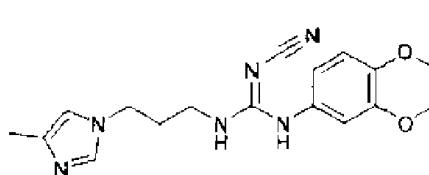
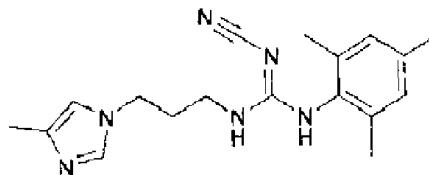
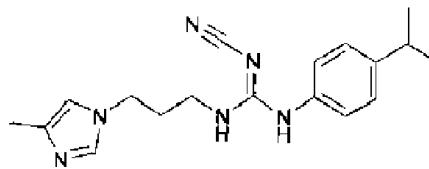
B representa H o metilo.

- 5 10 En algunas formas de realización, el principio activo es un inhibidor de QPCT y/o QPCTL como se describe en WO2008128983 y EP2160380 y se selecciona de entre los compuestos de la Tabla A siguiente:

Tabla A.

Nombre	Estructura
2-ciano(4-etilfenil)-3-(3-(5-metil-1H-imidazol-1-il)propil)guanidina	
(2-ciano(4-isopropilfenil)-3-(3-(5-metil-1H-imidazol-1-il)propil)guanidina	
2-ciano(2,3-dihidrobenzo[b][1,4]dioxin-7-il)-3-(3-(5-metil-1H-imidazol-1-il)propil)guanidina	
2-ciano(4-cianofenil)-3-(3-(5-metil-1H-imidazol-1-il)propil)guanidina	
2-ciano(3,4,5-trimetoxifenil)-3-(3-(5-metil-1H-imidazol-1-il)propil)guanidina	
2-ciano(4-etoxifenil)-3-(3-(5-metil-1H-imidazol-1-il)propil)guanidina	

Nombre	Estructura
	
2-ciano(3-(5-metil-1H-imidazol-1-il)propil)-3-(3,4-dimetilfenil)guanidina	
(3-(5-metil-1H-imidazol-1-il)propil)-2-ciano-3-mesitilguanidina	
(3-(5-metil-1H-imidazol-1-il)propil)-2-ciano-3-(bifenil-4-il)guanidina	
(3-(5-metil-1H-imidazol-1-il)propil)-2-ciano-3-(naftalen-2-il)guanidina	
(3-(5-metil-1H-imidazol-1-il)propil)-2-ciano-3-(naftalen-1-il)guanidina	
(3-(5-metil-1H-imidazol-1-il)propil)-3-(benzo[c][1,2,5]tiadiazol-6-il)-2-cianoguanidina	
(3-(5-metil-1H-imidazol-1-il)propil)-3-(3,4-diclorofenil)-2-cianoguanidina	

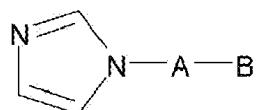
Nombre	Estructura
(benzo[d][1,3]dioxol-6-il)-2-ciano-3-(3-(5-metil-1H-imidazol-1-il)propil)guanidina	
2-ciano(4-metoxifenil)-3-(3-(5-metil-1H-imidazol-1-il)propil)guanidina	
2-ciano(3,5-dimetoxifenil)-3-(3-(5-metil-1H-imidazol-1-il)propil)guanidina	
2-ciano(4-etoxifenil)-3-(3-(4-metil-1H-imidazol-1-il)propil)guanidina	
2-ciano(3,5-dimetoxifenil)-3-(3-(4-metil-1H-imidazol-1-il)propil)guanidina	
2-ciano(2,3-dihidrobenzo[b][1,4]dioxin-7-il)-3-(3-(4-metil-1H-imidazol-1-il)propil)guanidina	
2-ciano(mesitil)-3-(3-(4-metil-1H-imidazol-1-il)propil)guanidina	
2-ciano(4-isopropilfenil)-3-(3-(4-metil-1H-imidazol-1-il)propil)guanidina	

Nombre	Estructura
2-ciano(4-etilfenil)-3-(3-(4-metil-1H-imidazol-1-il)propil)guanidina	
2-ciano(3-(4-metil-1H-imidazol-1-il)propil)-3-(naftalen-1-il)guanidina	
(benzo[c][1,2,5]tiadiazol-6-il)-2-ciano-3-(3-(4-metil-1H-imidazol-1-il)propil)guanidina	
2-ciano(3,4,5-trimetoxifenil)-3-(3-(4-metil-1H-imidazol-1-il)propil)guanidina	
2-ciano(4-cianofenil)-3-(3-(4-metil-1H-imidazol-1-il)propil)guanidina	
(3,4-diclorofenil)-2-ciano-3-(3-(4-metil-1H-imidazol-1-il)propil)guanidina	
2-ciano(4-metoxifenil)-3-(3-(4-metil-1H-imidazol-1-il)propil)guanidina	
2-ciano-1-[3-(4-metil-1H-imidazol-1-il)propil]-4-fenilbenceno-1-guanidina	
2-ciano(3-(4-metil-1H-imidazol-1-il)propil)-3-(naftalen-2-il)guanidina	

Nombre	Estructura

5. Compuestos inhibidores de QPCT y QPCTL como se describe en WO2004D98591 y EP1620091

5 En algunas formas de realización, el principio activo es un inhibidor de QPCT y/o QPCTL como se describe en WO2004D98591 y EP1620091. En algunas formas de realización, el principio activo es un compuesto que tiene la fórmula (II) siguiente, o una de sus sales, solvatos, polimorfos, tautómeros o estereoisómeros aceptables desde el punto de vista farmacéutico:

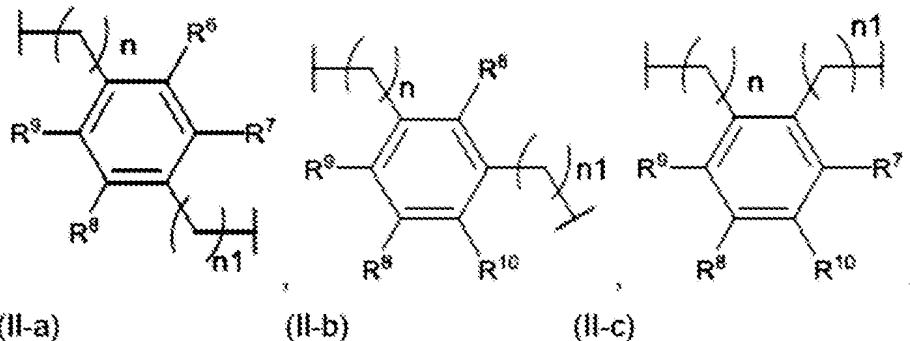


fórmula (II)

donde:

10

A es un residuo seleccionado del grupo que consiste en (II-a), (II-b) o (II-c):

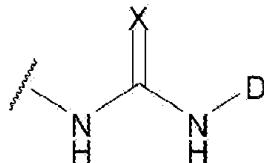


15

donde:

R⁶-R¹⁰ son H o metilo;

n y n1 son independientemente 1-5; y
B es;



20

donde:

D representa fenilo sustituido, donde sustitución significa -oxialquilo, -tioalquilo, halogenilo;

25

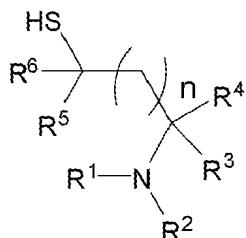
o D representa dihidrobenzodioxina, benzodioxol, benzoditiol dihidrobenzoditiina, benzooxatiol o dihidrobenzooxatiina; y
X representa O, S, N-CN.

30 En algunas formas de realización, el principio activo es un inhibidor de QPCT y/o QPCTL como se describe en las Tablas 2 y 3 de WO2004D98591 y EP1620091, así como los compuestos específicos descritos en los ejemplos en WO2004D98591 y EP1620091.

6. Compuestos inhibidores de QPCT y QPCTL como se describe en WO2005039548 y EP1675578.

En algunas formas de realización, el principio activo es un inhibidor de QPCT y/o QPCTL como se describe en WO2005039548 y EP1675578. En algunas formas de realización, el principio activo es un compuesto que tiene la fórmula (III) siguiente, o una de sus sales, solvatos, polimorfos, tautómeros o estereoisómeros aceptables desde el punto de vista farmacéutico:

5



fórmula (III)

donde:

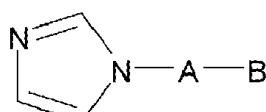
10 R¹-R⁶ son independientemente H o una cadena de alquilo ramificada o no ramificada, una cadena de alquenilo ramificada o no ramificada, una cadena de alquínilo ramificada o no ramificada, carbocíclico, arilo, heteroarilo, heterocíclico, aza-aminoácido, aminoácido o un mimético del mismo, péptido o un mimético del mismo; estando opcionalmente sustituidos todos los residuos anteriores; y n puede ser 0 o 2.

15 En algunas formas de realización, el principio activo es un inhibidor de QPCT y/o QPCTL como se describe en las Tablas 2, 3 y 5 de WO2005039548 y EP1675578, así como los compuestos específicos como se describe en los ejemplos en WO2005039548 y EP1675578.

20 **7. Compuestos inhibidores de QPCT y QPCTL como se describe en WO2005075436 y EP1713780.**

25 En algunas formas de realización, el principio activo es un inhibidor de QPCT y/o QPCTL como se describe en WO2005075436 y EP1713780. En algunas formas de realización, el principio activo es un compuesto que tiene la fórmula (IV) o (V) siguiente, o una de sus sales, solvatos, polimorfos, tautómeros o estereoisómeros aceptables desde el punto de vista farmacéutico:

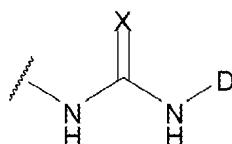
25



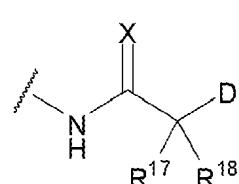
fórmula (IV)

donde:

30 A es una cadena de alquilo de C₃ no ramificada; y B es un grupo seleccionado de (IV-a) o (IV-b):



(IV-a)



(IV-b)

35

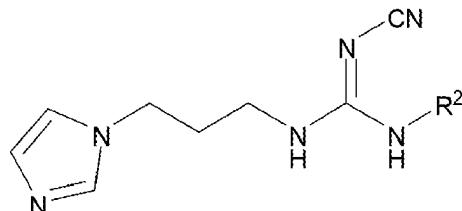
donde:

cuando B es un grupo (IV-a),

D representa dihidrobenzodioxina, benzodioxol, benzoditiol dihidrobenzoditiina, benzooxatiol o dihidrobenzooxatiina;

40 o D representa tert-butilo, bencilo, fenilo, 4-fluoro-fenilo, 4-cloro-fenilo, 4-etil-fenilo, 4-(trifluorometil)-fenilo, 4-(metoxicarbonil)-fenilo, 4-(acetilo)-fenilo, 4-(metoxi)-fenilo, biciclo[2.2.1]hept-5-en-2-ilo, 3,4-

(dimetoxi)-fenilo, 2,4-(dimetoxi)-fenilo, 3,5 -(dimetoxi)-fenilo, 2-(metoxicarbonil)-fenilo, 4-(oxazol-5-il)-fenilo, 4-(pirazol-1-il)-fenilo, 4-isopropilfenilo, 4-(piperidin-1-sulfonil)-fenilo, 4-(morpholin-4-il)-fenilo, 4-ciano-fenilo, 2,3-dihidro-benzo[1,4]-dioxin-6-ilo, benzo[1,3]dioxol-5-ilo, 3,4,5-(trimetoxi)-fenilo, 3-(metoxi)-fenilo, 4-(etoxi)-fenilo, 4-(benciloxi)-fenilo, 4-yodofenilo, 4-bromo-fenilo, 4 -metil-fenilo, naftalen-1-ilo, 4-nitro-fenilo, ciclooctilo, furan-2-il-metilo, tetrahidrofuran-2-il-metilo, benzo[1,3]dioxol-5-ilmetilo, 2-(morpholin-4-il)-etilo, 4-(metilsulfanil)-fenilo, 4-(dimethylamino)-fenilo, 4-(trifluorometoxi)-fenilo, benzoilo o piridin-4-ilo;
 o cuando B es un grupo (IV-b),
 D representa fenilo sustituido, en el que sustitución significa alcoxi-, -tioalquilo, halógeno o un éster de arilo o alquilo de ácido carboxílico;
 o D representa dihidrobenzodioxina, benzodioxol, benzoditiol dihidrobenzoditiina, benzooxatiol o dihidrobenzooxatiina;
 o cuando B es un grupo (IV-b) y R¹⁷ y R¹⁸ ambos son hidrógeno, D es además fenilo; X representa S; Y representa S;
 uno de R¹⁷ y R¹⁸ es H y el otro es metilo;
 o R¹⁷ y R¹⁸ se pueden conectar para formar un carbociclo con hasta 6 átomos en el anillo;
 o cuando D representa fenilo o 3,4-(dimetoxi)-fenilo, los grupos R¹⁷ y R¹⁸ son ambos H;
 y donde el término "alquilo" denota un grupo alquilo de C₁₋₆.

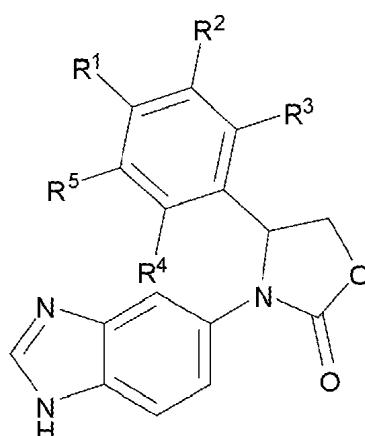


20 (V)

donde:

R² representa fenilo opcionalmente sustituido en la posición 4 con un sustituyente seleccionado de entre etoxi, benciloxi, metoxi, acetilo, nitro, halo, metilo, etilo, metiltio, dimetilamino o trifluorometilo; o 3-metoxifenilo, 3,4-dimetoxifenilo, 2,4-dimetoxifenilo, 3,5-dimetoxifenilo o 3,4,5-trimetoxifenilo;
 o metilo, 2,3-dihidrobenzo[b][1,4]dioxin-7-ilo, benzo[d][1,3]dioxol-6-ilo, bencilo, naftalenilo, ciclooctilo, tert-butilo, butilo, tritilo, benzo[d][1,3]dioxol-6-ilmetilo, (tetrahidrofuran-2-il)metilo, (furan-2-il)metilo o 2-(morpholin-4-il)etilo.

30 **8. Compuestos inhibidores de QPCT y QPCTL como se describe en WO2014140279 y EP2970235**
 En algunas formas de realización, el principio activo es un inhibidor de QPCT y/o QPCTL como se describe en WO2014140279 y EP2970235. En algunas formas de realización, el principio activo es un compuesto que tiene la fórmula (VI) siguiente, o una de sus sales, solvatos, polimorfos, tautómeros o estereoisómeros aceptables desde el punto de vista farmacéutico:



Fórmula (VI)

donde:

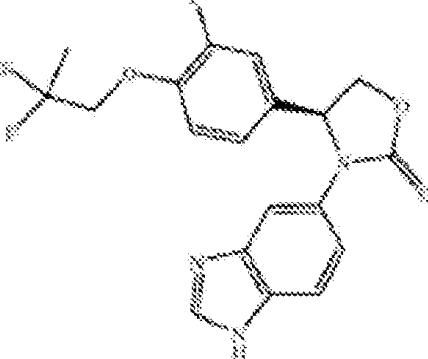
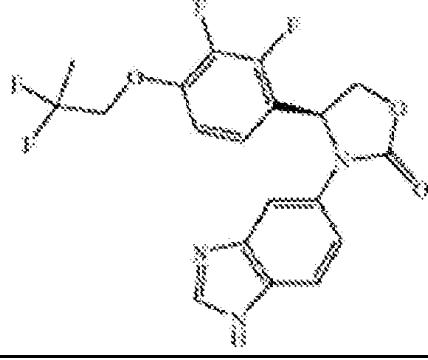
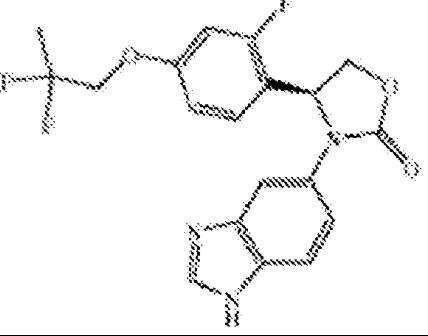
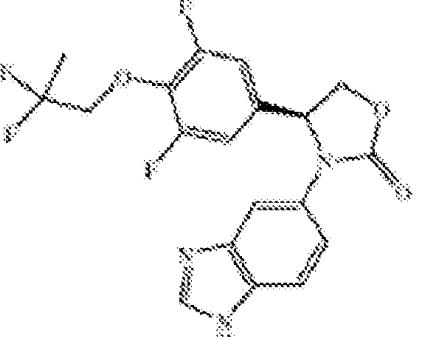
R¹ representa alquilo, -O-alquilo, heterociclico o cicloalquilo;

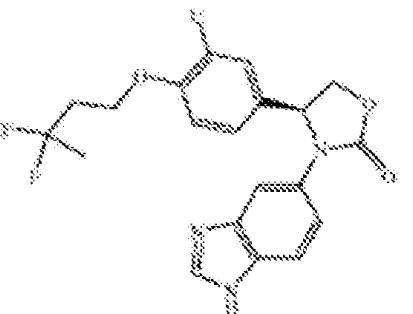
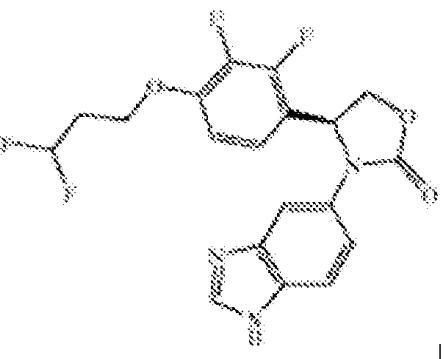
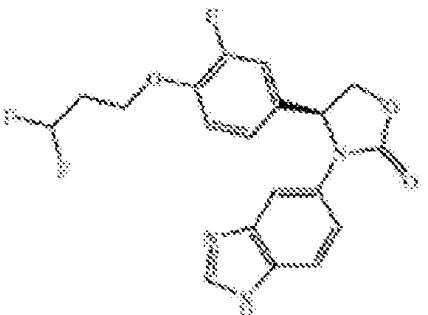
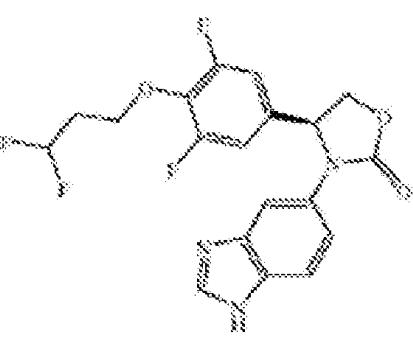
5 R^2 y R^3 representan independientemente hidrógeno, halógeno o CN;
 R^4 y R^5 representan independientemente hidrógeno o halógeno;
 donde al menos uno de R^2 , R^3 , R^4 y R^5 es halógeno o CN;
 y donde los grupos alquilo, -O-alquilo, heterociclico o cicloalquilo anteriores están sustituidos con uno o más halógenos.

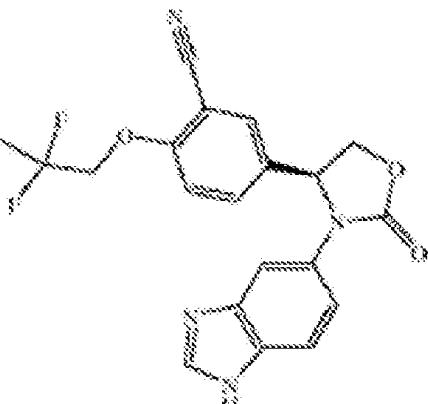
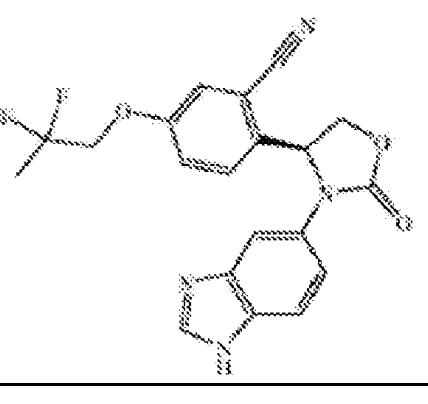
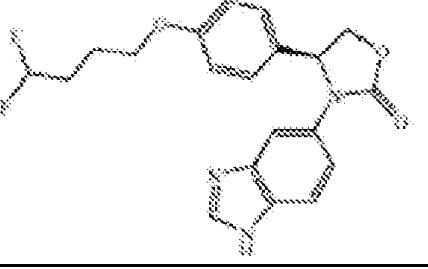
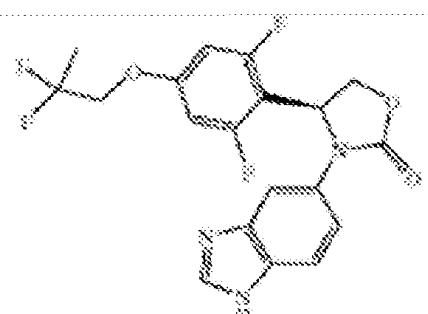
10 En algunas formas de realización, el principio activo es un inhibidor de QPCT y/o QPCTL como se describe en WO2014140279 y EP2970235 y se selecciona de entre los compuestos de la Tabla B siguiente. En algunas formas de realización, el principio activo se selecciona de entre los ejemplos 1-3, 5-15, 17-21, 23-26 y 28-30 en la Tabla B siguiente.

Tabla B

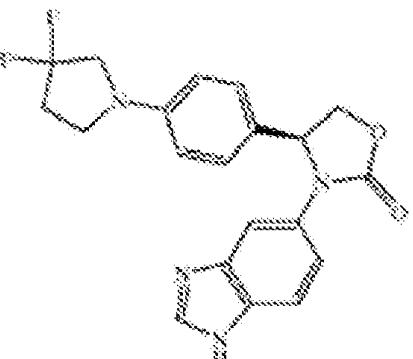
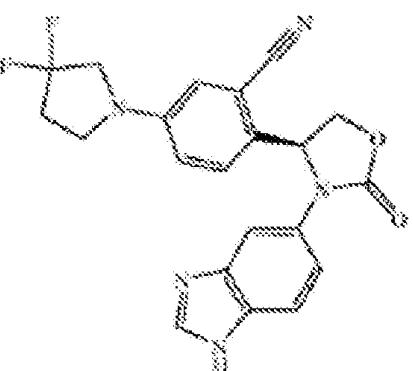
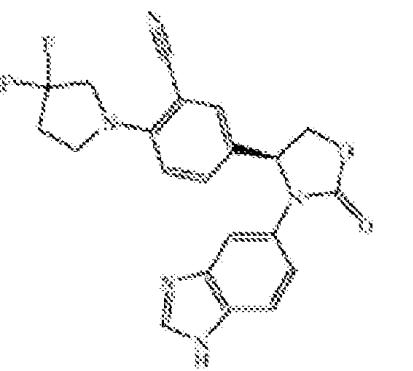
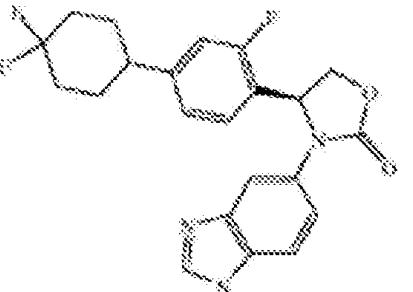
Comp. N. ^o	Estructura	Nombre
1		(S)-3-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-4-(4-(3,3-difluorobutoxi)-2,3-difluorofenil)oxazolidin-2-ona
2		(S)-3-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-4-(4-(3,3-difluoropropoxi)-2-fluorofenil)oxazolidin-2-ona
3		(S)-3-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-4-(4-(3,3-difluorobutoxi)-2-fluorofenil)oxazolidin-2-ona
4		(S)-3-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-4-(4-(3,3-difluoropropoxi)phenyl)oxazolidin-2-ona

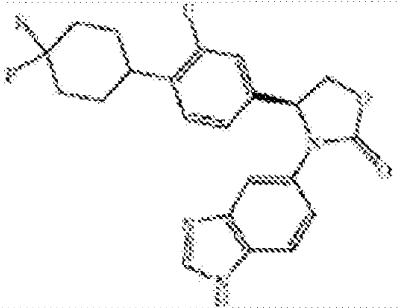
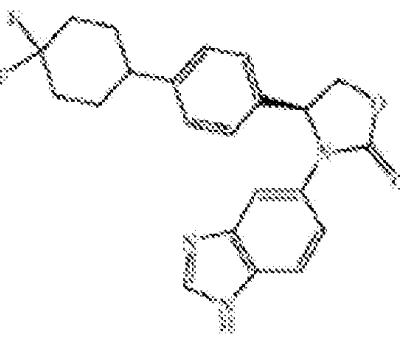
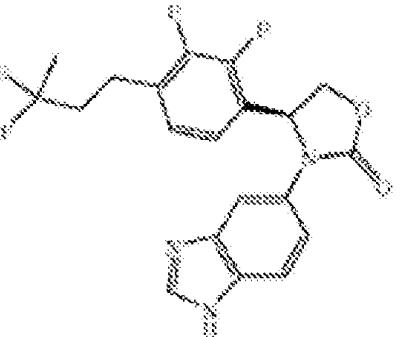
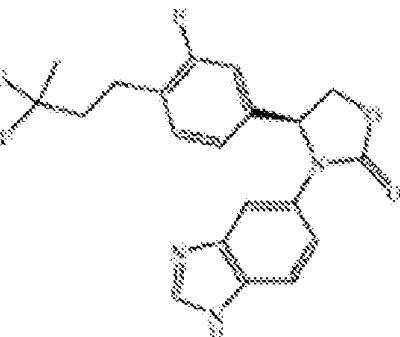
Comp. N. ^o	Estructura	Nombre
5		(S)-3-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-4-(4-(2,2-difluoropropoxi)-3-fluorofenil)oxazolidin-2-ona
6		(S)-3-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-4-(4-(2,2-difluoropropoxi)-2,6-difluorofenil)oxazolidin-2-ona
7		(S)-3-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-4-(4-(2,2-difluoropropoxi)-2-fluorofenil)oxazolidin-2-ona
8		(S)-3-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-4-(4-(2,2-difluoropropoxi)-3,5-difluorofenil)oxazolidin-2-ona
10		(S)-3-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-4-(4-(3,3-difluorobutoxi)-3-fluorofenil)oxazolidin-2-ona

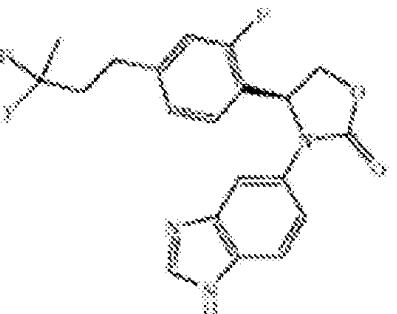
Comp. N. ^o	Estructura	Nombre
		
11		(S)-3-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-4-(4-(3,3-difluoropropoxi)-2,3-difluorofenil)oxazolidin-2-ona
12		(S)-3-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-4-(4-(3,3-difluoropropoxi)-3-fluorofenil)oxazolidin-2-ona
13		(S)-3-(1H-benzo[d]imidazol-6-il)-4-(4-(3,3-difluoropropoxi)-3,5-difluorofenil)oxazolidin-2-ona
14		(S)-5-(3-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-2-oxooxazolidin-4-il)-2-(2,2-difluoropropoxi)benzonitrilo

Comp. N. ^o	Estructura	Nombre
		
15		(S)-2-(3-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-2-oxooxazolidin-4-il)-5-(2,2-difluoropropoxi)benzonitrilo
16		(S)-3-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-4-(4-(4,4-difluorobutoxi)fenil)oxazolidin-2-ona
17		(S)-3-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-4-(4-(2,2-difluoropropoxi)-2,6-difluorofenil)oxazolidin-2-ona
18		(S)-3-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-4-(4-(3,3-difluoropirrolidin-1-il)-2-fluorofenil)-oxazolidin-2-ona

Comp. N. ^o	Estructura	Nombre
19		(S)-3-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-4-(4-(3,3-difluoropirrolidin-1-yl)-2,3-difluorofenil)oxazolidin-2-ona
20		(S)-3-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-4-(4-(3,3-difluoropirrolidin-1-yl)-2,6-difluorofenil)oxazolidin-2-ona
21		(S)-3-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-4-(4-(3,3-difluoropirrolidin-1-yl)-3-fluorofenil)oxazolidin-2-ona
22		3-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-4-(4-(3,3-difluoropirrolidin-1-yl)fenil)oxazolidin-2-ona

Comp. N. ^o	Estructura	Nombre
		
23		(S)-2-(3-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-2-oxooxazolidin-4-il)-5-(3,3-difluoropirrolidin-1-il)benzonitrilo
24		(S)-5-(3-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-2-oxooxazolidin-4-il)-2-(3,3-difluoropirrolidin-1-il)benzonitrilo
25		(S)-3-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-4-(4-(4,4-difluorociclohexil)-2-fluorofenil)oxazolidin-2-ona
26		(S)-3-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-4-(4-(4,4-difluorociclohexil)-3-fluorofenil)oxazolidin-2-ona

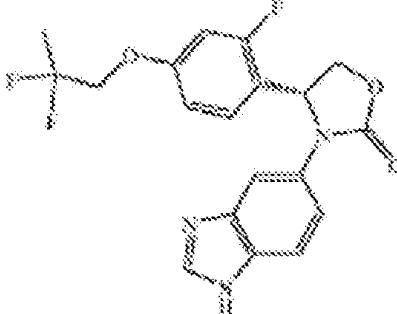
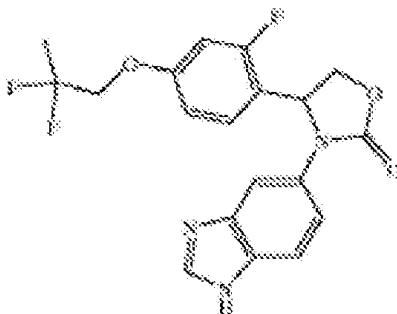
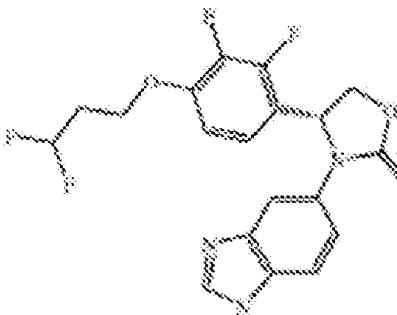
Comp. N. ^o	Estructura	Nombre
		
27		(S)-3-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-4-(4-(4,4-difluorocyclohexyl)fenil)oxazolidin-2-ona
28		(S)-3-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-4-(4-(3,3-difluorobutyl)-2,3-difluorofenil)oxazolidin-2-ona
29		(S)-3-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-4-(4-(3,3-difluorobutyl)-3-fluorofenil)oxazolidin-2-ona
30		(S)-3-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-4-(4-(3,3-difluorobutyl)-2-fluorofenil)oxazolidin-2-ona

Comp. N. ^o	Estructura	Nombre
		

En algunas formas de realización, el principio activo es un inhibidor de QPCT y/o QPCTL como se describe en WO2014140279 y EP2970235 y se selecciona de entre los compuestos de la Tabla C siguiente.

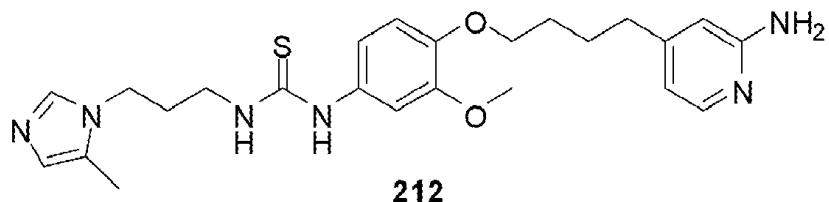
5

Tabla C

Comp. N. ^o	Estructura	Nombre
7a		(R)-3-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-4-(4-(2,2-difluoropropoxy)-2-fluorophenyl)oxazolidin-2-ona
7b		3-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-4-(4-(2,2-difluoropropoxy)-2-fluorophenyl)oxazolidin-2-ona
11a		(R)-3-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-4-(4-(3,3-difluoropropoxy)-2,3-difluorophenyl)oxazolidin-2-ona

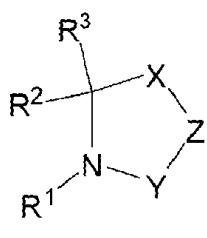
9. Compuestos inhibidores de QPCT y QPCTL como se describe en Hoang et al (2017), J. Med. Chem, vol. 60, pp 2573-2590.

En algunas formas de realización, el principio activo es un inhibidor de QPCT y/o QPCTL como se describe en Hoang et al (2017), J. Med. Chem, vol. 60, pp 2573-2590. En algunas formas de realización, el principio activo es el compuesto denominado "compuesto 212" siguiente:



10. Compuestos inhibidores de QPCT y QPCTL como se describe en WO2011029920 y EP2475428.

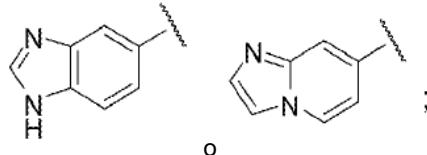
10 En algunas formas de realización, el principio activo es un inhibidor de QPCT y/o QPCTL como se describe en WO2011029920 y EP2475428. En algunas formas de realización, el principio activo es un compuesto que tiene la fórmula (VII) siguiente, o una de sus sales, solvatos, polimorfos, tautómeros o estereoisómeros aceptables desde el punto de vista farmacéutico:



(VII)

15 donde:

R¹ representa



20 R² representa alquilo de C₁₋₈, arilo, heteroarilo, carbociclico, heterociclico, alquilarilo de -C₁₋₄, alquilo de -C₁₋₄-heteroarilo, alquilcarbociclico de -C₁₋₄ o alquiheterociclico de -C₁₋₄; donde cualquiera de los grupos arilo y heteroarilo mencionados anteriormente puede estar opcionalmente sustituido por uno o más grupos seleccionados de alquilo de C₁₋₆, alquenilo de C₂₋₆, alquinilo de C₂₋₆, haloalquilo de C₁₋₆, tioalquilo de -C₁₋₆, -SO-alquilo de C₁₁₋₄, -SO₂-alquilo de C₁₋₄, alcoxi de C₁₋₆, -O-cicloalquilo de C₃₋₈, cicloalquilo de C₃₋₈, -SO₂-cicloalquilo de C₃₋₈, -SO-cicloalquilo de C₁₃₋₆, alqueniloxi de C₃₋₆, -C(O)-alquilo de C₁₋₆, -C(O)O-alquilo de C₁₋₆, alcoxi de C₁₋₆, alcoxi de C₁₋₆, nitro, halógeno, haloalquilo de C₁₋₆, halo-alcoxi de C₁₋₆, ciano, hidroxilo, -C(O)OH, -NH₂, NH-alquilo de C₁₋₄, -N(alquilo de C₁₋₄) de alquilo de C₁₋₄, -N(alquilo de C₁₋₄)-N(alquilo de C₁₋₄)(alquilo de C₁₋₄), alquilo de -C₁₋₄-N(alquilo de C₁₋₄)(alquilo de C₁₋₄), -N(cicloalquilo de C₃₋₈)(cicloalquilo de C₃₋₈), -N(alquilo de -C₁₋₆ alcoxi de -C₁₋₆)(alquilo de -C₁₋₆- alcoxi de C₁₋₆), -C(O)N(alquilo de C₁₋₄)(alquilo de C₁₋₄), -C(O)NH₂, -C(O)NH(alquilo de C₁₋₄) y -C(O)NH(cicloalquilo de C₃₋₁₀); y donde cualquiera de los grupos carbociclico y heterociclico mencionados anteriormente puede estar opcionalmente sustituido con uno o más grupos seleccionados de alquilo de C₁₋₄, oxo, halógeno, -C(O)-alquilo de C₁₋₆ y alcoxi de C₁₋₄;

35 o R² representa fenilo sustituido por fenilo, fenilo sustituido por un grupo heteroarilo monocíclico, fenilo sustituido por fenoxi, fenilo sustituido por heterociclico, fenilo sustituido por heterociclico en el que dicho heterociclico está sustituido por fenilo, fenilo sustituido por y -O-alquilo de C₁₋₄-heterociclico, fenilo sustituido por benciloxi, fenilo sustituido por carbociclico, fenilo sustituido por carbociclico en el que dicho carbociclico está sustituido por heterociclico, fenilo sustituido por -O-carbociclico, heterociclico sustituido por fenilo, carbociclico sustituido por fenilo, fenilo condensado con carbociclico, fenilo fusionado con heterociclico, alquilo de -C₁₋₄ (fenilo sustituido por fenilo), alquilo de -C₁₋₄ (fenilo sustituido por un grupo heteroarilo monocíclico), alquilo de -C₁₋₄ (fenilo sustituido por un grupo heterociclico monocíclico), alquilo de -C₁₋₄ (fenilo sustituido por un grupo -O-carbociclico), alquilo de -C₁₋₄ (fenilo sustituido por benciloxi), alquilo de -C₁₋₄ (fenilo opcionalmente sustituido condensado con carbociclico opcionalmente sustituido o

40

5 alquilo de $-C_{1-4}$ (fenilo opcionalmente sustituido condensado con heterociclico opcionalmente sustituido); en el que cualquiera de los grupos fenilo, bencilio y heteroarilo mencionados anteriormente puede estar opcionalmente sustituido con uno o más grupos seleccionados de alquilo de C_{1-4} , halógeno y alcoxi de C_{1-4} , y en el que cualquiera de los grupos carbociclico y heterociclico mencionados anteriormente puede estar opcionalmente sustituido con uno o más grupos seleccionados de metilo, fenilo, oxo, halógeno, hidroxilo y alcoxi de C_{1-4} ; R^3 representa H, alquilo de $-C_{1-4}$ o arilo; en el que dicho arilo puede estar opcionalmente sustituido por uno o más grupos seleccionados de alquilo de C_{1-6} , alquenilo de C_2 , alquinilo de C_{2-6} , haloalquilo de C_{1-6} , tioalquilo de $-C_{1-6}$, $-SO$ -alquilo de C_{1-4} , $-SO_2$ -alquilo de C_{1-4} , alcoxi de C_{1-6} , $-O$ -cicloalquilo de C_{3-8} , cicloalquilo de C_{3-8} , $-SO_2$ -cicloalquilo de C_{3-8} , $-SO$ -cicloalquilo de C_{13-6} , alqueniloxi de $-C_{3-6}$, alquiniloxi de C_{3-6} , $-C(O)$ -alquilo de C_{1-6} , $-C(O)O$ -alquilo de C_{1-6} , alcoxi de C_{1-6} , alquilo de C_{1-6} , nitro, halógeno, ciano, hidroxilo, $-C(O)OH$, $-NH_2$, NH -alquilo de C_{1-6} , $-N$ (alquilo de C_{1-4})(alquilo de C_{1-4}), $-C(O)N$ (alquilo de C_{1-4})(alquilo de C_{1-4}), $-C(O)NH_2$, $-C(O)NH$ (alquilo de C_{1-4}) y, $-C(O)NH$ (cicloalquilo de C_{3-10});

10 o R^2 y R^3 se unen para formar un anillo carbociclico que está opcionalmente sustituido por uno o más grupos alquilo de C_{1-2} ;

15 o R^2 y R^3 se unen para formar un anillo de carbociclico que se fusiona con fenilo, en el que el carbociclico y/o el fenilo mencionados anteriormente pueden estar opcionalmente sustituidos con uno o más grupos seleccionados de alquilo de C_{1-4} , halógeno y alcoxi de C_{1-4} ;

20 o R^2 y R^3 se unen para formar un anillo de carbociclico que se fusiona con heteroarilo monocíclico, en el que el carbociclico y/o heteroarilo mencionados anteriormente pueden estar opcionalmente sustituidos con uno o más grupos seleccionados de alquilo de C_{1-4} , halógeno y alcoxi de C_{1-4} ;

25 X representa $C=O$, O, S, CR^7R^8 , $-O-CH_2-$ o $-CH_2-CH_2-$;

Y representa CDH^9 , $C=O$ o $C=S$;

Z representa $-N-R^4$, O o CHR^{10} , de tal modo que cuando X representa O o S, Z debe representar CHR^{10} ;

30 o X y Z representan dos átomos de carbono adyacentes de un anillo de fenilo que está fusionado en esa posición y que está opcionalmente sustituido por uno o más halógenos o grupos alquilo de C_{1-2} ; R^4 representa H, alquilo de $-C_{1-8}$, $-C(O)$ -alquilo de C_{1-6} o $-NH_2$;

35 R⁷ y R⁸ representan independientemente H o -alquilo de C_{1-4} ;

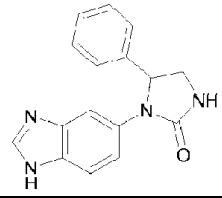
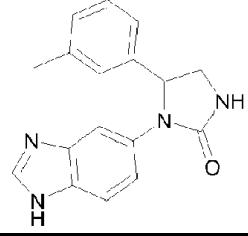
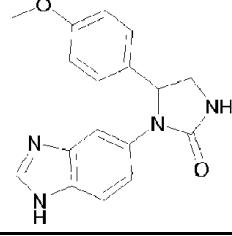
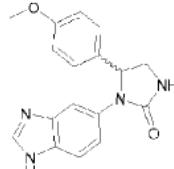
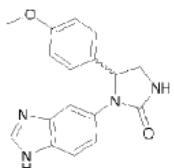
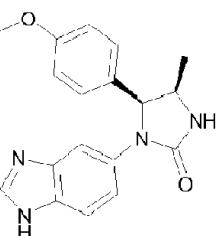
R⁹ y R¹⁰ representan independientemente H o metilo;

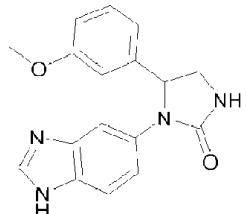
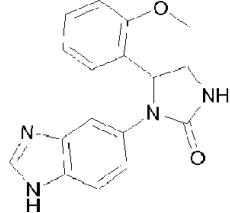
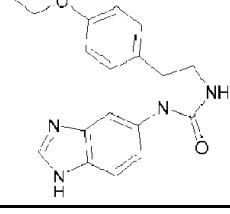
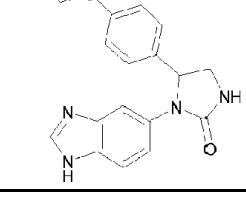
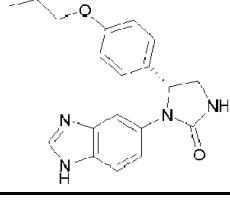
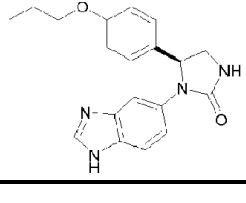
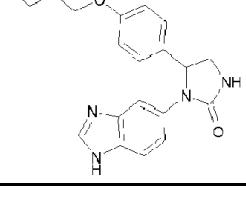
siempre que el residuo $-Y-Z-X-$ represente un residuo distinto de $-C(=O)-N(-R^4)-C(=O)-$ o $-C(=S)-N(-R^4)-C(=O)-$.

En algunas formas de realización, el principio activo es un inhibidor de QPCT y/o QPCTL como se describe en WO2011029920 y EP2475428 y se selecciona de entre los compuestos de la Tabla D siguiente.

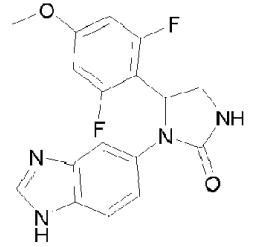
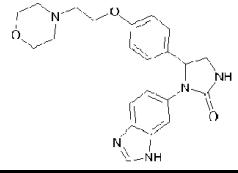
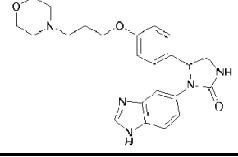
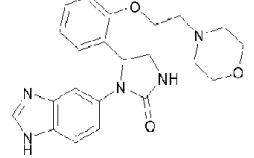
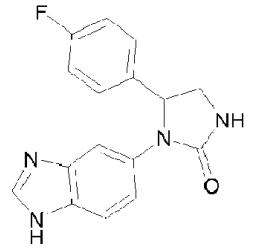
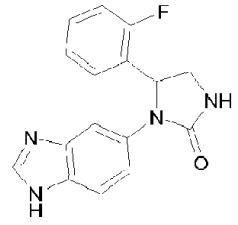
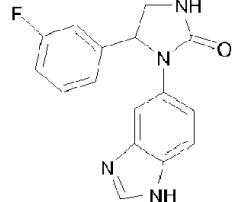
Tabla D

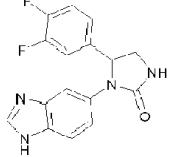
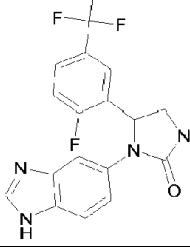
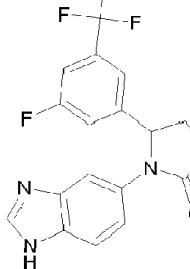
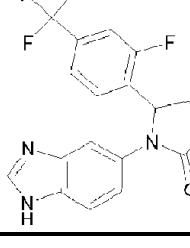
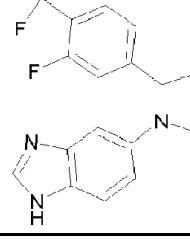
Nombre químico	Estructura
5-tert-butil-1-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)imidazolidin-2-ona	
1-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-5-ciclohexylimidazolidin-2-ona	

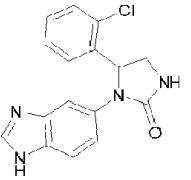
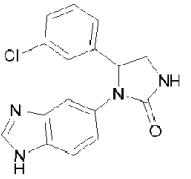
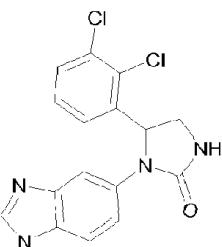
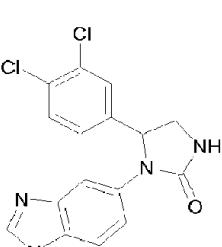
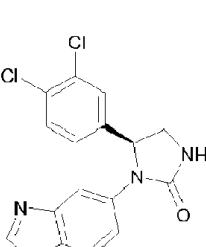
Nombre químico	Estructura
1-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-5-fenylimidazolidin-2-ona	
1-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-5-m-tolylimidazolidin-2-ona	
1-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-5-(4-metoxifenil)imidazolidin-2-ona	
1-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-5-(4-metoxifenil)imidazolidin-2-ona	 <p data-bbox="1012 1338 1171 1372">Enantiómero 1</p>
1-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-5-(4-metoxifenil)imidazolidin-2-ona	 <p data-bbox="1012 1596 1171 1630">Enantiómero 2</p>
(4R,5S)-1-(1H-benzo[d]imidazol-6-il)-5-(4-metoxifenil)-4-metilimidazolidin-2-ona	
1-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-5-(3-metoxifenil)imidazolidin-2-ona	

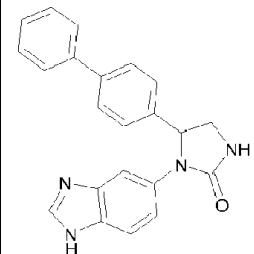
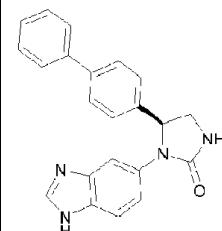
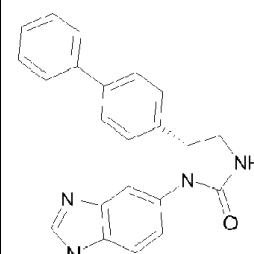
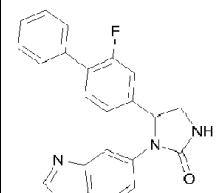
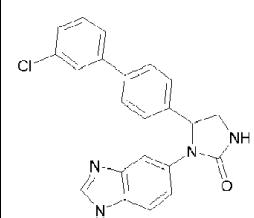
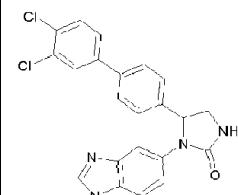
Nombre químico	Estructura
	
1-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-5-(2-metoxifenil)imidazolidin-2-ona	
1-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-5-(4-etoxifenil)imidazolidin-2-ona	
1-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-5-(4-propoxifenil)imidazolidin-2-ona	
(R)-1-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-5-(4-propoxifenil)imidazolidin-2-ona	
(S)-1-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-5-(4-propoxifenil)imidazolidin-2-ona	
1-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-5-(4-butoxifenil)imidazolidin-2-ona	
1-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-5-(4-(pentiloxi)fenil)imidazolidin-2-ona	

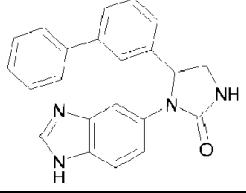
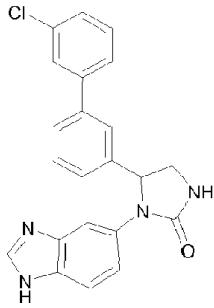
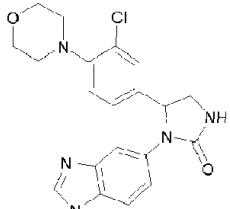
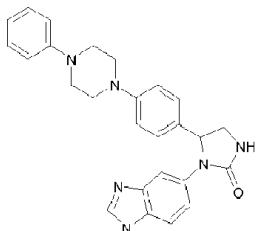
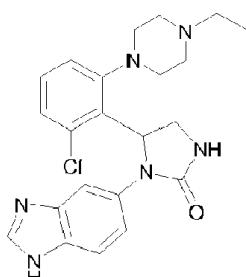
Nombre químico	Estructura
1-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-5-(4-isopropoxifenil)imidazolidin-2-ona	
1-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-5-(4-metoxibenzo[d][1,3]dioxol-6-il)imidazolidin-2-ona	
1-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-5-(2,3-dihidrobenzo[b][1,4]dioxin-6-il)imidazolidin-2-ona	
5-(4-(1,1,2,2-tetrafluoroetoxi)fenil)-1-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)imidazolidin-2-ona	
1-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-5-(2,2-difluorobenzo[d][1,3]dioxol-5-il)imidazolidin-2-ona	
1-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-5-(3-fluoro-4-metoxifenil)imidazolidin-2-ona	

Nombre químico	Estructura
1-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-5-(2,6-difluoro-4-metoxifenil)imidazolidin-2-ona	
5-(4-(2-morfolinoetoxi)fenil)-1-(1H-benzo[d]imidazol-6-il)imidazolidin-2-ona	
5-(4-(3-morfolinopropoxi)fenil)-1-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)imidazolidin-2-ona	
5-(2-(2-morfolinoetoxi)fenil)-1-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)imidazolidin-2-ona	
1-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-5-(4-fluorofenil)imidazolidin-2-ona	
1-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-5-(2-fluorofenil)imidazolidin-2-ona	
1-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-5-(3-fluorofenil)imidazolidin-2-ona	
1-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-5-(2,6-difluorofenil)imidazolidin-2-ona	

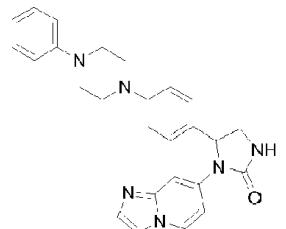
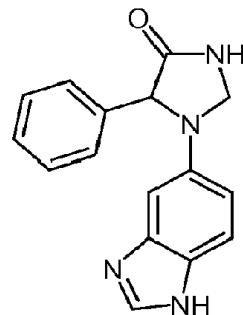
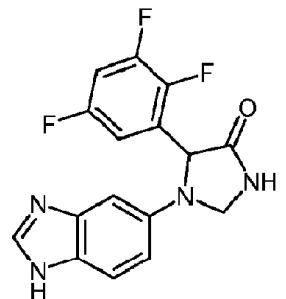
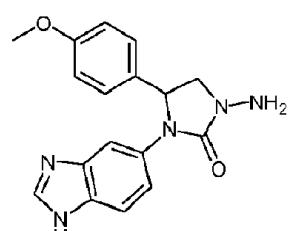
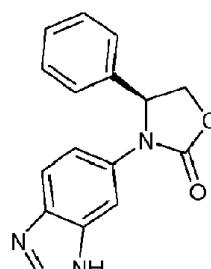
Nombre químico	Estructura
	
1-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-5-(3,4-difluorofenil)imidazolidin-2-ona	
1-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-5-(2-fluoro-5-(trifluorometil)fenil)imidazolidin-2-ona	
1-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-5-(3-fluoro-5-(trifluorometil)fenil)imidazolidin-2-ona	
1-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-5-(2-fluoro-4-(trifluorometil)fenil)imidazolidin-2-ona	
1-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-5-(3-fluoro-4-(trifluorometil)fenil)imidazolidin-2-ona	
1-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-5-(2-clorofenil)imidazolidin-2-ona	

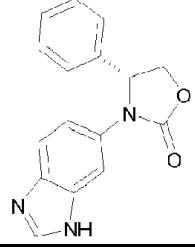
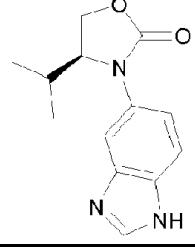
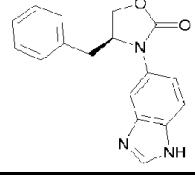
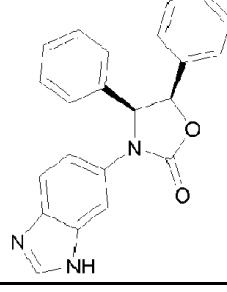
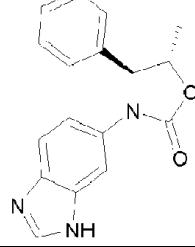
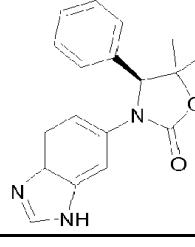
Nombre químico	Estructura
	
1-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-5-(3-clorofenil)imidazolidin-2-ona	
1-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-5-(2,6-diclorofenil)imidazolidin-2-ona	
1-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-5-(2,3-diclorofenil)imidazolidin-2-ona	
1-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-5-(3,4-diclorofenil)imidazolidin-2-ona	
(S)-1-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-5-(3,4-diclorofenil)imidazolidin-2-ona	
1-(1H-1,3-benzodiazol-5-il)-5-(4-bifenil)imidazolidin-2-ona	

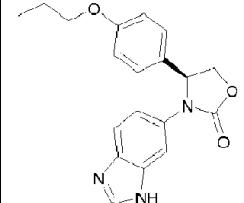
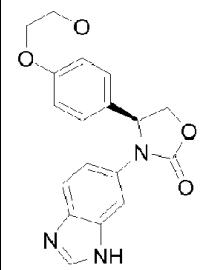
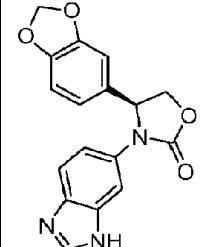
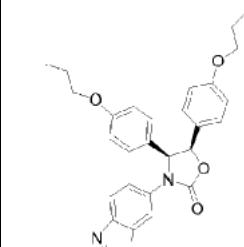
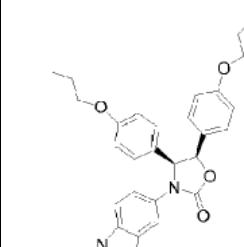
Nombre químico	Estructura
	
(S)-1-(1H-1,3-benzodiazol-5-il)-5-(4-bifenil)imidazolidin-2-ona	
(R)-1-(1H-1,3-benzodiazol-5-il)-5-(4-bifenil)imidazolidin-2-ona	
1-(1H-1,3-benzodiazol-5-il)-5-(3-fluoro-4-bifenil)imidazolidin-2-ona	
1-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-5-[4-(3-clorofenil)fenil]imidazolidin-2-ona	
1-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-5-(3',4'-dicloro-4-bifenil)imidazolidin-2-ona	
1-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-5-(3-fenilfenil)imidazolidin-2-ona	

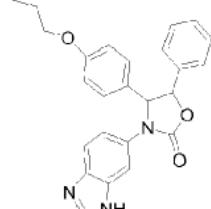
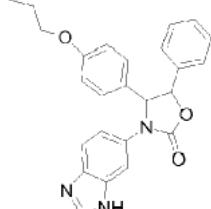
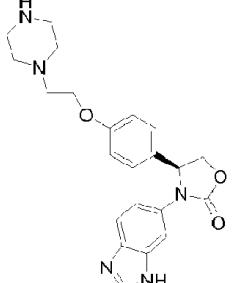
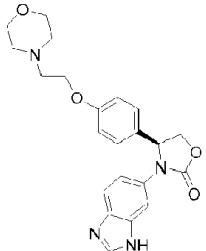
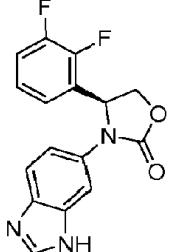
Nombre químico	Estructura
	
1-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-5-[3-(3-clorofenil)fenil]imidazolidin-2-ona	
1-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-5-(3-chloro-4-morfolinofenil)imidazolidin-2-ona	
1-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-5-(4-(4-fenilpiperazin-1-il)fenil)imidazolidin-2-ona	
1-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-5-(2-cloro-6-(4-ethylpiperazin-1-il)fenil)imidazolidin-2-ona	
1-(H-imidazo[1,2-a]piridin-7-il)-5-(4-propoxifenil)imidazolidin-2-ona	

Nombre químico	Estructura
5-(4-butoxifenil)-1-(H-imidazo[1,2-a]piridin-7-il)imidazolidin-2-ona	
5-(2,6-difluoro-4-metoxifenil)-1-(H-imidazo[1,2-a]piridin-7-il)imidazolidin-2-ona	
1-(H-imidazo[1,2-a]piridin-7-il)-5-(4-metoxibenzo[d][1,3]dioxol-6-il)imidazolidin-2-ona	
5-(4-(2-morfolinoetoxi)fenil)-1-(H-imidazo[1,2-a]piridin-7-il)imidazolidin-2-ona	
5-(2,6-difluorofenil)-1-(H-imidazo[1,2-a]piridin-7-il)imidazolidin-2-ona	
5-(bifenil)-1-(H-imidazo[1,2-a]piridin-7-il)imidazolidin-2-ona	
5-(3-fluorobifenil)-1-(H-imidazo[1,2-a]piridin-7-il)imidazolidin-2-ona	
1-(H-imidazo[1,2-a]piridin-7-il)-5-(4-(4-fenilpiperazin-1-il)fenil)imidazolidin-2-	

Nombre químico	Estructura
ona	
1-(1H-benzo[d]imidazol-5-yl)-5-phenylimidazolidin-4-ona	
1-(1H-benzo[d]imidazol-5-yl)-5-(2,3,5-trifluorofenil)imidazolidin-4-ona	
1-Amino-3-(1H-benzo[d]imidazol-5-yl)-4-(4-metoxifenil)imidazolidin-2-ona	
(S)-3-(1H-benzo[d]imidazol-6-yl)-4-phenyloxazolidin-2-ona	
(R)-3-(1H-benzo[d]imidazol-6-yl)-4-phenyloxazolidin-2-ona	

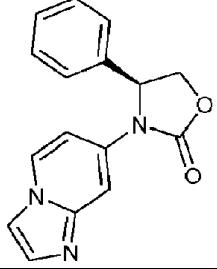
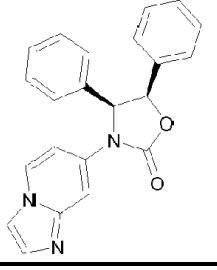
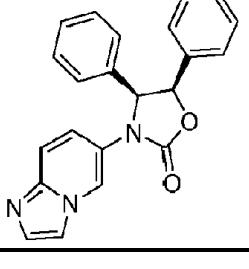
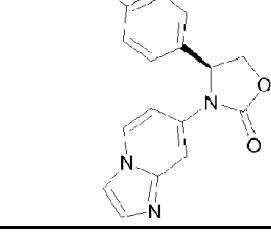
Nombre químico	Estructura
	
(S)-3-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-4-isopropiloxazolidin-2-ona	
(S)-3-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-4-benciloxazolidin-2-ona	
(4S,5R)-3-(1H-benzo[d]imidazol-6-il)-4,5-difeniloxazolidin-2-ona	
(4S,5S)-3-(1H-benzo[d]imidazol-6-il)-5-metil-4-feniloxazolidin-2-ona	
(S)-3-(1H-benzo[d]imidazol-6-il)-5,5-dimetil-4-feniloxazolidin-2-ona	
(S)-3-(1H-benzo[d]imidazol-6-il)-4-(4-propoxifenil)oxazolidin-2-ona	

Nombre químico	Estructura
	
(S)-3-(1H-benzo[d]imidazol-6-il)-4-(2,3-dihidrobenzo[b][1,4] dioxin-7-il)oxazolidin-2-ona	
(S)-4-(benzo[d][1,3]dioxol-6-il)-3-(1H-benzo[d]imidazol-6-il)oxazolidin-2-ona	
(4S,5R)-3-(1H-benzo[d]imidazol-6-il)-4,5-bis(4-propoxifenil)oxazolidin-2-ona	 <p>diastereómero 1</p>
(4S,5R)-3-(1H-benzo[d]imidazol-6-il)-4,5-bis(4-propoxifenil)oxazolidin-2-ona	 <p>diastereómero 2</p>
3-(1H-benzo[d]imidazol-6-il)-5-fenil-4-(4-propoxifenil)oxazolidin-2-ona	

Nombre químico	Estructura
	 <p>diaestereómero 1</p>
(1H-benzo[d]imidazol-6-il)-5-fenil-4-(4-propoxifenil)oxazolidin-2-ona	 <p>diaestereómero 2</p>
(S)-4-(4-(2-(piperazin-1-il)etoxi)fenil)-3-(1H-benzo[d]imidazol-6-il)oxazolidin-2-ona	
(S)-4-(4-(2-morfolinoetoxi)fenil)-3-(1H-benzo[d]imidazol-6-il)oxazolidin-2-ona	
(S)-3-(1H-benzo[d]imidazol-6-il)-4-(2,3-difluorofenil)oxazolidin-2-ona	
(S)-3-(1H-benzo[d]imidazol-6-il)-4-(3-fluorofenil)oxazolidin-2-ona	

Nombre químico	Estructura
(S)-3-(1H-benzo[d]imidazol-6-il)-4-(3-fluoro-5-(trifluorometil)fenil)oxazolidin-2-ona	
(S)-3-(1H-benzo[d]imidazol-6-il)-4-(3-clorofenil)oxazolidin-2-ona	
(S)-3-(1H-benzo[d]imidazol-6-il)-4-(4-clorofenil)oxazolidin-2-ona	
(S)-3-(1H-benzo[d]imidazol-6-il)-4-[4-(3-clorofenil)fenil]oxazolidin-2-ona	
(S)-3-(1H-benzo[d]imidazol-6-il)-4-[3-(3-clorofenil)fenil]oxazolidin-2-ona	
(S)-3-(1H-benzo[d]imidazol-6-il)-4-(4-(4-fenilpiperazin-1-il)fenil)oxazolidin-2-ona	

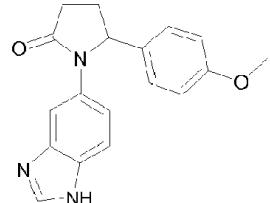
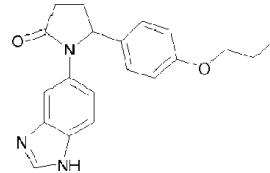
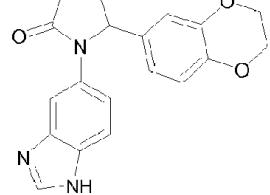
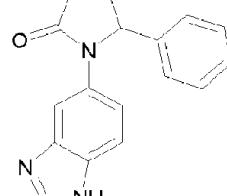
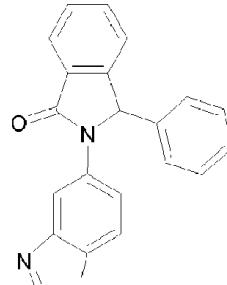
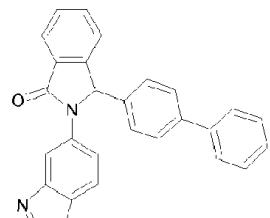
Nombre químico	Estructura
(S)-3-(1H-benzo[d]imidazol-6-il)-4-(4-(4-metilpiperazin-1-il)fenil)oxazolidin-2-ona	
(S)-3-(1H-benzo[d]imidazol-6-il)-4-(3-(4-fenilpiperazin-1-il)fenil)oxazolidin-2-ona	
(S)-3-(2-metil-1H-benzo[d]imidazol-6-il)-4-fenioxazolidin-2-ona	
(S)-4-(1H-benzo[d]imidazol-6-il)-5-(4-propoxifenil)morfolin-3-ona	
3-(1H-benzo[d]imidazol-6-il)-4-(4-propoxifenil)-1,3-oxazinan-2-ona	
(S)-3-(H-imidazo[1,2-a]piridin-7-il)-4-fenioxazolidin-2-ona	

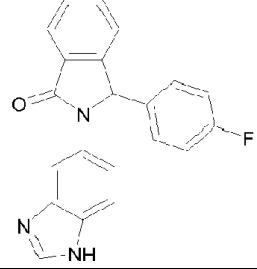
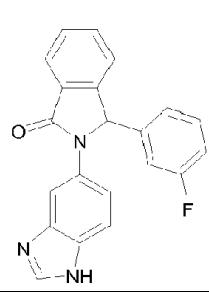
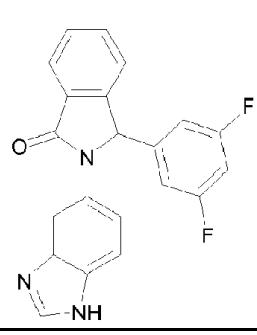
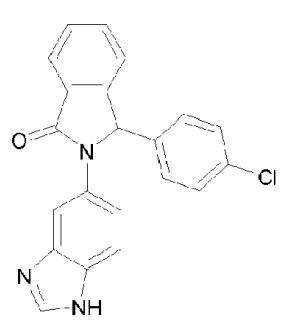
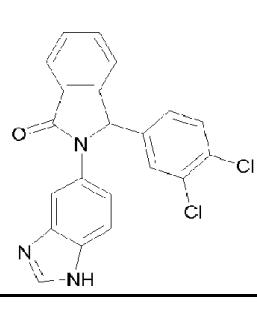
Nombre químico	Estructura
	
(4S,5R)-3-(H-imidazo[1,2-a]piridin-7-il)-4,5-difeniloxazolidin-2-ona	
(4S,5R)-3-(imidazo[1,2-a]piridin-6-il)-4,5-difeniloxazolidin-2-ona	
(S)-3-(H-imidazo[1,2-a]piridin-7-il)-4-(4-propoxifenil)oxazolidin-2-ona	
3-(imidazo[1,2-a]piridin-7-il)-4-(4-propoxifenil)-1,3-oxazinan-2-ona	

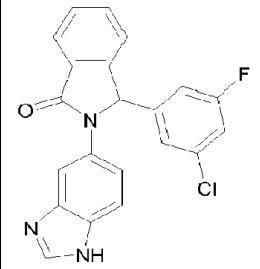
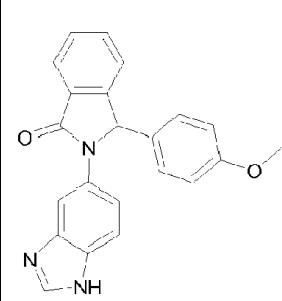
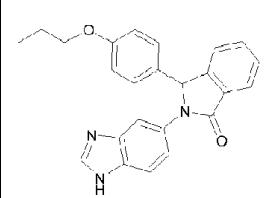
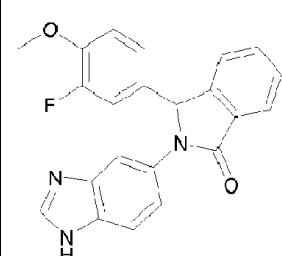
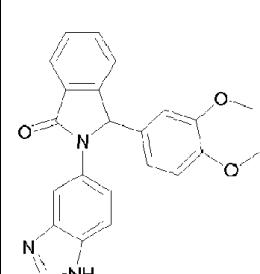
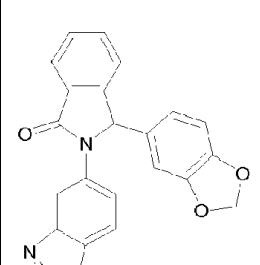
Nombre químico	Estructura
5-(2-fenilpirrolidin-1-il)-1H-benzo[d]imidazol	
5-(2-(4-metoxifenil)pirrolidin-1-il)-1H-benzo[d]imidazol	
5-(2-(4-fluorofenil)pirrolidin-1-il)-1H-benzo[d]imidazol	
5-(2-(4-clorofenil)pirrolidin-1-il)-1H-benzo[d]imidazol	
5-(2-bencilpirrolidin-1-il)-1H-benzo[d]imidazol	
5-(2-(4-clorobencil)pirrolidin-1-il)-1H-benzo[d]imidazol	
5-(2-(4-fluorobencil)pirrolidin-1-il)-1H-benzo[d]imidazol	

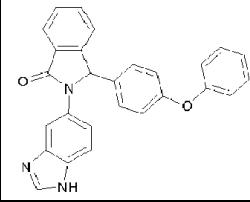
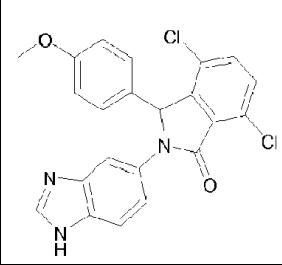
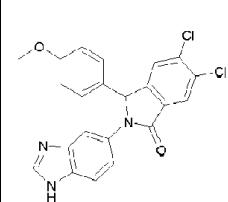
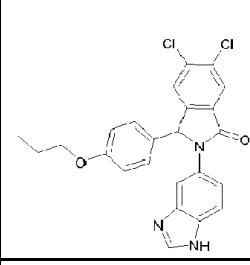
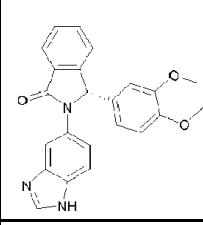
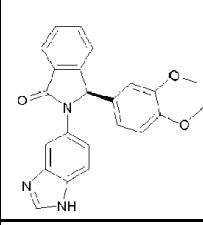
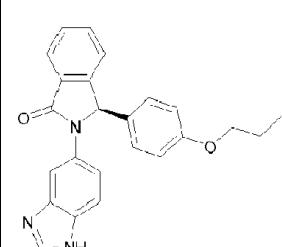
Nombre químico	Estructura
5-(pirrolidin-1-il)-1H-benzo[d]imidazol	
5-(2-(4-metoxibencil)pirrolidin-1-il)-1H-benzo[d]imidazol	
3-(1H-benzo[d]imidazol-6-il)-2-(4-clorofenil)tiazolidin-4-ona	
3-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-2-feniltiazolidin-4-ona	
3-(1H-benzo[d]imidazol-6-il)-2-(4-fluorofenil)tiazolidin-4-ona	
3-(1H-benzo[d]imidazol-6-il)-2-(naftalen-1-il)tiazolidin-4-ona	
3-(1H-benzo[d]imidazol-6-il)-2-(4-fenoxifenil)tiazolidin-4-ona	

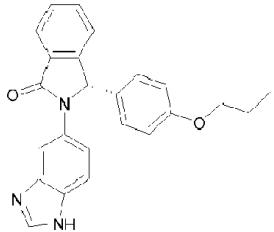
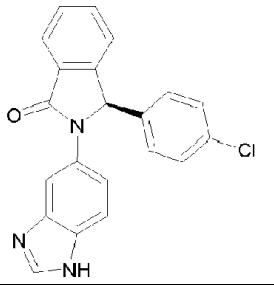
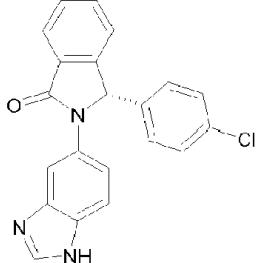
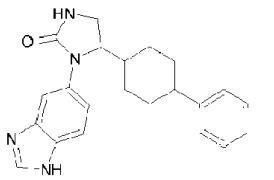
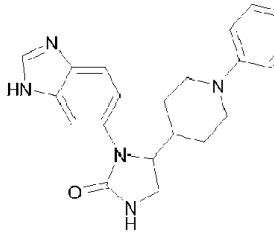
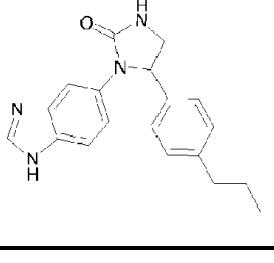
Nombre químico	Estructura
3-(1H-benzo[d]imidazol-6-il)-2-(2,6-difluorofenil)tiazolidin-4-ona	
3-(1H-benzo[d]imidazol-6-il)-2-(tiofen-3-il)tiazolidin-4-ona	
3-(1H-benzo[d]imidazol-6-il)-5-metil-2-feniltiazolidin-4-ona	
3-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-2-feniltiazolidina-4-tiona	
3-(1H-benzo[d]imidazol-6-il)-2-(4-fenoxifenil) tiazolidina-4-tiona	
1-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-5-(4-fluorofenil)pirrolidin-2-ona	

Nombre químico	Estructura
1-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-5-(4-metoxifenil)pirrolidin-2-ona	
1-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-5-(4-propoxifenil)pirrolidin-2-ona	
1-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-5-(2,3-dihidrobenzo[b][1,4]dioxin-6-il)pirrolidin-2-ona	
1-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-5-fenilpirrolidin-2-ona	
2-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-3-fenilisoindolin-1-ona	
2-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-3-(4-bifenil)isoindolin-1-ona	
2-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-3-(4-fluorofenil)isoindolin-1-ona	

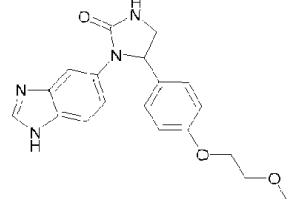
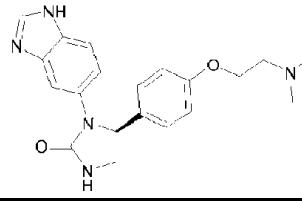
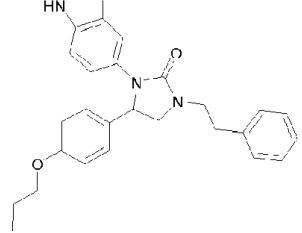
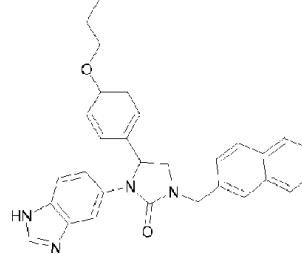
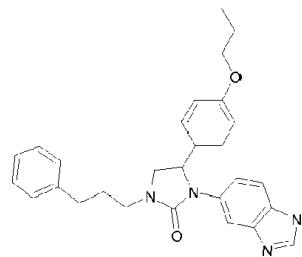
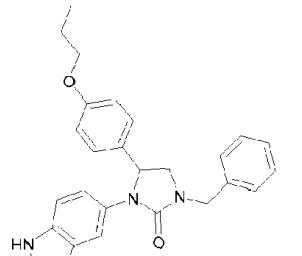
Nombre químico	Estructura
	
2-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-3-(3-fluorofenil)isoindolin-1-ona	
2-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-3-(3,5-difluorofenil)isoindolin-1-ona	
2-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-3-(4-clorofenil)isoindolin-1-ona	
2-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-3-(3,4-diclorofenil)isoindolin-1-ona	
2-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-3-(3-cloro-5-fluorofenil)isoindolin-1-ona	

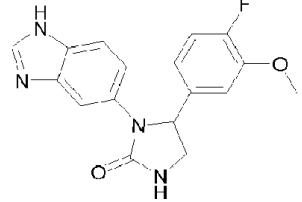
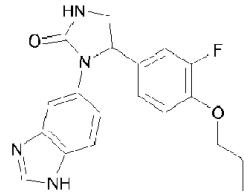
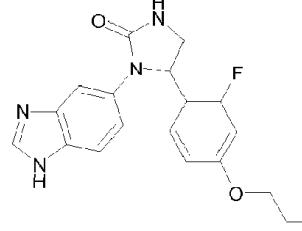
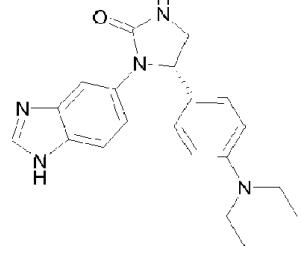
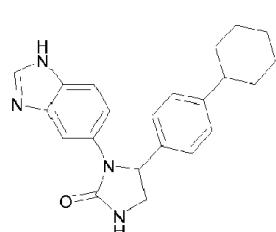
Nombre químico	Estructura
	
2-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-3-(4-metoxifenil)isoindolin-1-ona	
2-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-3-(4-propoxifenil)isoindolin-1-ona	
2-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-3-(3-fluoro-4-metoxifenil)isoindolin-1-ona	
2-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-3-(3,4-dimetoxifenil)isoindolin-1-ona	
3-(benzo[d][1,3]dioxol-6-il)-2-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)isoindolin-1-ona	
2-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-3-(4-fenoxifenil)isoindolin-1-ona	

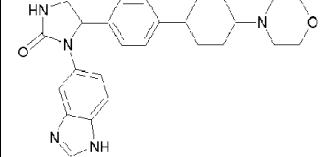
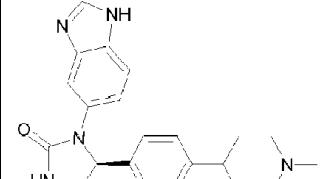
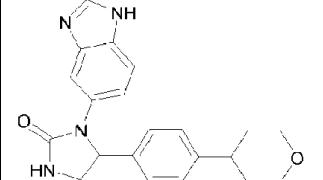
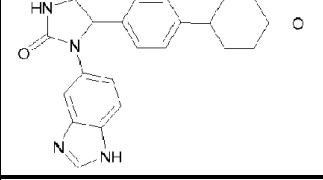
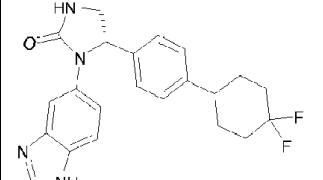
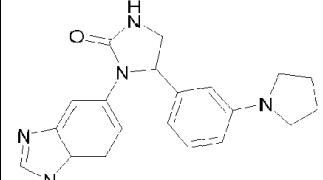
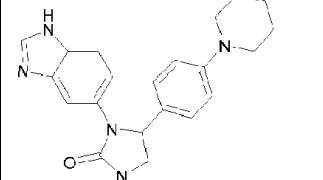
Nombre químico	Estructura
	
2-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-4,7-dicloro-3-(4-metoxifenil)isoindolin-1-ona	
2-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-5,6-dicloro-3-(4-metoxifenil)isoindolin-1-ona	
2-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-5,6-dicloro-3-(4-propoxifenil)isoindolin-1-ona	
(S)-2-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-3-(3,4-dimetoxifenil)isoindolin-1-ona	
(R)-2-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-3-(3,4-dimetoxifenil)isoindolin-1-ona	
(R)-2-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-3-(4-propoxifenil)isoindolin-1-ona	

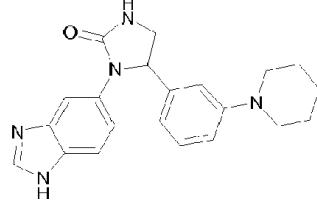
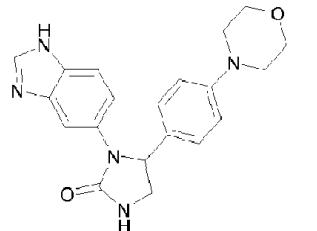
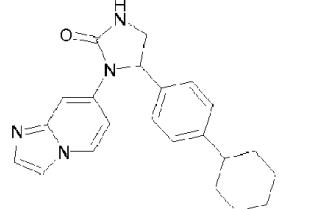
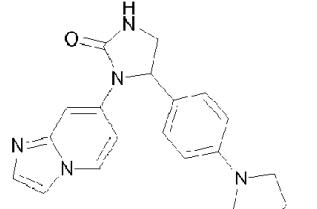
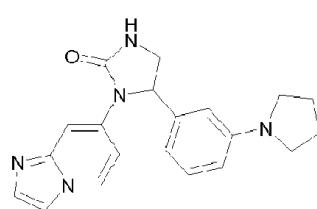
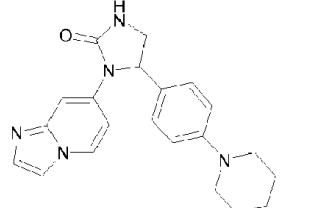
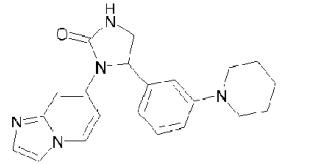
Nombre químico	Estructura
(S)-2-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-3-(4-propoxifenil)isoindolin-1-ona	
(R)-2-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-3-(4-clorofenil)isoindolin-1-ona	
(S)-2-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-3-(4-clorofenil)isoindolin-1-ona	
1-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-5-(4-fenilciclohexil)imidazolidin-2-ona	
1-(1H-benzo[d]imidazol-6-il)-5-(1-fenilpiperidin-4-il)imidazolidin-2-ona	
1-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-5-(4-(3-metoxipropil)fenil)imidazolidin-2-ona	
1-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-5-(4-hidroxifenil)imidazolidin-2-ona	

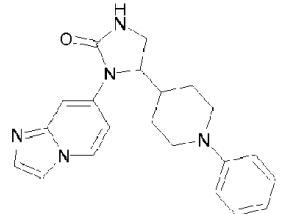
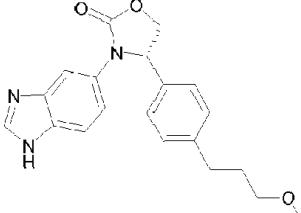
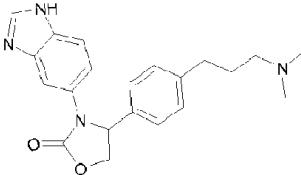
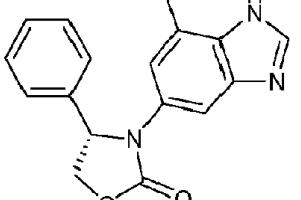
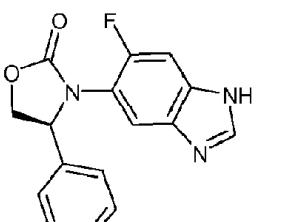
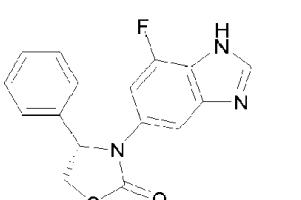
Nombre químico	Estructura
1-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-5-(2-hidroxifenil)imidazolidin-2-ona	
1-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-5-(3,4-dihidroxifenil)imidazolidin-2-ona	
1-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-5-(3-hidroxifenil)imidazolidin-2-ona	
1-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-5-(4-(ciclohexiloxi)fenil)imidazolidin-2-ona	
5-(4-(2-metoxietoxi)fenil)-1-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)imidazolidin-2-ona	

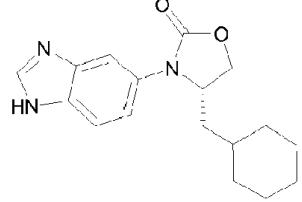
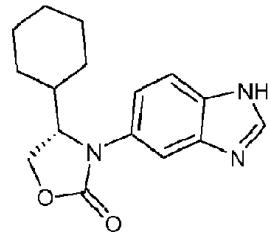
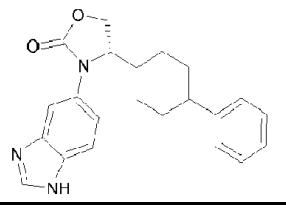
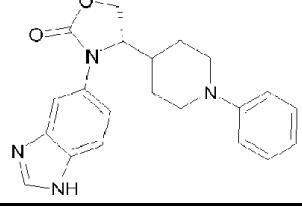
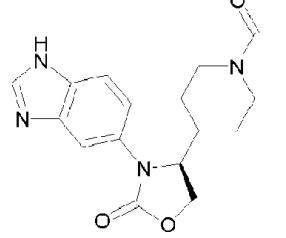
Nombre químico	Estructura
	
(S)-5-(4-(2-(dimethylamino)ethoxy)phenyl)-1-(1H-benzo[d]imidazol-5-yl)imidazolidin-2-one	
3-(1H-benzo[d]imidazol-5-yl)-1-fenetyl-4-(4-propoxifenil)imidazolidin-2-one	
3-(1H-benzo[d]imidazol-5-yl)-1-((naftalen-2-il)metil)-4-(4-propoxifenil)imidazolidin-2-one	
3-(1H-benzo[d]imidazol-5-yl)-1-(3-fenilpropil)-4-(4-propoxifenil)imidazolidin-2-one	
3-(1H-benzo[d]imidazol-5-yl)-1-bencil-4-(4-propoxifenil)imidazolidin-2-one	
1-(1H-benzo[d]imidazol-5-yl)-5-(4-fluoro-3-metoxifenil)imidazolidin-2-one	

Nombre químico	Estructura
	
1-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-5-(3-fluoro-4-propoxifenil)imidazolidin-2-ona	
1-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-5-(2-fluoro-4-propoxifenil)imidazolidin-2-ona	
(S)-1-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-5-(4-(diethylamino)fenil)imidazolidin-2-ona	
1-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-5-(4-ciclohexilfenil)imidazolidin-2-ona	
1-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-5-(4-(4-morfolinociclohexil)fenil)imidazolidin-2-ona	

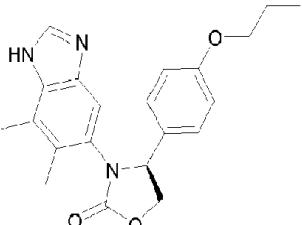
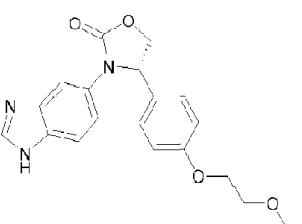
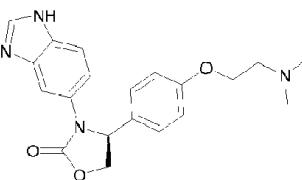
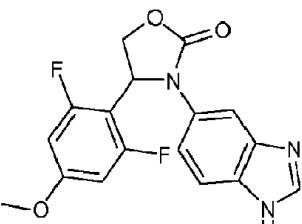
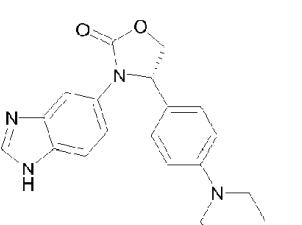
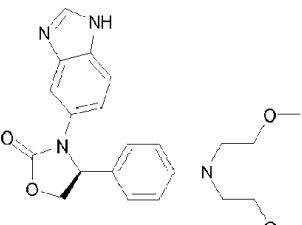
Nombre químico	Estructura
	
(S)-1-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-5-(4-(1-metilpiperidin-4-il)fenil)imidazolidin-2-ona	
1-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-5-(4-(tetrahidro-2H-piran-4-il)fenil)imidazolidin-2-ona	
1-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-5-(4-(4-oxociclohexil)fenil)imidazolidin-2-ona	
(S)-1-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-5-(4-(4,4-difluorociclohexil)fenil)imidazolidin-2-ona	
1-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-5-(3-(pirrolidin-1-il)fenil)imidazolidin-2-ona	
1-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-5-(4-(piperidin-1-il)fenil)imidazolidin-2-ona	
1-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-5-(3-(piperidin-1-il)fenil)imidazolidin-2-ona	

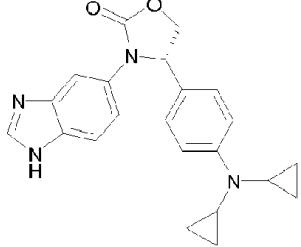
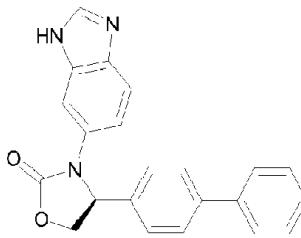
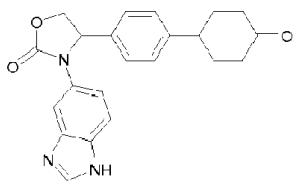
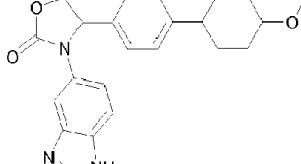
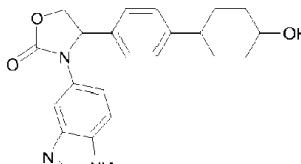
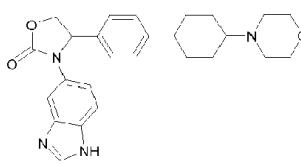
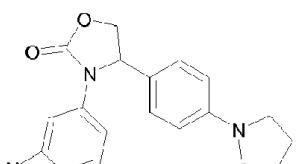
Nombre químico	Estructura
	
1-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-5-(4-morpholinofenil)imidazolidin-2-ona	
5-(4-ciclohexilfenil)-1-(H-imidazo[1,2-a]piridin-7-il)imidazolidin-2-ona	
1-(H-imidazo[1,2-a]piridin-7-il)-5-(4-(pirrolidin-1-il)fenil)imidazolidin-2-ona	
1-(H-imidazo[1,2-a]piridin-7-il)-5-(3-(pirrolidin-1-il)fenil)imidazolidin-2-ona	
1-(H-imidazo[1,2-a]piridin-7-il)-5-(4-(piperidin-1-il)fenil)imidazolidin-2-ona	
1-(H-imidazo[1,2-a]piridin-7-il)-5-(3-(piperidin-1-il)fenil)imidazolidin-2-ona	

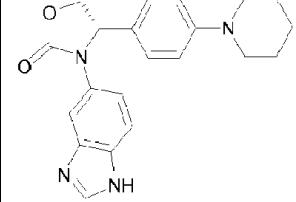
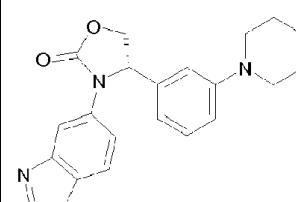
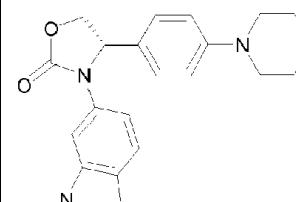
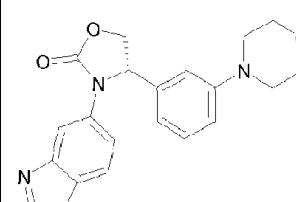
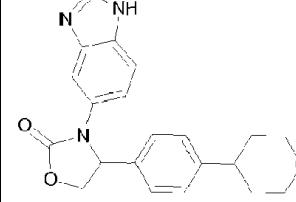
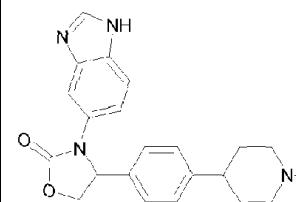
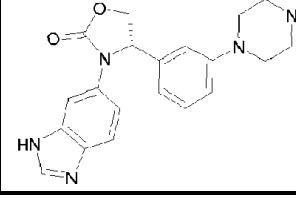
Nombre químico	Estructura
1-(1H-imidazo[1,2-a]piridin-7-il)-5-(1-fenilpiperidin-4-il)imidazolidin-2-ona	
(S)-3-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-4-(4-(3-metoxipropil)fenil)oxazolidin-2-ona	
3-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-4-(4-(3-(dimetilamino)propil)fenil)oxazolidin-2-ona	
(S)-3-(7-metil-1H-benzo[d]imidazol-5-il)-4-feniloxazolidin-2-ona	
(S)-3-(6-fluoro-1H-benzo[d]imidazol-5-il)-4-feniloxazolidin-2-ona	
(S)-3-(7-fluoro-1H-benzo[d]imidazol-5-il)-4-feniloxazolidin-2-ona	
(S)-3-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-4-(ciclohexilmetil)oxazolidin-2-ona	

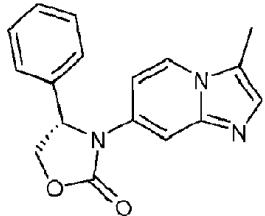
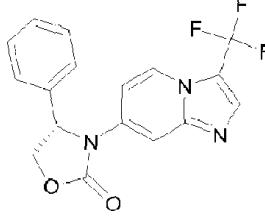
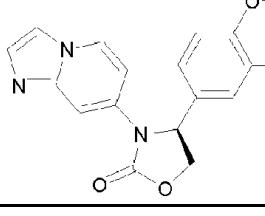
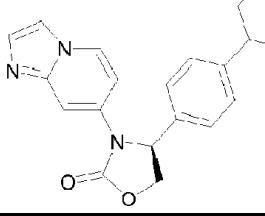
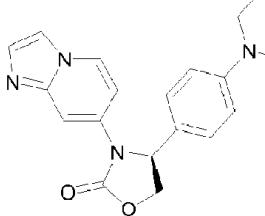
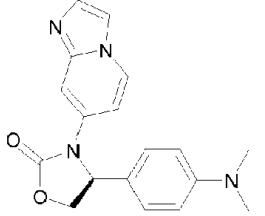
Nombre químico	Estructura
	
(S)-3-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-4-ciclohexiloxazolidin-2-ona	
(S)-3-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-4-(4-fenilciclohexil)oxazolidin-2-ona	
(S)-3-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-4-(1-fenilpiperidin-4-il)oxazolidin-2-ona	
3-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-4-(1-feniletil)oxazolidin-2-ona	
(S)-4-(4-propoxibencil)-3-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)oxazolidin-2-ona	

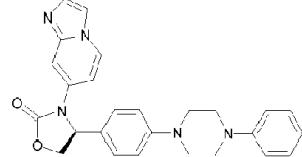
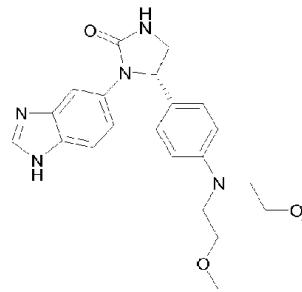
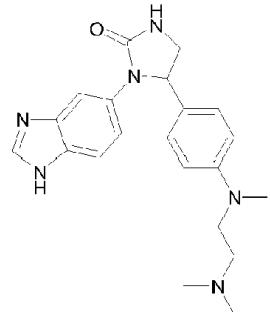
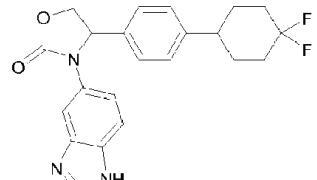
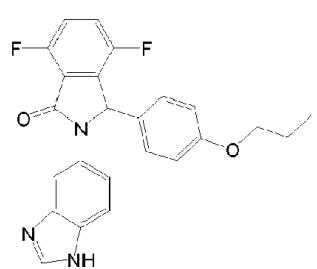
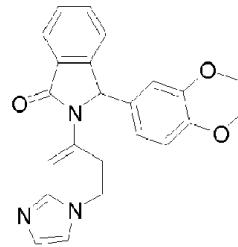
Nombre químico	Estructura
(S)-4-(4-isopropoxibencil)-3-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)oxazolidin-2-ona	
(S)-4-(4-(ciclohexiloxi)bencil)-3-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)oxazolidin-2-ona	
4-(4-morfolinobencil)-3-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)oxazolidin-2-ona	
(S)-3-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-4-fenetiloazolidin-2-ona	
3-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-4-(4-(ciclohexiloxi)fenil)oxazolidin-2-ona	
(S)-3-(7-metil-1H-benzo[d]imidazol-5-il)-4-(4-propoxifenil)oxazolidin-2-ona	
(S)-3-(6,7-dimetil-1H-benzo[d]imidazol-5-il)-4-(4-propoxifenil)oxazolidin-2-ona	

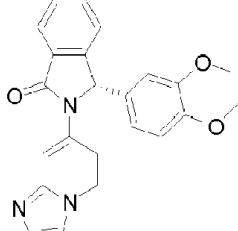
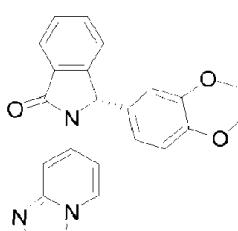
Nombre químico	Estructura
ona	
(S)-4-(4-(2-metoxietoxi)fenil)-3-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)oxazolidin-2-ona	
(S)-4-(4-(2-(dimetilamino)etoxi)fenil)-3-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)oxazolidin-2-ona	
3-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-4-(2,6-difluoro-4-metoxifenil)oxazolidin-2-ona	
(S)-3-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-4-(4-(dietilamino)fenil)oxazolidin-2-ona	
(S)-3-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-4-(4-(bis(2-metoxietil)amino)fenil)oxazolidin-2-ona	
(S)-3-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-4-(4-(diciclopropilamino)fenil)oxazolidin-2-ona	

Nombre químico	Estructura
	
(S)-3-(1H-benzo[d]imidazol-6-il)-4-(bifenil-4-il)oxazolidin-2-ona	
3-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-4-(4-(4-oxociclohexil)fenil)oxazolidin-2-ona	
3-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-4-(4-(4-metoxiciclohexil)fenil)oxazolidin-2-ona	
3-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-4-(4-(4-hidroxiciclohexil)fenil)oxazolidin-2-ona	
3-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-4-(4-(4-morfolinociclohexil)fenil)oxazolidin-2-ona	
3-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-4-(4-(pirrolidin-1-il)fenil)oxazolidin-2-ona	
(S)-3-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-4-(4-(piperidin-1-il)fenil)oxazolidin-2-ona	

Nombre químico	Estructura
	
(S)-3-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-4-(3-(piperidin-1-il)fenil)oxazolidin-2-ona	
(S)-3-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-4-(4-morfolinofenil)oxazolidin-2-ona	
(S)-3-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-4-(3-morfolinofenil)oxazolidin-2-ona	
3-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-4-(4-(tetrahidro-2H-piran-4-il)fenil)oxazolidin-2-ona	
3-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-4-(4-(1-metilpiperidin-4-il)fenil)oxazolidin-2-ona	
(S)-3-(1H-benzo[d]imidazol-6-il)-4-(3-(4-metilpiperazin-1-il)fenil)oxazolidin-2-ona	

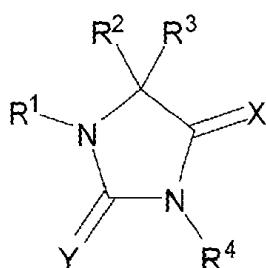
Nombre químico	Estructura
(S)-3-(3-metilH-imidazo[1,2-a]piridin-7-il)-4-feniloxazol i di n-2-ona	
(S)-3-(3-(trifluorometil)H-imidazo[1,2-a]piridin-7-il)-4-feniloxazolidin-2-ona	
(S)-4-(2,3-dihidrobenzo[b][1,4] dioxin-6-il)-3-(H-imidazo[1,2-a]piridin-7-il)oxazolidin-2-ona	
(S)-4-(4-ciclohexilfenil)-3-(H-imidazo[1,2-a]piridin-7-il)oxazolidin-2-ona	
(S)-3-(H-imidazo[1,2-a]piridin-7-il)-4-(4-(piperidin-1-il)fenil)oxazolidin-2-ona	
(S)-3-(H-imidazo[1,2-a]piridin-7-il)-4-(4-(4-morfolinofenil)oxazolidin-2-ona	
(S)-3-(H-imidazo[1,2-a]piridin-7-il)-4-(4-(4-fenilpiperazin-1-il)fenil)oxazolidin-2-ona	

Nombre químico	Estructura
	
(S)-1-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-5-(4-(bis(2-metoxietil)amino)fenil)imidazolidin-2-ona	
5-(4-(N-(2-(dimetilamino)ethyl)-N-metilamino)fenil)-1-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)imidazolidin-2-ona	
3-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-4-(4-(4,4-difluorociclohexil)fenil)oxazolidin-2-ona	
2-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-4,7-difluoro-3-(4-propoxifenil)isoindolin-1-ona	
2-(H-imidazo[1,2-a]piridin-7-il)-3-(3,4-dimetoxifenil)isoindolin-1-ona	
(S)-2-(H-imidazo[1,2-a]piridin-7-il)-3-(3,4-dimetoxifenil)isoindolin-1-ona	

Nombre químico	Estructura
	
(S)-3-(3,4-dimetoxifenil)-2-(3-metilH-imidazo[1,2-a]piridin-7-il)isoindolin-1-ona	

11. Compuestos inhibidores de QPCT y QPCTL como se describe en WO2008128983 y EP2160380

En algunas formas de realización, el principio activo es un inhibidor de QPCT y/o QPCTL como se describe en US8889709B2. En algunas formas de realización, el principio activo es un compuesto que tiene la fórmula (VIII) 5 siguiente, o una de sus sales, solvatos, polimorfos, tautómeros o estereoisómeros aceptables desde el punto de vista farmacéutico:



Fórmula (VIII)

donde:

- 10 R¹ representa carbocicilheteroarilo de -C₃₋₈, alquenilheteroarilo de -C₂₋₆, alquilheteroarilo de -C₁₋₆, o heteroarilo de (CH₂)_aRC⁵R⁶(CH₂)_b; donde a y b representan independientemente los números enteros 0-5 siempre que a+b=0-5; y R⁵ y R⁶ son alqueno que, junto con el carbono al que están unidos, forman un grupo cicloalquilo de C_{3-C₅}, o un grupo heteroarilo bicíclico;
- 15 donde cualquiera de dichos grupos heteroarilo está opcionalmente sustituido con uno o más grupos seleccionados de alquilo de C₁₋₆, alquenilo de C₂₋₆, alquinilo de C₂₋₆, haloalquilo de C₁₋₆, tioalquilo de -C₁₋₆, -SO-alquilo de C₁₋₄, -SO₂-alquilo de C₁₋₄, alcoxi de -C₁₋₆, -O-cicloalquilo de C₃₋₈, cicloalquilo de C₃₋₈, -SO₂-cicloalquilo de C₃₋₈, -SO-cicloalquilo de C₁₃₋₆, alqueniloxi de -C₃₋₆, alquiniloxi de C₃₋₆, -C(O)-alquilo de C₁₋₆, -C(O)O-alquilo de C₁₋₆, alcoxi de C₁₋₆- alquilo de C₁₋₆, nitro, halógeno, ciano, hidroxilo, -C(O)OH, -NH₂, NH-alquilo de C₁₋₄, -N(alquilo de C₁₋₄)(alquilo de C₁₋₄), -C(O)N(alquilo de C₁₋₄)(alquilo de C₁₋₄), -C(O)NH₂, -C(O)NH(alquilo de C₁₋₄) y -C(O)NH(cicloalquilo de C₃₋₁₀) y cualquiera de dichos grupos carbociclico está opcionalmente sustituido con uno o más grupos seleccionados de alquilo de C₁₋₄, oxo, halógeno y alcoxi de C₁₋₄;
- 20 R² y R³ son uno de (i), (ii), (iii), (iv) o (v) definidos de la siguiente manera:
- 25 (i)

R^2 representa alquilo de C_{1-8} , arilo, heteroarilo, carbociclico, heterociclico, alquilarilo de $-C_{1-4}$, alquilheteroarilo de $-C_{1-4}$, alquilcarbociclico de $-C_{1-4}$ o alquilheterociclico de $-C_{1-4}$; donde cualquiera de dichos grupos arilo y heteroarilo está opcionalmente sustituido con uno o más grupos seleccionados de alquilo de C_{1-6} , alquenilo de C_{2-6} , alquinilo de C_{2-6} , haloalquilo de C_{1-6} , hioalquilo de $-C_{1-6}$, $-SO-$ alquilo de C_{1-4} , $-SO_2-$ alquilo de C_{1-4} , alcoxi de C_{1-6} , $-O-$ cicloalquilo de C_{3-3} , cicloalquilo de C_{3-8} , $-SO_2-$ cicloalquilo de C_{3-8} , $-SO-$ cicloalquilo de C_{13-6} , alqueniloxi de C_{3-6} , alquiniloxi de C_{3-6} , $-C(O)-$ alquilo de C_{1-6} , $-C(O)O-$ alquilo de C_{1-6} , alcoxi de C_{1-6} - alquilo de C_{1-6} , nitro, halógeno, ciano, hidroxilo, $-C(O)OH$, $-NH_2$, NH-alquilo de C_{1-4} , $-N(alquilo\ de\ C_{1-4})(alquilo\ de\ C_{1-4})$, $-C(O)N(alquilo\ de\ C_{1-4})$ (alquilo de C_{1-4}), $-C(O)NH_2$, $-C(O)NH(alquilo\ de\ C_{1-4})$ y $-C(O)NH(cicloalquilo\ de\ C_{3-10})$; y cualquiera de los grupos carbociclico y heterociclico mencionados anteriormente opcionalmente sustituido con uno o más grupos seleccionados de alquilo de C_{1-4} , oxo, halógeno y alcoxi de C_{1-4} ; y R^3 representa H, alquilo de $-C_{1-4}$ o arilo con dicho arilo opcionalmente sustituido con uno o más grupos seleccionados de alquilo de C_{1-6} , alquenilo de C_{2-6} , alquinilo de C_{2-6} , haloalquilo de C_{1-6} , tioalquilo de $-C_{1-6}$, $-SO-$ alquilo de C_{11-4} , $-SO_2-$ alquilo de C_{1-4} , alcoxi de C_{1-6} , $-O-$ cicloalquilo de C_{3-8} , cicloalquilo de C_{3-8} , $-SO_2-$ cicloalquilo de C_{3-8} , $-SO-$ cicloalquilo de C_{13-3} , alqueniloxi de C_{3-3} , alquiniloxi C_{3-6} , $-C(O)-$ alquilo de C_{1-6} , alquilo de $-(O)OC_{1-6}$, alcoxi de C_{1-6} - alquilo de C_{1-6} , nitro, halógeno, ciano, hidroxilo, $-C(O)OH$, $-NH_2$, NH-alquilo de C_{1-4} , $-N(alquilo\ de\ C_{1-4})(alquilo\ de\ C_{1-4})$, $-C(O)N(alquilo\ de\ C_{1-4})(alquilo\ de\ C_{1-4})$, $-C(O)NH_2$, $-C(O)NH(alquilo\ de\ C_{1-4})$ y $-C(O)N H$ (cicloalquilo de C_{3-10});

(ii)

R² representa fenilo sustituido por fenilo, fenilo sustituido por un grupo heteroarilo monocíclico, fenilo sustituido por benciloxi, fenilo fusionado con carbociclico, fenilo fusionado con heterociclico, alquilo de -C₁₋₄ (fenilo sustituido por fenilo), alquilo de -C₁₋₄ (fenilo sustituido por un grupo heteroarilo monocíclico), alquilo de -C₁₋₄ (fenilo sustituido por benciloxi), alquilo de -C₁₋₄ (fenilo opcionalmente sustituido condensado con carbociclico opcionalmente sustituido o alquilo de -C₁₋₄ (fenilo opcionalmente sustituido condensado con heterociclico opcionalmente sustituido);

30 donde cualquiera de dichos grupos fenilo, benciloxi y heteroarilo está opcionalmente sustituido con uno o más grupos seleccionados de alquilo de C_{1-4} , halógeno y alcoxi de C_{1-4} ; y cualquiera de dichos grupos carbociclico y heterociclico opcionalmente sustituido con uno o más grupos seleccionados de alquilo de oxo de C_{1-4} , halógeno y alcoxi de C_{1-4} ; y

35 R³ representa H, -alquilo de C₁₋₄ o arilo con dicho arilo opcionalmente sustituido con uno o más grupos seleccionados de alquilo de C₁₋₆, alquenilo de C₂₋₆, alquinilo de C₂₋₆, haloalquilo de C₁₋₆, tioalquilo de -C₁₋₆, -SO-alquilo de C₁₁₋₄, -SO₂-alquilo de C₁₋₄, alcoxi de C₁₋₆, -O-cicloalquilo de C₃₋₈, cicloalquilo de C₃₋₈, -SO₂-cicloalquilo de C₃₋₈, -SO-cicloalquilo de C₁₃₋₃, alqueniloxi de C₃₋₃, alquiniloxi C₃₋₆, -C(O)-alquilo de C₁₋₆, alquilo de -(O)OC₁₋₆, alcoxi de C₁₋₆- alquilo de C₁₋₆, nitro, halógeno, ciano, hidroxilo, -C(O)OH, -NH₂, NH-alquilo de C₁₋₄, -N(alquilo de C₁₋₄)(alquilo de C₁₋₄), -C(O)N(alquilo de C₁₋₄)(alquilo de C₁₋₄), -C(O)NH₂, -C(O)NH(alquilo de C₁₋₄) y -C(O) N H (cicloalquilo de C₃₋₁₀);

40

(iii) R^2 y R^3 se unen para formar un anillo carbociclico que está opcionalmente sustituido por uno o más grupos alquilo de C_{1-2} ;

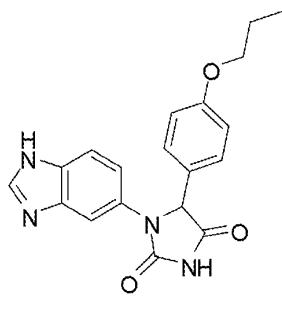
45 R² y R³ se unen para formar un anillo de carbociclico que se fusiona con fenilo, con dicho carbociclico o fenilo opcionalmente sustituido con uno o más grupos seleccionados de alquilo de C₁₋₄, halógeno y alcoxi de C₁₋₄;

50 R^2 y R^3 se unen para formar un anillo de carbociclico que se fusiona con heteroarilo monocíclico con dicho carbociclico o heteroarilo opcionalmente sustituido con uno o más grupos seleccionados de alquilo de C_{1-4} , halógeno y alcoxi de C_{1-4} ; R^4 representa H, alquilo de $-C_{1-8}$, $-C(O)-$ alquilo de C_{1-6} , o $-NH_2$; X representa O o S; y Y representa O o S.

55 En algunas formas de realización, el principio activo es un inhibidor de QPCT y/o QPCTL como se describe en la Tabla 3 de US8889709B2, por ejemplo el compuesto 6 como se muestra a continuación.

12. Compuestos inhibidores de QPCT y QPCTL analizados en este documento

En algunas formas de realización, el principio activo es un inhibidor de QPCT y/o QPCTL como se analiza en el presente documento, que incluye una sal, solvato, polimero, tautómero o estereoisómero de este aceptable desde el punto de vista farmacéutico, donde dicho inhibidor de QPCT y/o QPCTL se selecciona de la Tabla E siguiente:



5

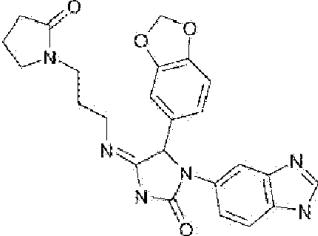
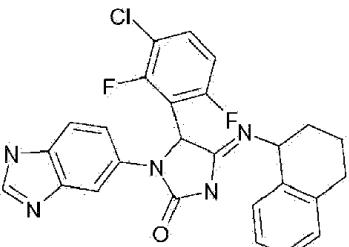
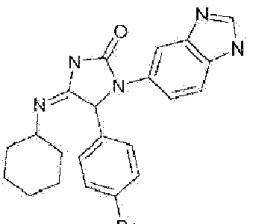
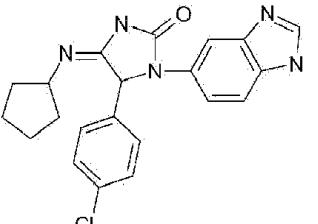
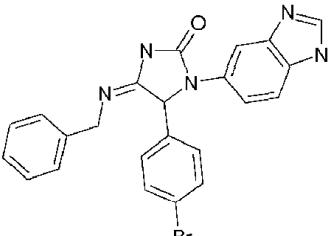
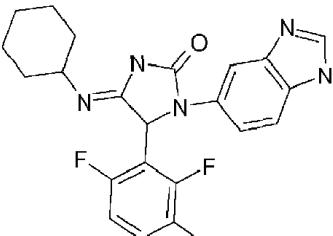
Tabla E. Compuestos analizados (véanse las Figuras 19-14)

Identificación del compuesto	Grupo	Nombre	Estructura
000051	Grupo 1	1-(1H-Benzimidazol-5-il)-5-benzo[c][1,2,5]tiadiazol-5-il-4-ciclopropanocarbonil-3-hidroxi-1,5-dihidro-pirrol-2-ona	
000054	Grupo 1	1-(1H-Benzimidazol-5-il)-3-hidroxi-4-fenil-5-quinolin-3-il-1,5-dihidro-pirrol-2-ona	
000016	Grupo 1	1-(1H-benzo[d]imidazol-6-il)-5-(2,3-difluorofenil)-3-hidroxi-4-metil-1H-pirrol-2(5H)-ona	
000034	Grupo 1	1-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-5-(2,3-diclorofenil)-3-hidroxi-4-metil-1H-pirrol-2(5H)-ona	

Identificación del compuesto	Grupo	Nombre	Estructura
000035	Grupo 1	1-(1H-Benzimidazol-5-il)-3-hidroxi-5-(8-hidroxi-quinolin-2-il)-4-(3-metil-butiril)-1,5-dihidro-pirrol-2-ona	
000037	Grupo 1	1-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-4-(ciclopropanocarbonil)-3-hidroxi-5-(8-hidroxi-quinolin-2-il)-1,5-dihidro-2H-pirrol-2-ona	
000055	Grupo 1	1-(1H-Benzimidazol-5-il)-3-hidroxi-4-fenil-5-(2,3,5-trifluoro-fenil)-1,5-dihidro-pirrol-2-ona	
000024	Grupo 2	1-(1H-Benzo[d]imidazol-6-il)-5-(2,3-difluorofenil)-3-metoxi-4-metil-1H-pirrol-2(5H)-ona	
000027	Grupo 2	1-(1H-Benzo[d]imidazol-6-il)-5-(2,3-diclorofenil)-3-metoxi-4-metil-1H-pirrol-2(5H)-ona	

Identificación del compuesto	Grupo	Nombre	Estructura
000050	Grupo 2	1-(1H-Benzo[d]imidazol-6-il)-5-(4-ciclohexilfenil)-3-metoxi-4-metil-1H-pirrol-2(5H)-ona	
000020	Grupo 4	5-(benzo[c][1,2,5]tiadiazol-6-il)-1-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)imidazolidin-2,4-diona	
000021	Grupo 4	5-fenil-1-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)imidazolidin-2,4-diona	
000022	Grupo 4	1-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-5-(2-bromo-5-fluorofenil)imidazolidin-2,4-diona	
000023	Grupo 4	1-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-5-(4-propoxifenil)imidazolidin-2,4-diona	

Identificación del compuesto	Grupo	Nombre	Estructura
000025	Grupo 4	1-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-5-(3-hidroxi-4-metoxifenil)imidazolidin-2,4-diona	
000010	Grupo 4	1-(1H-bencimidazol-5-il)-5-(1,1'-bifenil-4-il)imidazolidin-2,4-diona	
000026	Grupo 4	1-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-5-(3-clorofenil)imidazolidin-2,4-diona	
000011	Grupo 4	1-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-5-(2,3-dihidrobenzo[b][1,4]dioxin-7-il)imidazolidin-2,4-diona	
000036	Grupo 4	1-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-5-(2-clorofenil)imidazolidin-2,4-diona	
000029	Grupo 5	1-(1H-Benzimidazol-5-il)-4-bencilimino-5-(4-clorofenil)-imidazolidin-2-ona	
000048	Grupo 5	5-benzo[1,3]dioxol-5-il-1-(1H-benzoimidazol-5-il)-4-(3-(2-oxopirrolidin-1-il)-propilimino)-	

Identificación del compuesto	Grupo	Nombre	Estructura
		imidazolidin-2-ona	
000049	Grupo 5	1-(1H-Benzimidazol-5-il)-5-(3-cloro-2,6-difluoro-fenil)-4-(1,2,3,4-tetrahidro-naftalen-1-ilimino)-imidazolidin-2-ona	
000012	Grupo 5	1-(1H-Benzimidazol-5-il)-5-(4-bromo-fenil)-4-(ciclohexilimino)-imidazolidin-2-ona	
000030	Grupo 5	1-(1H-Benzimidazol-5-il)-5-(4-cloro-fenil)-4-(ciclopentilimino)-imidazolidin-2-ona	
000031	Grupo 5	1-(1H-Benzimidazol-5-il)-4-bencilimino-5-(4-bromo-fenil)-imidazolidin-2-ona	
000013	Grupo 5	1-(1H-Benzimidazol-5-il)-5-(3-cloro-2,6-difluoro-fenil)-4-(ciclohexilimino)-imidazolidin-2-ona	

Identificación del compuesto	Grupo	Nombre	Estructura
000014	Grupo 5	1-(1H-Benzimidazol-5-il)-4-(ciclopentilimino)-5-(1H-indol-5-il)-imidazolidin-2-ona	
000032	Grupo 5	1-(1H-Benzimidazol-5-il)-5-(3-cloro-2,6-difluoro-fenil)-4-(1,2,2-trimetil-propilimino)-imidazolidin-2-ona	
000052	Grupo 5	1-(1H-Benzimidazol-5-il)-5-(4-bromo-fenil)-4-[2,3-dihidro-benzo[1,4]dioxin-6-ilimino]-imidazolidin-2-ona	
000053	Grupo 5	(R,S)-1-(1H-Benzimidazol-5-il)-5-(4-bromo-fenil)-4-((S)-indan-1-ilimino)-imidazolidin-2-ona	
000060	Grupo 7	5-(4-propoxifenil)-1-(H-imidazo[1,2-a]-piridin-7-il)imidazolidin-2-ona, enantiómero único de configuración desconocida	
000064	Grupo 7	(S)-3-(1H-benzo[d]imidazol-6-il)-4-(4-propoxifenil)oxazolidin-2-ona	

Identificación del compuesto	Grupo	Nombre	Estructura
000044	Grupo 7	2-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-3-(3,4-dimetoxifenil)isoindolin-1-ona, enantiómero único de configuración desconocida	
000066	Grupo 7	2-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-3-(4-propoxi fenil)isoindolin-1-ona, enantiómero único de configuración desconocida	

Cotratamiento

[0111] En algunas formas de realización, los principios activos descritos en este documento se pueden usar en combinación con un segundo principio activo para tratar las afecciones descritas en este documento. En algunas formas de realización, el segundo principio activo se usa en el tratamiento del cáncer. En algunas formas de

5 realización, el segundo principio activo es un anticuerpo terapéutico (por ejemplo, un anticuerpo que es una IgA). En algunas formas de realización, el segundo anticuerpo terapéutico es un anticuerpo anti-CD47 (por ejemplo, Hu5F9-G4, CC-90002), un anticuerpo anti-CD20 (por ejemplo, Rituximab), un anticuerpo anti-PD-L1 (atezolizumab), un anticuerpo anti-Her2 (por ejemplo, trastuzumab), anticuerpo anti-EGFR (por ejemplo, cetuximab), un anticuerpo biespecífico anti-CD20-CD47 (Piccione et al (2015), mAbs, vol. 7, pp 946-956), un 10 anticuerpo anti-CD56 (Weiskoff et al (2016), Journal of Clinical Investigation, Vol. 126, pp 2610-2620), un anticuerpo anti-CD271-esporina (Ngo et al (2016) Cell Reports, vol. 16, pp 1701-1716), y el segundo anticuerpo terapéutico es un anticuerpo anti-SIRPa (por ejemplo, OSE-172 de Ose Immunotherapeutics, Nantes, Francia). En algunas formas de realización, el segundo principio activo es un anticuerpo que es una IgA.

15 [0112] En algunas formas de realización, los métodos que se dan a conocer en este documento comprenden además proporcionar al sujeto un inhibidor de CD47 (por ejemplo, un anticuerpo IgA anti-CD47), o un inhibidor de SIRPa (por ejemplo, un anticuerpo IgA anti-SIRPa), o un principio activo seleccionado de entre los grupos de anticuerpos anti-CD20, anticuerpos anti-PD-L1, anticuerpos anti-Her2, anticuerpos anti-EGFR, anticuerpos biespecíficos anti-CD20-CD47, anticuerpos anti-CD56, anticuerpos biespecíficos anti-TRP-1-PD-L1 y anticuerpo 20 anti-CD271-esporina. Los ejemplos no limitantes de dichos principios activos son como se describen en este documento.

25 [0113] En algunas formas de realización, el inhibidor de CD47 (por ejemplo, anticuerpo IgA anti-CD47) es un inhibidor que se une a CD47 en la superficie de una célula y, por lo tanto, reduce la unión de CD47 a SIRPa en la superficie de otra célula.

30 [0114] En algunas formas de realización, el inhibidor de SIRPa (por ejemplo, anticuerpo anti-SIRPa) es un inhibidor que se une a SIRPa en la superficie de una célula y, por lo tanto, reduce la unión de SIRPa a CD47 en la superficie de otra célula.

35 [0115] En alguna realización, el principio activo es un anticuerpo anti-PD-L1 (por ejemplo, Atezolizumab, Genentech, Durvalumab, MedImmune).

40 [0116] En algunas formas de realización, el inhibidor de CD47 es cualquier inhibidor de CD47 (por ejemplo, anticuerpo IgA anti-CD47) que es capaz de unirse a la CD47 expresada en la superficie de una célula (por ejemplo, célula cancerosa) para reducir la unión de CD47 a SIRPa expresada en la superficie de otra célula (por ejemplo, macrófagos), como el inhibidor de CD47 como se da a conocer en el presente documento, preferiblemente un anticuerpo anti-CD47 (por ejemplo, CC-90002 Celgene; Hu5F9-G4, Forty Seven Inc, y la proteína de fusión SIRPa-FC TTI-621, Trillium Therapeutics Inc, etc.).

5 [0117] En algunas formas de realización, el inhibidor de SIRPa es cualquier inhibidor de SIRPa que sea capaz de unirse a SIRPa expresada en la superficie de una célula (por ejemplo, células mieloídes tales como macrófagos, monocitos, neutrófilos, basófilos, eosinófilos, células dendríticas) para reducir la unión de SIRPa a CD47 expresada en la superficie de otra célula (por ejemplo, células enfermas como células cancerosas), como el inhibidor de SIRPa como se da a conocer en el presente documento, preferiblemente un anticuerpo anti-SIRPa (por ejemplo, OSE-172 de Ose Immunotherapeutics, Nantes, Francia).

10 [0118] En algunas formas de realización, se entiende que el inhibidor de CD47 o el inhibidor de SIRPa pueden proporcionarse junto con (es decir, dentro de la misma composición) cualquiera de los compuestos de la invención, es decir, un compuesto capaz de reducir, inhibir o bloquear la actividad enzimática de la proteína glutaminil-péptido ciclotransferasa (QPCT) y/o proteína similar a glutaminil-péptido ciclotransferasa (QPCTL) o la expresión del gen QPCT y/o el gen QPCTL (por ejemplo, 000034, 000035, 000037, 000055, 000024, 000027, 000050, 000020, 000021, 000022, 000023, 000025, 000010, 000026, 000011, 000036, 000029, 000048, 000010, 000026, 000011, 000036, 000029, 000048, 000010, 000052, 000053, 000064, 000044 o 000066) o en una composición separada. Se entiende además que, en los casos en los que el inhibidor de CD47 o el inhibidor de SIRPa y el compuesto de la invención como se da a conocer en el presente documento se proporcionan a un sujeto como composiciones separadas, dichas composiciones separadas se pueden administrar a dicho sujeto que las necesite de manera simultánea (por ejemplo al mismo tiempo, aunque no necesariamente a través de la misma vía de administración) o secuencialmente (por ejemplo, uno tras otro, en cualquier orden, y no necesariamente a través de la misma vía de administración).

Uso de Compuestos y Composiciones

25 [0119] Como se describe en el presente documento, un aspecto de la invención es una composición farmacéutica que comprende un principio activo para usar en un método para tratar una afección en un sujeto que se beneficiaría al reducir la señalización o la unión entre CD47 y SIRPa en el sujeto, en el que el principio activo reduce la expresión o la actividad enzimática de QPCTL, QPCT, o combinaciones de estas, en una célula con CD47 en la superficie.

30 [0120] En algunas formas de realización proporcionadas en el presente documento, el principio activo que reduce la expresión o la actividad enzimática de QPCTL, QPCT o combinaciones de estas también es capaz de 1) reducir o inhibir la formación de un residuo piroglutamilo en el extremo N-terminal de una proteína CD47, 2) bloquear o reducir o inhibir la actividad del eje de señalización CD47-SIRPa, 3) bloquear o reducir o inhibir la interacción o la unión entre CD47 y SIRPa, o combinaciones de estos.

35 [0121] En algunas formas de realización, la presente invención también se refiere al uso de cualquiera de los principios activos y composiciones farmacéuticas de estos que sean capaces de reducir la expresión o la actividad enzimática de QPCTL, QPCT o combinaciones de estas con el propósito de:

40 1) tratar a un sujeto (por ejemplo, humano) que padece una enfermedad o afección en la que está implicado el eje de señalización CD47-SIRPa, como por ejemplo cáncer, aterosclerosis, enfermedades fibróticas así como enfermedades infecciosas (como se da a conocer en este documento); y/o

45 2) modular (por ejemplo, potenciar o aumentar) la destrucción de células enfermas mediada por células inmunitarias (por ejemplo, células cancerosas u otras células enfermas, como células del músculo liso vascular enfermas, células endoteliales enfermas, células enfermas infectadas por un patógeno (por ejemplo, virus), células enfermas que experimentan fibrosis) que expresan o sobreexpresan CD47 en su superficie celular a través de, por ejemplo, fagocitosis (por ejemplo, por fagocitos tales como macrófagos) o mediante CCDA o mediante FCDA en un sujeto que padece una enfermedad o afección en la que está implicado el eje de señalización CD47-SIRPa, como, por ejemplo, cáncer, aterosclerosis, enfermedades fibróticas así como enfermedades infecciosas (por ejemplo, las causadas por un virus). En algunas formas de realización, la "modulación (por ejemplo, refuerzo, regulación al alza o aumento) de la muerte de una célula enferma (por ejemplo, células cancerosas) a través de FCDA o CCDA (utilizando compuestos como se da a conocer en el presente documento) implica o utiliza anticuerpos IgA (por ejemplo, anticuerpo IgA1anti-Her2 -o anticuerpo IgA anti-CD47, y otros); y/o

50 3) complementar o potenciar los efectos de un tratamiento terapéutico (monoterapia) con un primer principio activo (por ejemplo, un fármaco), por ejemplo, anticuerpo anti-CD47 (anticuerpo IgA anti-CD47) u otros principios activos que incluyen, por ejemplo, anticuerpo anti-CD20, anticuerpo anti-PD-L1, anticuerpo anti-Her2, anticuerpo anti-EGFR, anticuerpo biespecífico anti-CD20-CD47, anticuerpo anti- CD56, anticuerpo biespecífico anti-TRP-1-PD-L1 y anticuerpo anti-CD271-esporina, entre otros. En algunas formas de realización, el primer principio activo es un anticuerpo que es una IgA; y/o

55 4) complementar o potenciar los efectos de un tratamiento terapéutico (monoterapia) con un primer principio activo (por ejemplo, un fármaco), por ejemplo anticuerpo anti-SIRPa u otros principios activos que incluyen, por ejemplo, el anticuerpo anti-SIRPa OSE-172 de Ose Immunotherapeutics, Nantes, Francia; o una proteína

quimérica CD47Fc humana recombinante, que consiste en una proteína CD47 diseñada acoplada a un dominio Fc, y otros. En algunas formas de realización, el primer principio activo es un anticuerpo que es una IgA; y/o

- 5 5) sustituir el uso de un anticuerpo anti-CD47 o un anticuerpo anti-SIRPa en el contexto de un tratamiento terapéutico (monoterapia con un anticuerpo anti-CD47 o un anticuerpo SIRPa) o en el contexto de un tratamiento (terapia combinada) donde un anticuerpo anti-CD47 o un anticuerpo anti-SIRPa se administra en combinación con un segundo principio activo (por ejemplo, un fármaco), por ejemplo, anticuerpo anti-CD20, 10 anticuerpo anti-PD-L1, anticuerpo anti-Her2, anticuerpo anti-EGFR, anticuerpo biespecífico anti-CD20-CD47, anticuerpo anti-CD56, anticuerpo biespecífico anti-TRP-1-PD-L1 y anticuerpo anti-CD271-esporina, y otros. En algunas formas de realización, el segundo principio activo es un anticuerpo que es una IgA.

Enfermedades y afecciones

- 15 [0122] En algunas formas de realización, las composiciones descritas en el presente documento se utilizan para tratar a un sujeto que padece una enfermedad o afección en la que está implicado el eje de señalización CD47-SIRPa. En algunas formas de realización, los compuestos o composiciones del presente documento reducen la unión entre CD47 en la superficie de una primera célula y SIRPa en la superficie de la segunda célula del sujeto. En algunas formas de realización, la afección se caracteriza por la sobreexpresión de CD47 en una célula 20 enferma. En algunas formas de realización, la sobreexpresión se refiere a cuando la expresión de CD47 es 1,5 veces mayor, 2,0 veces mayor, 2,5 veces mayor, 3,0 veces mayor o más en células enfermas que en células no enfermas. En algunas formas de realización, la expresión es 1,5 veces mayor en células enfermas que en células no enfermas. En algunas formas de realización, la expresión es 2,0 veces mayor en células enfermas que en células no enfermas. En algunas formas de realización, la expresión es 2,5 veces mayor en células enfermas que en células no enfermas. En algunas formas de realización, la expresión es 3,0 veces mayor en células enfermas que en células no enfermas. En algunas formas de realización, la expresión es más de 3,0 veces mayor en células enfermas que en células no enfermas.
- 25 [0123] En algunas formas de realización, la afección se selecciona del grupo que consiste en cáncer, aterosclerosis, enfermedades fibróticas y enfermedades infecciosas, como se describe en las siguientes secciones.

Cáncer

- 35 [0124] Los términos "cáncer", "neoplasia", "tumor" y "carcinoma" se utilizan indistintamente en el presente documento para referirse a células enfermas, que muestran un crecimiento relativamente autónomo, de manera que tienen un fenotipo de crecimiento aberrante caracterizado por una pérdida significativa de control de la proliferación celular. En general, las células de interés para la detección o el tratamiento en la presente solicitud incluyen células precancerosas (por ejemplo, benignas), malignas, premetastásicas, metastásicas y no 40 metastásicas, en particular células precancerosas (por ejemplo, benignas), malignas, premetastásicas, células metastásicas y no metastásicas que expresan o sobreexpresan el gen CD47 y/o la proteína CD47 (preferiblemente, la proteína CD47 se expresa en la superficie celular, es decir, la membrana plasmática, y puede transmitir o está asociada con una señal "don't eat me" o "señal antifagocítica"). El experto en la materia sabe cómo detectar o identificar células enfermas tales como células cancerosas que tienen un fenotipo precanceroso (por ejemplo, benigno), maligno, premetastásico, metastásico y no metastásico, particularmente 45 fenotipos precancerosos (por ejemplo, benignos), malignos, premetastásicos y metastásicos utilizando marcadores específicos para el cáncer (por ejemplo, alfafetoproteína (AFP) para cáncer de hígado y tumores de células germinales; beta-2-microglobulina (B2M) para mieloma múltiple, leucemia linfocítica crónica y algunos linfomas; CD20 para linfoma no Hodgkin), análisis de mutación del gen EGFR en cáncer de pulmón de células no 50 pequeñas, amplificación del gen HER2/neu en cáncer de mama, cáncer gástrico y adenocarcinoma de la unión gastroesofágica, antígeno prostático específico en cáncer de próstata y similares.

- [0125] En algunas formas de realización, la afección es cáncer. En algunas formas de realización, la afección es cáncer y el cáncer se selecciona del grupo que consiste en leucemia, leucemia mieloide aguda (LMA), leucemia 55 mieloide crónica, leucemia linfoblástica aguda (LLA), linfoma no Hodgkin (LNH), mieloma múltiple (MM), cáncer de ovario, gliomas, cáncer de colon, cáncer de mama, leiomiosarcoma, tumores neuroendocrinos pancreáticos, cáncer de pulmón de células pequeñas y cáncer de vejiga, HNSCC, cáncer gástrico, cáncer de esófago, T-ALL, glioma, mesotelioma, glioblastoma, melanoma y NSCLC, y otros). En algunas formas de realización, el cáncer es leucemia o leucemia mieloide aguda (LMA).

Aterosclerosis

- [0126] El término "aterosclerosis", como se usa en el presente documento, se refiere a la afección reconocida como el principal proceso patológico que subyace al ataque cardíaco y al accidente cerebrovascular. Más 60 específicamente, la aterosclerosis se caracteriza como un proceso patológico progresivo y sistémico en el cual la pared arterial se engrosa a través de un proceso patológico en el que están implicados la inflamación, el estrés

oxidativo y la dislipidemia. Yoko Kojima et al (2016), *Nature*. vol. 536(7614), pp 86-90; Ross et al (1999), *Am Heart J.*, vol. 138: S419-420; Wang et al (2012), *Circ Res*, vol. 111, pp 245-259; Quinn et al (1987), *PNAS*, vol. 84, pp 2995- 2998). Este proceso patológico conduce a la formación de placas y a la limitación del flujo en el lumen de los vasos de los sujetos afectados por esta afección. Los mecanismos subyacentes a la aterosclerosis se están estudiando activamente. Por ejemplo, se ha documentado que la acumulación de células vasculares enfermas (por ejemplo, células de músculo liso vascular enfermas), células endoteliales enfermas y desechos celulares apoptóticos en los desechos del lumen del vaso contribuye a empeorar el proceso patológico que conduce a la formación de placa. Un estudio reciente ha revelado que las células enfermas, como las células del músculo liso vascular enfermas o las células endoteliales enfermas, regulan al alza la expresión de CD47 en su superficie celular, transmitiendo así una señal 'don't eat me', que permite a dichas células enfermas evadir la fagocitosis por parte de los fagocitos, por ejemplo macrófagos (es decir, el sistema inmunitario no elimina las células enfermas) (Yoko Kojima et al (2016), *Nature*. vol. 536(7614), pp 86-90). Esto concuerda con la observación de que CD47 se regula positivamente en la placa aterosclerótica humana en comparación con el tejido vascular no aterosclerótico, y en sujetos con enfermedad cerebrovascular sintomática (accidente cerebrovascular o ataque isquémico transitorio) en comparación con aquellos con lesiones asintomáticas estables. Yoko Kojima et al (2016), *Nature*. vol. 536(7614), pp 86-90). También se ha documentado que la administración de un anticuerpo anti-CD47 mejora la destrucción de las células enfermas por parte de las células fagocitarias y mejora la aterosclerosis. (Yoko Kojima et al (2016), *Nature*. vol. 536(7614), pp 86-90). En el contexto de la presente invención, el término "aterosclerosis" se refiere a células enfermas tales como células de músculo liso vascular enfermas y células endoteliales enfermas que expresan o sobreexpresan el gen CD47 y/o la proteína CD47 (preferiblemente la proteína CD47 se expresa en la superficie celular, es decir, la membrana plasmática, y puede transmitir o está asociada con una "señal don't eat me" o "señal antifagocítica"). El experto en la materia sabe cómo detectar o identificar dichas células enfermas utilizando métodos conocidos en la técnica, como detectar la presencia o ausencia de marcadores (moleculares) específicos para la enfermedad, específicos para el tipo de célula (por ejemplo, a-actina del músculo liso, Casp3, etc.), características morfológicas, y similares.

[0127] En algunas formas de realización, la afección es aterosclerosis.

30 **Enfermedades fibróticas**

[0128] El término "enfermedades fibróticas", como se usa en el presente documento, se refiere a una afección que se caracteriza por la acumulación de un exceso de componentes de la matriz extracelular (por ejemplo, colágeno, fibronectina) que forma tejido conjuntivo fibroso en y alrededor de un tejido inflamado o dañado. La fibrosis puede causar crecimiento excesivo, endurecimiento y/o cicatrización que altera la arquitectura del órgano o tejido subyacente. Si bien la remodelación controlada de los tejidos y la cicatrización son parte del proceso normal de cicatrización de heridas promovido por la transdiferenciación de fibroblastos en miofibroblastos, la cicatrización excesiva y persistente debido a lesiones graves o repetitivas o la cicatrización desregulada de heridas (por ejemplo, persistencia de miofibroblastos) puede resultar en lesiones permanentes, disfunción e insuficiencia orgánica, e incluso la muerte.

[0129] Los cambios fibróticos pueden ocurrir en trastornos vasculares (por ejemplo, enfermedad vascular periférica, enfermedad cardíaca, enfermedad cerebral y otras) y en todos los sistemas principales de tejidos y órganos (por ejemplo, pulmón, hígado, riñón, corazón, piel, páncreas). Los trastornos fibróticos incluyen una amplia gama de presentaciones clínicas, incluidos trastornos multisistémicos, como esclerosis sistémica, fibrosclerosis multifocal, esclerodermia, mielofibrosis y trastornos específicos de los órganos, como fibrosis pulmonar (por ejemplo, fibrosis pulmonar idiopática [FPI]), fibrosis hepática, fibrosis renal, fibrosis del páncreas, fibrosis cardíaca y fibrosis de la vejiga (Rosenbloom et al (2010), *Ann. Intern. Med.*, Vol.152, p. 159; Wynn et al (2004), *Nat. Rev. Immunol.*, Vol 4, pp 583; Wernig et al (2017), *PNAS*, vol. 114, pp 4757-4762). Los mecanismos subyacentes a las enfermedades fibróticas se están estudiando activamente. Por ejemplo, se ha documentado que las células enfermas, como los fibroblastos enfermos, regulan al alza la expresión de CD47 en su superficie celular, transmitiendo así una señal "don't eat me", que permite a dichas células enfermas evadir la fagocitosis por parte de las células fagocitarias, por ejemplo, macrófagos y/o neutrófilos (es decir, el sistema inmunitario no elimina las células enfermas) (Wernig et al (2017), *PNAS*, vol. 114, pp. 4757-4762). Además, se ha descubierto que el tratamiento con un anticuerpo anti-CD47 conduce a un aumento de fibroblastos enfermos fagocitados, lo que a su vez reduce la fibrosis en el tejido. Wernig et al (2017), *PNAS*, vol. 114, pp 4757-4762). En el contexto de la presente invención, el término "enfermedades fibróticas" se refiere a células enfermas tales como fibroblastos enfermos, que se encuentran en tejidos que experimentan fibrosis. Los fibroblastos enfermos expresan o sobreexpresan el gen CD47 y/o la proteína CD47 (preferiblemente, la proteína CD47 se expresa en la superficie celular, es decir, la membrana plasmática, que puede transmitir o está asociada con una señal "don't eat me" o "señal antifagocítica"). El experto en la materia sabe cómo detectar o identificar dichas células enfermas utilizando métodos conocidos en la técnica, como detectar la presencia o ausencia de marcadores (moleculares) específicos para enfermedades, específicos para tipos de células, como se describe, por ejemplo, en WO2015/120350 (por ejemplo, a-actina de músculo liso, c-Jun, EIF2AK1, EIF2AK2, EIF2AK3, EIF2AK4, EIF5A, mTOR, DOHH, DHPS, HDAC6, SIRT2, RSK, AHCY, etc.), características morfológicas y similares.

[0130] En algunas formas de realización, la afección es una enfermedad fibrótica. En algunas formas de realización, la afección es una enfermedad fibrótica y la enfermedad fibrótica se selecciona del grupo que consiste en fibrosis pulmonar idiopática (FPI), esclerodermia, mielofibrosis, fibrosis renal, fibrosis hepática, fibrosis pulmonar, fibrosis pancreática, fibrosis cardíaca y fibrosis de la vejiga.

5 **Enfermedades infecciosas**

[0131] El término "enfermedades infecciosas", como se usa en el presente documento, se refiere a afecciones en las que al menos una célula de un organismo (es decir, un sujeto) está infectada por un agente infeccioso, como un patógeno, que induce una mayor expresión de CD47 en al menos una célula del organismo infectado. Por ejemplo, los agentes infecciosos incluyen, entre otros, bacterias, virus, protozoos y hongos. Por tanto, se entiende que las enfermedades infecciosas son trastornos causados por agentes infecciosos. Los ejemplos no limitantes de enfermedades infecciosas incluyen enfermedades causadas por un patógeno seleccionado de un lentivirus, virus linfotrópico T humano (HTLV), un virus hepadna, virus de la hepatitis B, un virus del herpes, virus del papiloma humano, virus de La Crosse, Yersinia sp., Yersinia pestis, Yersinia pseudotuberculosis, Yersinia enterocolitica, Francisella sp., Helicobacter sp., Helicobacter pylori, Pasteurella sp., Vibrio sp., Vibrio cholerae, Vibrio parahemolyticus, Legionella sp., Legionella pneumophila, Listeria sp., Listeria monocytogenes, Mycoplasma sp., Mycoplasma hominis, Mycoplasma pneumoniae, Mycobacterium sp., Mycobacterium tuberculosis, Mycobacterium leprae, Rickettsia sp., Rickettsia rickettsii, Rickettsia typhi, Plasmodium, Trypanosoma, Giardia, Toxoplasma y Leishmania. En el contexto de la presente invención, el término "enfermedades infecciosas" se refiere a células enfermas infectadas por un patógeno (por ejemplo, virus), que expresan o sobreexpresan el gen CD47 y/o la proteína CD47 (preferiblemente, la proteína CD47 se expresa en la superficie celular, es decir, membrana plasmática, y puede transmitir o está asociada con una "señal don't eat me" o "señal antifagocítica"). Se entiende que la célula enferma variará dependiendo de la enfermedad infecciosa específica y del patógeno específico. El experto en la materia sabe cómo detectar o identificar dichas células enfermas usando métodos conocidos en la técnica tales como la detección de la presencia o ausencia de marcadores (moleculares) específicos para la enfermedad, específicos para el tipo de célula, características morfológicas y similares.

30 [0132] En algunas formas de realización, la afección es una enfermedad infecciosa. En algunas formas de realización, la enfermedad infecciosa es causada por un virus, una bacteria o un protozoo. En algunas formas de realización, la enfermedad infecciosa es causada por un patógeno seleccionado del grupo que consiste en un lentivirus, virus linfotrópico T humano (HTLV), un virus hepadna, virus de la hepatitis B, un virus del herpes, virus del papiloma humano, virus de La Crosse, Yersinia sp., Yersinia pestis, Yersinia pseudotuberculosis, Yersinia enterocolitica, Francisella sp., Helicobacter sp., Helicobacter pylori, Pasteurella sp., Vibrio sp., Vibrio cholerae, Vibrio parahemolyticus, Legionella sp., Legionella pneumophila, Listeria sp., Listeria monocytogenes, Mycoplasma sp., Mycoplasma hominis, Mycoplasma pneumoniae, Mycobacterium sp., Mycobacterium tuberculosis, Mycobacterium leprae, Rickettsia sp., Rickettsia rickettsii, Rickettsia typhi, Plasmodium, Trypanosoma, Giardia, Toxoplasma y Leishmania.

40 **Métodos de reducción de la expresión o actividad enzimática de QPCT y/o QPCTL**

45 [0133] En un aspecto, en el presente documento se divulga una composición farmacéutica que comprende un principio activo para usar en un método para reducir la unión entre CD47 en la superficie de una primera célula y SIRPa en la superficie de una segunda célula de un sujeto, donde el principio activo reduce la expresión o actividad enzimática de QPCTL, QPCT o combinaciones de estas en dicha primera célula con CD47 en la superficie.

50 [0134] En algunas formas de realización, el sujeto tiene una afección que se beneficiaría de la reducción de la unión entre CD47 en la superficie de una primera célula y SIRPa en la superficie de una segunda célula del sujeto.

55 [0135] En algunas formas de realización, en el presente documento se divulga una composición farmacéutica que comprende un principio activo para usar en un método para tratar una afección en un sujeto que se beneficiaría de la reducción de la unión entre CD47 y SIRPa en el sujeto, donde el principio activo reduce la expresión o la actividad enzimática de QPCTL, QPCT o combinaciones de estas en una célula con CD47 en la superficie.

60 [0136] En algunas formas de realización, reducir la expresión de QPCTL, QPCT o combinaciones de estas comprende reducir la transcripción, traducción o combinaciones de estas del gen que codifica QPCTL, el gen que codifica QPCT o combinaciones de estas. En algunas formas de realización, el principio activo comprende una molécula de ARN de doble cadena, una molécula de ARN inhibidor pequeño (ARNip) o una molécula de ARN inhibidor (ARNi).

65 [0137] En algunas formas de realización, la transcripción y/o traducción de los genes que codifican QPCTL, QPCT o combinaciones de estas se reduce mediante el uso de un principio activo que comprende una molécula

de ARN de doble cadena, una molécula de ARN inhibidor pequeño (siARN), o una molécula de ARN inhibidor (ARNi) diseñada para reducir la expresión de QPCTL y/o QPCT, o un ARN guía (ARNg) diseñado para interrumpir el gen QPCTL y/o QPCT, o usando un sistema CRISPR-Cas como el sistema CRISPRi, donde, en el sistema CRISPRi, un Cas 9 catalíticamente muerto (dCas9), que carece de actividad endonucleasa, se coexpresa con el ARNg. El ARNg es complementario a la región del gen de interés que se desea reprimir o activar. Los expertos en la materia están familiarizados con los métodos para alterar (por ejemplo, reducir) la transcripción y/o traducción de genes, por ejemplo, gen(es) que codifica(n) QPCTL y/o QPCT.

[0138] En algunas formas de realización, la actividad enzimática de QPCTL, QPCT o combinaciones de estas se reduce mediante el uso de un principio activo, que es un inhibidor de QPCTL, QPCT o combinaciones de estas. Cualquier principio activo capaz de reducir la actividad enzimática de QPCTL, QPCT o combinaciones de estas puede usarse en los métodos de la invención, como por ejemplo sus principios activos y las composiciones farmacéuticas, como se da a conocer en el presente documento. En algunas formas de realización, el inhibidor se selecciona del grupo que consiste en compuestos con la fórmula (I), (II), (III), (IV), (V), (VI), (VII) o (VIII), o un compuesto descrito en la Tabla A, B, C, D o E, por ejemplo, PBD150, PQ912 y PQ1565, y los compuestos 000051, 000054, 00016, 000034, 000035, 0037, 000055, 000024, 000027, 000050, 000020, 000021, 000022, 000023, 000027, 000050, 000020, 000021, 000022, 000023, 000027, 000010, 000049, 000012, 000030, 000031, 000013, 000014, 000032, 000052, 000053, 000064, 000044 o 000066, como se da a conocer en este documento. En algunas formas de realización, el principio activo se selecciona del grupo que consiste en PBD150, PQ912 y PQ1565.

[0139] La actividad enzimática de la proteína QPCTL y/o QPCT o la expresión de la proteína y/o gen QPCTL y/o QPCT en una célula puede medirse o evaluarse mediante cualquier método adecuado. En algunas formas de realización, la actividad enzimática de QPCTL y QPCT se mide poniendo en contacto células o lisados celulares con un sustrato para el que se puede detectar la formación de pGlu. En algunas formas de realización, el (nivel de) expresión de la proteína QPCTL y/o la proteína QPCT se mide o determina detectando la presencia de la proteína QPCTL y/o la proteína QPCT en una célula usando un anticuerpo dirigido contra la proteína QPCTL o la proteína QPCT. En algunas formas de realización, el (nivel de) expresión de proteína QPCTL y/o proteína QPCT se cuantifica midiendo la cantidad de proteína QPCTL y/o proteína QPCT utilizando métodos de transferencia Western y similares. En algunas formas de realización, la expresión del gen QPCTL y/o el gen QPCT se mide o determina detectando la presencia del gen QPCTL y/o el gen QPCT en una célula (por ejemplo, ARNm) usando hibridación *in situ* usando sondas dirigidas contra el gen QPCTL o el gen QPCT. En algunas formas de realización, la expresión del gen QPCTL y/o el gen QPCT se cuantifica midiendo la cantidad de gen QPCTL y/o gen QPCT (ADN o ARNm) usando técnicas de PCR y similares.

[0140] En otro aspecto, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende un inhibidor de CD47 (por ejemplo, anticuerpo IgA anti-CD47) para usar en un método para tratar una afección en un sujeto, en el que el sujeto se beneficiaría al reducir la unión entre CD47 en la superficie de una primera célula y SIRP α en la superficie de una segunda célula, y en el que el inhibidor de CD47 es un inhibidor que se une a dicha CD47 en la superficie de dicha primera célula y, por lo tanto, reduce la unión de dicha CD47 a dicha SIRP α en la superficie de dicha segunda célula, y donde el método de tratamiento comprende reducir la expresión o la actividad enzimática de QPCTL, QPCT o combinaciones de estas en dicha primera célula.

[0141] En otro aspecto, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende un inhibidor de SIRP α para usar en un método para tratar una afección en un sujeto, donde el sujeto se beneficiaría de la reducción de la unión entre CD47 en la superficie de una primera célula y SIRP α en la superficie de una segunda célula, y donde el inhibidor de SIRP α es un inhibidor que se une a dicha SIRP α en la superficie de dicha segunda célula y, por tanto, reduce la unión de dicha SIRP α a dicha CD47 en la superficie de dicha primera célula, y donde el método del tratamiento comprende además reducir la expresión o la actividad enzimática de QPCTL, QPCT o combinaciones de estas en dicha primera célula.

[0142] En algunas formas de realización, reducir la expresión o la actividad enzimática de QPCTL, QPCT o combinaciones de estas en la célula con CD47 expresada en su superficie mientras se usa una composición farmacéutica que comprende un inhibidor de CD47 o un inhibidor de SIRP como se da a conocer en el presente documento en un método para tratar una afección en un sujeto que se beneficiaría de la reducción de la señalización o la unión entre SIRP α y CD47 en el sujeto se puede hacer como se ha descrito anteriormente, usando los principios activos (inhibidores de QPCT y QPCTL) como se da a conocer en este documento. En algunas formas de realización, reducir la expresión o la actividad enzimática de QPCTL, QPCT o combinaciones de estas en dicha primera célula reduce aún más la unión de dicha CD47 en la superficie de dicha primera célula a dicha SIRP α en la superficie de dicha segunda célula. En algunas formas de realización, el tratamiento comprende vigilar dicha unión entre CD47 en la superficie de dicha primera célula y SIRP α en la superficie de dicha segunda célula en el sujeto, y donde el aumento de la unión es indicativo de una afección que se beneficiaría de la reducción de dicha unión entre CD47 en la superficie de dicha primera célula y SIRP α en la superficie de dicha segunda célula en dicho sujeto. En algunas formas de realización, el paso de reducir la expresión o actividad enzimática de QPCTL, QPCT o combinaciones de estas en la célula con CD47 expresada en su superficie mientras se usa una composición farmacéutica que comprende un inhibidor de CD47 o un

inhibidor de SIRPa como se da a conocer en este documento en un método del tratamiento de una afección en un sujeto que se beneficiaría de la reducción de la señalización o la unión entre SIRPa y CD47 en el sujeto se realiza de manera simultánea o secuencial con el paso de usar una composición farmacéutica que comprende un inhibidor de CD47 o un inhibidor de SIRP como se da a conocer en este documento. En algunas formas de realización, el inhibidor de CD47 es un anticuerpo.

5 [0143] En algunas formas de realización, la reducción de la expresión o actividad enzimática de QPCTL, QPCT o combinaciones de estas en la célula que expresa CD47 en su superficie reduce aún más la unión de CD47 ubicada en la superficie de dicha célula (por ejemplo, célula cancerosa) a SIRPa expresada en la superficie de otra célula (por ejemplo, un fagocito como un macrófago). En algunas formas de realización, esto conduce a un número reducido de células (por ejemplo, células cancerosas) que tienen un nivel funcional de CD47 en su superficie, es decir, funcional en términos de poder unirse a la SIRPa expresada en la superficie de otra célula y, por lo tanto, evadir la fagocitosis por un fagocito (por ejemplo, macrófagos, neutrófilos).

10 [0144] En algunas formas de realización, el tratamiento comprende vigilar la unión entre SIRPa expresada en la superficie de una célula (por ejemplo, macrófagos, neutrófilos) y CD47 expresada en la superficie de otra célula (por ejemplo, célula cancerosa) en el sujeto, donde el aumento de la unión es indicativo de una afección que se beneficiaría de la reducción de la unión entre SIRPa y CD47 en el sujeto. En algunas formas de realización, la unión entre SIRPa expresada en la superficie de una célula (por ejemplo, macrófagos, neutrófilos) y CD47 expresada en la superficie de otra célula se evalúa utilizando cualquier método adecuado en la técnica, por ejemplo, mediante el uso de una proteína SIRPa recombinante marcada.

15 [0145] En algunas formas de realización, el sujeto es un mamífero. En algunas formas de realización, el sujeto es humano.

20 [0146] En algunas formas de realización, dicha primera célula con CD47 en la superficie es una célula enferma que expresa o sobreexpresa CD47. En algunas formas de realización, la expresión de CD47 en la célula enferma es 1,5 veces mayor, 2,0 veces mayor, 2,5 veces mayor, 3,0 veces mayor o más que en las células no enfermas.

25 [0147] En algunas formas de realización, la afección que se beneficiaría de la reducción de la señalización o la unión entre SIRPa y CD47 en el sujeto se selecciona del grupo que consiste en cáncer, aterosclerosis, enfermedades fibróticas y enfermedades infecciosas. En algunas formas de realización, la célula enferma se selecciona del grupo que consiste en una célula cancerosa, una célula de músculo liso vascular, una célula endotelial, una célula infectada por un patógeno y una célula de un tejido que padece fibrosis.

30 [0148] En algunas formas de realización, la célula enferma es una célula cancerosa. En algunas formas de realización, la célula enferma es una célula cancerosa seleccionada del grupo que consiste en leucemia, leucemia mieloide aguda (LMA), leucemia mieloide crónica, leucemia linfoblástica aguda (LLA), linfoma no Hodgkin (LNH), mieloma múltiple (MM), cáncer de ovario, gliomas, cáncer de colon, cáncer de mama, 35 leiomiosarcoma, tumores neuroendocrinos pancreáticos, cáncer de pulmón de células pequeñas y cáncer de vejiga, HNSCC, cáncer gástrico, cáncer de esófago, T-ALL, glioma, mesotelioma, glioblastoma, melanoma y NSCLC, y otros). En algunas formas de realización, la célula enferma es una célula cancerosa seleccionada del grupo que consiste en una célula de leucemia o una célula de leucemia mieloide aguda (LMA).

40 [0149] En algunas formas de realización, la afección que se beneficiaría de la reducción de la unión entre CD47 en la superficie de una primera célula y SIRPa en la superficie de una segunda célula del sujeto se selecciona del grupo que consiste en cáncer, aterosclerosis, enfermedades fibróticas y enfermedades infecciosas.

45 [0150] En algunas formas de realización, la afección es cáncer. En algunas formas de realización, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en leucemia, leucemia mieloide aguda (LMA), leucemia mieloide crónica, leucemia linfoblástica aguda (LLA), linfoma no Hodgkin (LNH), mieloma múltiple (MM), cáncer de ovario, gliomas, cáncer de colon, cáncer de mama, leiomiosarcoma, tumores neuroendocrinos pancreáticos, cáncer de pulmón de células pequeñas y cáncer de vejiga, HNSCC, cáncer gástrico, cáncer de esófago, T-ALL, glioma, mesotelioma, glioblastoma, melanoma y NSCLC, y otros). En algunas formas de realización, el cáncer es leucemia o LMA.

50 [0151] En algunas formas de realización, la afección es aterosclerosis.

55 [0152] En algunas formas de realización, la afección es una enfermedad fibrótica. En algunas formas de realización, la enfermedad fibrótica se selecciona del grupo que consiste en fibrosis pulmonar idiopática (FPI), esclerodermia, mielofibrosis, fibrosis renal, fibrosis hepática, fibrosis pulmonar, fibrosis pancreática, fibrosis cardíaca y fibrosis de la vejiga.

60 [0153] En algunas formas de realización, la afección es una enfermedad infecciosa. En algunas formas de realización, la enfermedad infecciosa está provocada por un patógeno seleccionado de entre virus, bacterias y protozoos. En algunas formas de realización, la enfermedad infecciosa es causada por un patógeno seleccionado del grupo que consiste en un lentivirus, virus linfotrópico T humano (HTLV), un virus hepadna, virus

de la hepatitis B, un virus del herpes, virus del papiloma humano, virus de La Crosse, Yersinia sp., Yersinia pestis, Yersinia pseudotuberculosis, Yersinia enterocolitica, Francisella sp., Helicobacter sp., Helicobacter pylori, Pasteurella sp., Vibrio sp., Vibrio cholerae, Vibrio parahemolyticus, Legionella sp., Legionella pneumophila, Listeria sp., Listeria monocytogenes, Mycoplasma sp., Mycoplasma hominis, Mycoplasma pneumoniae, Mycobacterium sp., Mycobacterium tuberculosis, Mycobacterium leprae, Rickettsia sp., Rickettsia rickettsii, Rickettsia typhi, Plasmodium, Trypanosoma, Giardia, Toxoplasma y Leishmania.

5 [0154] En algunas formas de realización, la célula con CD47 en la superficie es una célula seleccionada del grupo que consiste en una célula enferma, una célula cancerosa que expresa o sobreexpresa CD47, una célula de músculo liso vascular que expresa o sobreexpresa CD47, una célula endotelial enferma que expresa o sobreexpresa CD47, una célula enferma infectada por un patógeno (por ejemplo, un virus) que expresa o sobreexpresa CD47, y una célula enferma que padece fibrosis que expresa o sobreexpresa CD47 en su superficie celular.

10 15 [0155] En algunas formas de realización, la célula que expresa SIRP α en su superficie es una célula mieloide. En algunas formas de realización, la célula mieloide se selecciona del grupo que consiste en macrófagos, monocitos, neutrófilos, basófilos, eosinófilos y células dendríticas.

20 25 [0156] En algunas formas de realización, la reducción de la unión entre dicha CD47 en la superficie de dicha primera célula y dicha SIRP α en la superficie de dicha segunda célula se realiza en dicha primera célula con CD47 en la superficie para la fagocitosis. En algunas formas de realización, aumenta la fagocitosis de dicha primera célula.

30 35 [0157] En algunas formas de realización, la reducción de la unión entre dicha CD47 en la superficie de dicha primera célula y dicha SIRP α en la superficie de dicha segunda célula se realiza en dicha primera célula con CD47 en la superficie para CCDA. En algunas formas de realización, la CCDA de dicha primera célula aumenta. En algunas formas de realización, la destrucción de una célula enferma (por ejemplo, células cancerosas) a través de CCDA implica o usa anticuerpos IgA (por ejemplo, anticuerpo IgA1 anti-Her2 o anticuerpo anti-CD47-IgA, y otros).

40 45 [0158] En algunas formas de realización, la reducción de la unión entre dicha CD47 en la superficie de dicha primera célula y dicha SIRP α en la superficie de dicha segunda célula se realiza en dicha primera célula con CD47 en la superficie para FCDA. En algunas formas de realización, la FCDA de dicha primera célula aumenta. En algunas formas de realización, la destrucción de una célula enferma (por ejemplo, células cancerosas) mediante FCDA (usando compuestos como se da a conocer en este documento) implica o usa anticuerpos de tipo IgA (por ejemplo, anticuerpo IgA1 anti-Her2 o anticuerpo IgA anti-CD47, y otros).

50 [0159] En algunas formas de realización, las composiciones farmacéuticas que se dan a conocer en el presente documento son para su uso en un tratamiento para aumentar la fagocitosis (por ejemplo, por una célula fagocitaria tal como un macrófago) o para su uso en un tratamiento para aumentar la destrucción o la muerte de células enfermas (por ejemplo, células cancerosas) mediante FCDA o CCDA. En algunas formas de realización, es un uso en un tratamiento para aumentar la fagocitosis de una célula enferma o es un uso en un tratamiento para aumentar la destrucción o la muerte de una célula enferma (por ejemplo, una célula cancerosa) en un sujeto (por ejemplo, un ser humano), tal como una célula cancerosa que expresa o sobreexpresa CD47, una célula de músculo liso vascular que expresa o sobreexpresa CD47, una célula endotelial enferma que expresa o sobreexpresa CD47, una célula enferma infectada por un patógeno (por ejemplo, un virus) que expresa o sobreexpresa CD47, o una célula enferma que experimenta fibrosis que expresa o sobreexpresa CD47 en su superficie celular. En algunas formas de realización, la destrucción de una célula enferma (por ejemplo, células cancerosas) mediante CCDA o FCDA (usando compuestos como se da a conocer en este documento) implica o usa anticuerpos de tipo IgA (por ejemplo, anticuerpo IgA1 anti-Her2 o anticuerpo anti-CD47-IgA, y otros).

55 [0160] En algunas formas de realización, las composiciones farmacéuticas descritas en este documento comprenden además un segundo principio activo seleccionado del grupo que consiste en anticuerpo anti-PD-L1, anticuerpo anti-CD20, anticuerpo anti-Her2, anticuerpo anti-EGFR, anticuerpo biespecífico anti-CD20-CD47, anticuerpo anti-CD56, anticuerpo biespecífico anti-TRP-1-PD-L1 y anticuerpo anti-CD271-esporina. En algunas formas de realización, el segundo principio activo es un anticuerpo que es una IgA.

60 65 [0161] En algunas formas de realización, el anticuerpo anti-PD-L1 es atezolizumab, durvalumab o avelumab. En algunas formas de realización, el anticuerpo anti-Her2 es Trastuzumab. En algunas formas de realización, el anticuerpo anti-CD20 es Rituximab. En algunas formas de realización, el anticuerpo anti-EGFR es Cetuximab. En algunas formas de realización, el anticuerpo biespecífico anti-CD20-CD47 es el anticuerpo como se describe en Piccione et al (2015), mAbs, vol. 7, pp 946-956. En algunas formas de realización, el anticuerpo anti-CD56 es el anticuerpo como se describe en Weiskoff et al (2016), Journal of Clinical Investigation, Vol.126, pp 2610-2620. En algunas formas de realización, el anticuerpo anti-CD271-esporina es el anticuerpo descrito en Ngo et al (2016) Cell Reports, vol. 16, pp 1701-1716. En algunas formas de realización, el anticuerpo anti-PD-1 es Pembrolizumab.

5 [0162] En algunas formas de realización, la reducción de la expresión o la actividad enzimática de QPCTL, QPCT o combinaciones de estas en la célula con CD47 en la superficie se realiza como se ha descrito anteriormente, usando cualquiera de los compuestos, principios activos y composiciones farmacológicas como se da a conocer en este documento.

Métodos de cribado

10 [0163] En otro aspecto, la presente invención se refiere a un método *in vitro* para seleccionar o cribar principios activos que reduzcan la señalización o la unión entre CD47 en la superficie de una primera célula y SIRPa en la superficie de una segunda célula, donde el método comprende cribar principios activos que reduzcan la expresión o la actividad enzimática de QPCTL, QPCT o combinaciones de estas. El experto en la materia conoce bien los métodos para evaluar el efecto del principio activo sobre la señalización o la unión entre SIRPa y CD47 en un sujeto. Por ejemplo, el análisis de citometría de flujo de CD47 en células utilizando un anticuerpo CD47 15 (por ejemplo, CC2C6) que se une o se dirige específicamente al residuo piroglutamilo presente en el extremo N terminal de CD47 y un SIRPa, que se fusiona con la IgG1 humana para formar un SIRPa-Fc, que luego se somete a un procedimiento de inmunotinción utilizando un anticuerpo secundario contra IgG1 humana, seguido de un análisis de la señal de inmunotinción utilizando tecnología de citometría de flujo. Asimismo, los efectos de 20 un principio activo sobre la expresión o la actividad enzimática de QPCTL y/o QPCT en las células se pueden evaluar mediante cualquier método adecuado en la técnica, como los descritos en el presente documento.

25 [0164] En algunas formas de realización, el método comprende la detección de principios activos que reduzcan la expresión o la actividad enzimática de QPCTL, QPCT o combinaciones de estas en dicha primera célula que expresa CD47 en su superficie. Los ejemplos no limitantes de dichas células incluyen células enfermas tales como células cancerosas, células enfermas del músculo liso vascular, células endoteliales enfermas, células enfermas infectadas por un patógeno (por ejemplo, virus) y células enfermas que experimentan fibrosis.

30 [0165] En algunas formas de realización, el método para seleccionar principios activos como se da a conocer en este documento comprende además los pasos de:

- 35 a. proporcionar una célula CD47 en la superficie, donde dicha célula expresa QPCTL, QPCT o combinaciones de estas;
- b. poner en contacto dicha célula con un compuesto de prueba;
- c. poner en contacto dicha célula con un ligando capaz de unirse a CD47 (ligando de CD47), donde el ligando es una proteína SIRPa;
- d. medir el nivel de unión del ligando de CD47 a CD47; y
- e. determinar si el compuesto de prueba es un principio activo que reduce la unión entre CD47 en la superficie de una primera célula y la proteína SIRPa,

40 donde el compuesto de prueba es un principio activo que reduce la unión entre CD47 en la superficie de una primera célula y la proteína SIRPa si la unión del ligando de CD47 a la proteína CD47 se reduce en dichas células.

45 [0166] En algunas formas de realización, el ligando de CD47 es una proteína SIRPa expresada en la superficie de una segunda célula o es una proteína recombinante SIRPa o partes de esta.

50 [0167] En algunas formas de realización, el método para seleccionar principios activos como se da a conocer en este documento puede comprender (alternativamente) los pasos de:

- 55 a. proporcionar una célula CD47 en la superficie, donde dicha célula expresa QPCTL, QPCT o combinaciones de estas;
- b. poner en contacto dicha célula con un compuesto de prueba;
- c. poner en contacto dicha célula con un ligando capaz de unirse a CD47 (ligando de CD47), donde el ligando es un anticuerpo dirigido contra el residuo piroglutamilo en el extremo N-terminal de CD47 (residuo pGlu);
- d. medir el nivel de unión del ligando de CD47 a CD47; y
- e. determinar si el compuesto de prueba es un principio activo que reduce la unión entre CD47 en la superficie de una primera célula y el ligando de CD47,

60 donde el compuesto de prueba es un principio activo que reduce la unión entre CD47 en la superficie de una primera célula y el ligando de CD47, si la unión del ligando de CD47 a la proteína CD47 se reduce en dichas células.

65 [0168] En algunas formas de realización del paso (a) relacionadas con los métodos para seleccionar principios activos como se da a conocer en el presente documento, las células que expresan CD47 en su superficie, así como la proteína QPCTL y/o la proteína QPCT, son células adecuadas tales como células o líneas celulares de

5 mamíferos (por ejemplo, de humano, ratón, rata, etc.). En algunas formas de realización, las células con CD47 en la superficie y que expresan QPCTL y/o QPCT incluyen células enfermas tales como células cancerosas, células de músculo liso vascular enfermas, células endoteliales enfermas, células enfermas infectadas por un patógeno (por ejemplo, virus) y células enfermas que padecen fibrosis y otros.

10 [0169] En algunas formas de realización del paso (b) relacionadas con los métodos para seleccionar principios activos como se da a conocer en este documento, el contacto de las células con un compuesto de prueba se realiza agregando el compuesto de prueba directamente en los medios de cultivo en una (primera) concentración adecuada o (primera) dosis. El experto en la materia está familiarizado con métodos y técnicas para determinar una (primera) concentración o (primera) dosis adecuada, y es consciente de que es posible que sea necesario evaluar el compuesto de prueba en más de una concentración o dosis para obtener los efectos deseados.

15 [0170] En algunas formas de realización del paso (c) relacionadas con los métodos para seleccionar principios activos como se da a conocer en el presente documento, el ligando capaz de unirse a CD47 (es decir, el ligando de CD47) puede ser:

20 1) una proteína SIRPa. En algunas formas de realización, el ligando de CD47 es SIRPa expresada en la superficie de una segunda célula (por ejemplo, una célula mieloide tal como un macrófago, monocitos, neutrófilos, basófilos, eosinófilos o células dendríticas). En algunas formas de realización, el ligando de CD47 es la proteína recombinante SIRPa (SIRPa-FC). Se entiende que la observación de una unión reducida entre el ligando CD47 (es decir, la proteína SIRPa) y la proteína CD47 en la superficie de la primera célula (por ejemplo, una célula enferma, como una célula cancerosa) sirve como indicación (lectura) de que el compuesto de prueba es un compuesto capaz de disminuir la expresión o actividad enzimática de QPCTL y/o QPCT, que a su vez bloquea o reduce la formación del residuo pGlu en la proteína CD47 presente en las primeras células, que a su vez bloquea o reduce la unión entre CD47 en la superficie de la primera célula y la proteína SIRPa.

25 O

30 2) un ligando de CD47 capaz de unirse a la proteína CD47 ubicada en la superficie extracelular de la célula, particularmente en la ubicación o lugar de la proteína CD47 que contiene el residuo pGlu. En algunas formas de realización, dicho ligando incluye el clon de anticuerpo anti-CD47 CC2C6 (Biolegend, número de catálogo 323106), que reconoce específicamente la región en la proteína CD47 que contiene el residuo pGlu. Se entiende que la observación de la disminución de la unión entre el ligando CD47 (es decir, el anticuerpo CD47 dirigido al residuo pGlu en la proteína CD47, por ejemplo, el anticuerpo clon CC2C6) y la proteína CD47 en la superficie de la primera célula (por ejemplo, una célula enferma, como una célula cancerosa) sirve como indicación (lectura) de que el compuesto de prueba es un compuesto capaz de disminuir la expresión o actividad enzimática de QPCTL y/o QPCT, que a su vez bloquea o reduce la formación de residuos pGlu en la proteína CD47 presente en las primeras células, que a su vez bloquea o reduce la unión entre CD47 en la superficie de la primera célula y el anticuerpo CD47 que se dirige al residuo pGlu en la proteína CD47 (por ejemplo, el anticuerpo clon CC2C6).

35 [0171] En algunas formas de realización del paso (d) relacionadas con los métodos para seleccionar principios activos como se da a conocer en el presente documento, la medición del nivel de unión del ligando de CD47 se realiza utilizando cualquier método adecuado en la técnica. Por ejemplo, se puede usar el análisis de citometría de flujo de CD47 en células usando SIRPa, donde SIRPa se fusiona con IgG1 humana para formar una SIRPa-Fc, que luego se somete a un procedimiento de inmunotinción usando un anticuerpo secundario contra IgG1 humana, seguido por el análisis de la señal de tinción inmune usando tecnología de citometría de flujo. Alternativamente, el análisis de citometría de flujo de CD47 en las células se puede realizar usando un anticuerpo CD47 dirigido al residuo pGlu de la proteína CD47 (por ejemplo, el anticuerpo clon CC2C6), que luego se somete a un procedimiento de inmunotinción usando un anticuerpo secundario, seguido de un análisis de la señal de tinción inmune usando tecnología de citometría de flujo.

40 [0172] En otro aspecto, en el presente documento se describe un método *in vitro* para seleccionar o cribar principios activos que reduzcan la señalización o la unión entre CD47 en la superficie de una primera célula y SIRPa en la superficie de una segunda célula, o principios activos que reduzcan la expresión o actividad enzimática de QPCTL, QPCT, o combinaciones de estos, donde el método comprende:

- 45 a. proporcionar una célula CD47 en la superficie, donde dicha célula expresa QPCTL, QPCT o combinaciones de estas;
- 50 b. poner en contacto dicha célula con un compuesto de prueba;
- 55 c. detectar la presencia de un residuo piroglutamilo en el extremo N-terminal de CD47; y
- 60 d. determinar si el compuesto de prueba es un principio activo que reduce la unión entre CD47 en la superficie de una primera célula y SIRPa en la superficie de una segunda célula, o un principio activo que reduce la expresión o la actividad enzimática de QPCTL, QPCT o combinaciones de estas,

donde el compuesto de prueba es un principio activo que reduce la unión entre CD47 en la superficie de una primera célula y SIRPa en la superficie de una segunda célula, o un principio activo que reduce la expresión o la actividad enzimática de QPCTL, QPCT o combinaciones de estas si la presencia de un residuo piroglutamilo en el extremo N-terminal de CD47 está reducida o ausente.

- 5 [0173] En algunas formas de realización, los pasos (a) y (b) se realizan como se ha descrito antes.
- 10 [0174] En algunas formas de realización, el paso (c) se realiza utilizando cualquier método adecuado en la técnica. En algunas formas de realización, la detección de la presencia de un residuo piroglutamilo en el extremo N-terminal de CD47 se realiza utilizando un anticuerpo que reconoce el residuo piroglutamilo presente en el extremo N-terminal de CD47, como el clon del anticuerpo anti-CD47 CC2C6 (Biolegend, número de catálogo 323106).
- 15 [0175] En otro aspecto, en el presente documento se describe un método para reducir o inhibir la unión entre CD47 en la superficie de una primera célula y SIRPa en la superficie de una segunda célula en una célula con CD47 en la superficie de un sujeto, donde el método comprende proporcionar al sujeto un principio activo que reduce la expresión o la actividad enzimática de QPCTL, QPCT o combinaciones de estas en dicha primera célula con CD47 en la superficie.
- 20 [0176] En algunas formas de realización, el principio activo es cualquier principio activo adecuado capaz de reducir la expresión o actividad enzimática de QPCTL, QPCT o combinaciones de estas en una célula que expresa CD47 en su superficie (por ejemplo, célula cancerosa). En algunas formas de realización, el principio activo y las composiciones farmacéuticas se describen en este documento. En algunas formas de realización, el principio activo se selecciona del grupo que consiste en compuestos con la fórmula (I), (II), (III), (IV), (V), (VI), (VII) o (VIII), o un compuesto descrito en la Tabla A, B, C, D o E, por ejemplo, PBD150, PQ912 y PQ1565, y los compuestos 000051, 000054, 00016, 000034, 000035, 0037, 000055, 000024, 000027, 000050, 000020, 000021, 000022, 000023, 000027, 000050, 000020, 000021, 000022, 000023, 000027, 000050, 000020, 000021, 000022, 000023, 000027, 000010, 000049, 000012, 000030, 000031, 000013, 000014, 000032, 000052, 000053, 000064, 000044 o 000066, como se da a conocer en este documento. En algunas formas de realización, el principio activo se selecciona del grupo que consiste en PBD150, PQ912 y PQ1565.
- 35 [0177] En otro aspecto, en el presente documento se divulga un método de tratamiento de una afección en un sujeto que se beneficiaría de la reducción de la señalización o la unión entre CD47 en la superficie de una primera célula y SIRPa en la superficie de una segunda célula del sujeto, donde el método comprende proporcionar al sujeto un principio activo que reduce la expresión o la actividad enzimática de QPCTL, QPCT o combinaciones de estas en dicha primera célula con CD47 en la superficie.
- 40 [0178] En algunas formas de realización, el principio activo es cualquier principio activo adecuado capaz de reducir la expresión o actividad enzimática de QPCTL, QPCT o combinaciones de estas en una célula que expresa CD47 en su superficie (por ejemplo, célula cancerosa). En algunas formas de realización, el principio activo se selecciona del grupo que consiste en compuestos con la fórmula (I), (II), (III), (IV), (V), (VI), (VII) o (VIII), o un compuesto descrito en la Tabla A, B, C, D o E, por ejemplo PBD150, PQ912 and PQ1565, y los compuestos 000051, 000054, 00016, 000034, 000035, 000037, 000055, 000024, 000027, 000050, 000020, 000021, 000022, 000023, 000025, 000010, 000026, 000011, 000036, 000029, 000048, 000049, 000012, 000030, 000031, 000013, 000014, 000032, 000052, 000053, 000064, 000044 o 000066, como se da a conocer en este documento. En algunas formas de realización, el principio activo se selecciona del grupo que consiste en PBD150, PQ912 y PQ1565.
- 50 [0179] En algunas formas de realización, la afección de un sujeto que se beneficiaría de la reducción de la señalización o unión entre SIRPa y CD47 se selecciona de entre cáncer, aterosclerosis, enfermedades fibróticas así como enfermedades infecciosas causadas por patógenos (por ejemplo, virus) y otras. Los ejemplos específicos de cáncer, aterosclerosis, enfermedades fibróticas así como enfermedades infecciosas causadas por patógenos (por ejemplo, virus) son como se describe en este documento.
- 55 [0180] En algunas formas de realización, la afección de un sujeto que se beneficiaría de la reducción de la señalización o la unión entre SIRPa y CD47 es el cáncer. En algunas formas de realización, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en leucemia, leucemia mieloide aguda (LMA), leucemia mieloide crónica, leucemia linfoblástica aguda (LLA), linfoma no Hodgkin (LNH), mieloma múltiple (MM), cáncer de ovario, gliomas, cáncer de colon, cáncer de mama, leiomiosarcoma, tumores neuroendocrinos pancreáticos, cáncer de pulmón de células pequeñas y cáncer de vejiga, HNSCC, cáncer gástrico, cáncer de esófago, T-ALL, glioma, mesotelioma, glioblastoma, melanoma, NSCLC y otros. En algunas formas de realización, el cáncer es leucemia o LMA.
- 60 [0181] En otro aspecto, en el presente documento se describe el uso de un inhibidor de QPCTL, QPCT o combinaciones de estas para reducir la unión entre CD47 en la superficie de una primera célula y SIRPa en la superficie de una segunda célula en un sujeto. En algunas formas de realización, el inhibidor se selecciona del grupo que consiste en compuestos con la fórmula (I), (II), (III), (IV), (V), (VI), (VII) o (VIII), o un compuesto

descrito en la Tabla A, B, C, D o E, por ejemplo, PBD150, PQ912 y PQ1565, y los compuestos 000051, 000054, 00016, 000034, 000035, 0037, 000055, 000024, 000027, 000050, 000020, 000021, 000022, 000023, 000027, 000050, 000020, 000021, 000022, 000023, 000027, 000050, 000020, 000021, 000022, 000023, 000027, 000010, 000049, 000012, 000030, 000031, 000013, 000014, 000032, 000052, 000053, 000064, 000044 o 000066, como se da a conocer en este documento. En algunas formas de realización, el inhibidor se selecciona del grupo que consiste en PBD150, PQ912 y PQ1565.

[0182] En algunas formas de realización, el sujeto tiene una afección que se beneficiaría de la reducción de la unión entre CD47 en la superficie de dicha primera célula y SIRP α en la superficie de dicha segunda célula del sujeto. En algunas formas de realización, la afección comprende la sobreexpresión de CD47 en la superficie de dicha primera célula. En algunas formas de realización, la expresión de CD47 es 1,5 veces mayor, 2,0 veces mayor, 2,5 veces mayor, 3,0 veces mayor o más en células enfermas que en células no enfermas.

[0183] En algunas formas de realización, la afección se selecciona del grupo que consiste en cáncer, aterosclerosis, enfermedades fibróticas y enfermedades infecciosas.

[0184] En algunas formas de realización, la afección es cáncer y el cáncer se selecciona del grupo que consiste en leucemia, leucemia mieloide aguda (LMA), leucemia mieloide crónica, leucemia linfoblástica aguda (LLA), linfoma no Hodgkin (LNH), mieloma múltiple (MM), cáncer de ovario, gliomas, cáncer de colon, cáncer de mama, leiomirosarcoma, tumores neuroendocrinos pancreáticos, cáncer de pulmón de células pequeñas y cáncer de vejiga, HNSCC, cáncer gástrico, cáncer de esófago, T-ALL, glioma, mesotelioma, glioblastoma, melanoma, NSCLC, y otros). En algunas formas de realización, el cáncer es leucemia o leucemia mieloide aguda (LMA).

[0185] En algunas formas de realización, la afección es aterosclerosis.

[0186] En algunas formas de realización, la afección es una enfermedad fibrótica y la enfermedad fibrótica se selecciona del grupo que consiste en fibrosis pulmonar idiopática (FPI), esclerodermia, mielofibrosis, fibrosis renal, fibrosis hepática, fibrosis pulmonar, fibrosis pancreática, fibrosis cardíaca y fibrosis de la vejiga.

[0187] En algunas formas de realización, la afección es una enfermedad infecciosa y la enfermedad infecciosa se selecciona del grupo que consiste en enfermedades causadas por un patógeno seleccionado de un virus, una bacteria o un protozoo. En algunas formas de realización, la enfermedad infecciosa es causada por un patógeno seleccionado del grupo que consiste en un lentivirus, virus linfotrópico T humano (HTLV), un virus hepadna, virus de la hepatitis B, un virus del herpes, virus del papiloma humano, virus de La Crosse, Yersinia sp., Yersinia pestis, Yersinia pseudotuberculosis, Yersinia enterocolitica, Francisella sp., Helicobacter sp., Helicobacter pylori, Pasteurella sp., Vibrio sp., Vibrio cholerae, Vibrio parahemolyticus, Legionella sp., Legionella pneumophila, Listeria sp., Listeria monocytogenes, Mycoplasma sp., Mycoplasma hominis, Mycoplasma pneumoniae, Mycobacterium sp., Mycobacterium tuberculosis, Mycobacterium leprae, Rickettsia sp., Rickettsia rickettsii, Rickettsia typhi, Plasmodium, Trypanosoma, Giardia, Toxoplasma y Leishmania.

EJEMPLOS

EJEMPLO 1

[0188] Cribado basado en citometría de flujo genético haploide

[0188] Con el fin de identificar los reguladores genéticos de la expresión de la superficie de las células CD47, se preparó un lote de células HAP1 mutagenizadas utilizando retrovirus de trampa de genes que expresan proteína fluorescente azul (BFP) como se ha descrito anteriormente (Blomen *et al.* (2015), Science, vol. 350, páginas 1092-1096).

[0189] Brevemente, se sembraron 50 millones de células HAP1 y se transdujeron con virus de dos cosechas combinadas en tres días consecutivos en presencia de 8 μ g/ml de sulfato de protamina (Sigma). Después, la biblioteca mutagenizada se expandió a 30 matraces T175 a una confluencia de aproximadamente el 80 %. Posteriormente, las células se disociaron con tripsina, se lavaron una vez con PBS (Lonza) y se tiñeron con un anticuerpo marcado con FITC dirigido contra CD47 (Biolegend, clon CC2C6, número de catálogo 323106) a una dilución 1:80 durante 30 minutos a 4 °C en 20 ml de PBS que contiene albúmina de suero bovino al 0,5 % p/v (BSA; Sigma) y azida de sodio al 0,2 % p/v (Sigma).

[0190] A continuación, las células se lavaron tres veces con PBS que contenía FCS al 10 % y posteriormente se tiñeron con una IgG de cabra anti-ratón polyclonal marcada con FITC (Biolegend, clon Poly4053, número de catálogo 405319) a una dilución de 1:100 durante 30 minutos a 4 °C en PBS que contenía 0,5 % p/v de BSA y 0,2 % p/v de azida de sodio. Después de dos lavados con PBS que contenía FCS al 10 % y un lavado con PBS, las células se fijaron con BD Fix Buffer I (BD biosciences) durante 10 min a 37 °C.

[0191] Después de lavar dos veces con PBS que contenía FCS al 10 %, las células se filtraron a través de un

5 filtro de 40 μ M (BD Falcon) antes de clasificar dos poblaciones de células (es decir, 'CD47^{BAJO}' y 'CD47^{ALTO}'). Específicamente, la primera población celular denominada 'CD47^{BAJO}' constituye alrededor del 1-2 % de las células que expresan menos CD47 de la población total. La segunda población celular denominada 'CD47^{ALTO}' constituye alrededor del 1-2 % de las células que expresan más CD47 de la población total. Además, para reducir los posibles efectos de confusión de las células diploides que son heterocigóticas para los alelos que llevan integraciones de trampa génica, las células se clasificaron en paralelo según el contenido de ADN (1n) mediante tinción con yoduro de propidio (Life Technologies).

10 [0192] La clasificación de células se llevó a cabo en un clasificador de células Biorad S3 hasta que se recogieron aproximadamente 10 millones de células por población. Las células clasificadas se sedimentaron y el ADN genómico se aisló utilizando un mini kit de ADN (Qiagen). Para ayudar a eliminar la reticulación del ADN genómico, los sedimentos celulares se resuspendieron en PBS complementado con proteinasa K (Qiagen) y después se incubaron durante la noche a 56 °C con tampón de lisis AL (Qiagen) con agitación. Los sitios de inserción de ambas poblaciones de células clasificadas se amplificaron y mapearon en el genoma humano según 15 se ha descrito anteriormente (Blomen *et al.*, 2015) usando una reacción en cadena de polimerasa de amplificación lineal (LAM-PCR) en el rendimiento total de ADN genómico aislado.

20 [0193] En resumen, las muestras se enviaron para una secuenciación profunda y los sitios de inserción de la trampa génica se mapearon y analizaron de la siguiente manera: los sitios de inserción se recuperaron de lecturas recortadas (50b) que se alinearon sin ambigüedades con Hg19 usando Bowtie (Langmead B. *et al.* (2009), Genome Biology, vol. 10, R25) permitiendo un desajuste. Usando intersectBed, las lecturas alineadas se mapearon a coordenadas de genes Refseq que no se superponen. Las inserciones intragénicas de trampas génicas en orientación de sentido con su gen se consideraron disruptivas y se mantuvieron para análisis posteriores. Para cada gen, se comparó el número de inserciones disruptivas únicas entre la población de 25 CD47^{BAJO} y CD47^{ALTO}. Los genes que se enriquecieron significativamente para las inserciones en cualquiera de las dos poblaciones (prueba exacta de Fisher bilateral con corrección de prueba múltiple de Benjamini-Hochberg, $p < 0,05$) se consideraron reguladores de los niveles de superficie celular de CD47. Para reflejar la 30 direccionalidad del efecto sobre la abundancia de CD47, se calculó una puntuación del índice mutacional (MI) de la siguiente manera:

$$\text{Suma de ins. únicas en gen } X \text{ en pob. alta}$$

$$\frac{(\text{Suma de ins. únicas en pob. alta}) - (\text{Suma de ins. únicas en gen } X \text{ en pob. alta})}{(\text{Total de ins. únicas en pob. alta}) - (\text{Suma de ins. únicas en gen } X \text{ en pob. alta})}$$

$$\text{Suma de ins. únicas en gen } X \text{ en pob. baja}$$

$$\frac{(\text{Total de ins. únicas en pob. baja}) - (\text{Suma de ins. únicas en gen } X \text{ en pob. baja})}{(\text{Total de ins. únicas en pob. alta}) - (\text{Suma de ins. únicas en gen } X \text{ en pob. alta})}$$

35 [0194] Para aquellos genes en los que solo en una de las dos poblaciones se identificaron inserciones disruptivas, se asignó 1 inserción a la otra población para evitar que estos genes se omitan de las gráficas de visualización.

Líneas celulares

40 [0195] Las células HAP1 se han descrito previamente (Carette *et al.* (2011), Nature, vol. 477, páginas 340-343). Las células HAP1 se cultivaron en IMDM (ThermoFisher Scientific) complementado con suero de ternero fetal al 10 % (FCS, Sigma), 100 U/ml de penicilina-estreptomicina (ThermoFisher Scientific) y L-glutamina.

45 [0196] Las células A375, A549, DLD1 y RKO se adquirieron de American Type Culture Collection (ATCC). Las células A375 y A549 se cultivaron en DMEM complementado con FCS (8 %) y penicilina-estreptomicina (100 U/ml). Las células RKO y DLD1 se cultivaron en RPMI complementado con FCS (8 %) y penicilina-estreptomicina (100 U/ml).

Tinción de anticuerpos y SIRP α -Fc

50 [0197] Los anticuerpos y la proteína de fusión utilizados se enumeran en la Tabla 1 que se expone a continuación. Los niveles de CD47 en la superficie se evaluaron realizando tinciones inmunohistoquímicas de células con anticuerpos marcados con fluorocromo dirigidos contra CD47 (clones CC2C6, 2D3, B6H12, ver Tabla 1) a una dilución de 1:50 en PBS que contenía 0,5 % p/v de BSA (Sigma) y azida de sodio al 0,2% p/v (Sigma) ("tampón FACS") durante 30 minutos, a 4 °C, protegido de la luz. La unión de SIRP α a CD47 se evaluó mediante 55 la incubación de células con dominio extracelular recombinante de SIRP α humano fusionado con IgG humana ((SIRP α -Fc; proteína químérica Fc SIRP alfa/CD172a humana recombinante, véase la Tabla 1) a una dilución de 1:50 en tampón FACS durante 30 minutos, a 4 °C, protegido de la luz. Después de 1 lavado con tampón FACS para eliminar la SIRP α -Fc no unida, las células se immunotíñeron con un anticuerpo marcado con fluorocromo contra la IgG humana (HP6017, véase la Tabla 1) durante 30 minutos, a 4 °C, protegidas de la luz. Después de 2

lavados con tampón FACS para eliminar el anticuerpo no unido, se analizó la intensidad de tinción inmunohistoquímica o la intensidad de unión en un LSRII (BD Bioscience).

Tabla 1. Lista de anticuerpos e información del proveedor.

Producto	Empresa	N.º de cat.	Dilución utilizada
FITC anti CD47 humana (CC2C6)	BioLegend	323106	1:50
FITC anti CD47 humana (2D3)	BioLegend	11-0478-41	1:50
APC anti CD47 humana (B6H12)	BioLegend	17-0479-41	1:50
Anticuerpo Alexa Fluor® 488 de cabra anti-IgG de ratón (reactividad x mínima) (Poly4053)	BioLegend	405319	1:100
Proteína químérica recombinante humana SIRP alfa/CD172a Fc, CF	R&D Systems	4546-SA-050	1:50
Anticuerpo APC anti Fc de IgG humano (HP6017)	BioLegend	409305	1:100

5

Generación de vectores

[0198] El ADNc de las dos variantes de transcripto de QPCTL, similar a la glutaminil-péptido ciclotransferasa, transcripto 1 (RefSeq: NM_017659.3) ("QPCTL(1)") o similar a la glutaminil-péptido ciclotransferasa, transcripto 2 (RefSeq: NM_001163377.1) ("QPCTL(2)"), se ordenaron como fragmento de gen gBlock optimizado por codón (IDT DNA). QPCTL(1) tiene 7 regiones exónicas y 6 intrónicas, mientras que QPCTL(2) tiene 6 regiones exónicas y 5 intrónicas. QPCTL(1). Efectivamente, QPCTL(1) tiene una región exónica (exón 3/7) que falta en QPCTL(2), que contiene la secuencia de aminoácidos

FLEATLRSLTAGWHVELDPFTASTPLGPVDFGNVVATLDPRAARHLLACHYDSKLFPP

10 GSTPFVGATDSAVPCALLLEAQALDLELSRAKKQ (SEQ ID NO: 10). Se generó una variante de codones optimizados del ADNc de la variante 2 de transcripto de CD47 (RefSeq: NM_198793.2), la variante de transcripto más principal de CD47, para obtener "CD47 WT". Además, se generó un mutante en el que la glutamina (Q) en la posición 19 en el ADNc de CD47 WT con codones optimizados se reemplazó con una aspargina (N) para obtener "CD47 MUT". Todas las construcciones se ordenaron como fragmentos génicos gBlock (IDT DNA) y se 15 clonaron en el vector pCDH-CMV-MCS-EF1-Puro (CD510-B1) que contenía un casete de selección de puromicina, usando los sitios de restricción EcoRI y NotI. Las construcciones se verificaron mediante 20 secuenciación de Sanger.

Generación mediada por CRISPR/Cas9 de células knockout para QPCTL y CD47

[0199] Los ARN guía orientados a QPCTL (5'-CGGGGAGGGCTCCGATCAAT-3' (SEQ ID NO: 1) y 5'-CCTGCTGGTTGTGCGAACCC-3' (SEQ ID NO: 2)) y CD47 (5'-CTACTGAAGTATACGTAAAG-3' (SEQ ID NO: 3) y 5'-CTTGTAGAGCTCCATCAA-3' (SEQ ID NO: 4)) se diseñaron y clonaron en el vector de expresión pX330 (Cong *et al.* (2013) Science, vol. 339, páginas 819-823).

[0200] Las células HAP1 se cotransfectaron con los vectores de ARNg específicos de genes y un plásmido que contenía un casete de expresión para un ARN guía dirigido al gen *TIA* de pez cebra (5'-GGTATGTCGGAACCTCTCC-3' (SEQ ID NO: 5)) seguido de una secuencia promotora de CMV que dirige la expresión de un gen de resistencia a la blasticidina flanqueado por dos sitios de destino *TIA* (Lackner *et al.*, (2015), Nature Comm., vol. 6, página 10237). La cotransfección de estos plásmidos ocasionalmente da como resultado la incorporación del casete de resistencia a la blasticidina en el sitio del locus genómico objetivo mediante la unión de extremos no homólogos, lo que hace que las células sean resistentes a la blasticidina y al mismo tiempo proporciona una etiqueta genómica en el sitio de mutación. Cuatro días después de la transfección de ADN, se complementó el medio de cultivo con 20 µg/ml de blasticidina (Invivogen). Las colonias supervivientes se expandieron clonalmente y sus mutaciones y/o la incorporación genómica del gen de resistencia a la blasticidina se verificaron mediante PCR y secuenciación de Sanger. El locus QPCTL se amplificó usando los cebadores 5'-GTTGAGGTAGGCTGGACCGGATGGTCTTG-3' (SEQ ID NO: 6) y 5'-GGTACCCACCTTATAGGGCTGCTGTTGCC-3' (SEQ ID NO: 7). El locus CD47 se amplificó utilizando los cebadores 5'-CAAAGCTCCAAGCCAGATACTACACCTGCATGTTCC-3' (SEQ ID NO: 8) y 5'-GGCCTCCTCTCGAAAGAGGATCAGGTTGCACC-3' (SEQ ID NO: 9).

[0201] En paralelo, se obtuvo una población policlonal de células knockout CD47 (denominadas en este documento "CD47 poli") mediante clasificación de células HAP1 por citometría de flujo transfectadas con un plásmido que expresa Cas9 y un ARN guía que se dirige a CD47.

[0202] Se utilizaron las siguientes poblaciones celulares:

- HAP1 QPCTL KO clon 10 ("HAP1 QPCTL KO cl10")
- HAP1 QPCTL KO clon 21 ("HAP1 QPCTL KO cl21")
- HAP1 CD47 KO clon 4 ("HAP1 CD47 KO cl4")
- HAP1 CD47 KO clon 17 ("HAP1 CD47 KO cl17")
- HAP1 CD47 KO clon 23 ("HAP1 CD47 KO cl23")

Análisis de citometría de flujo de células

10 [0203] HAP1 de tipo silvestre (WT) o los respectivos mutantes clonales *knockout* (KO) de CD47 o QPCTL se inmunotíñeron para CD47 usando los clones de anticuerpos anti-CD47 CC2C6, 2D3 y B6H12.2, o con el dominio extracelular de SIRP α fusionado con IgG1 humana (SIRP α -Fc) (seguido de tinción inmunohistoquímica con un anticuerpo secundario contra IgG1 humana) y analizado por citometría de flujo (véase la Tabla 1 para obtener información sobre anticuerpos, incluida la dilución utilizada y la información del proveedor).

15 Ensayo de bloqueo de SIRP α -Fc

20 [0204] Las células HAP1 WT, HAP1 CD47 KO o HAP1 QPCTL KO se dejaron sin teñir (es decir, no se expusieron a anticuerpos CD47) o se tiñeron (es decir, se expusieron a anticuerpos anti-CD47 con el fin de enmascarar o bloquear el residuo de piroglutamilo en el extremo N-terminal de CD47) con anticuerpos anti-CD47 clones CC2C6 o 2D3 durante 30 minutos a 4 °C (protegidos de la luz). Luego, las células se lavaron con tampón FACS, tras lo cual se unieron a SIRP α -Fc. Posteriormente, las células se lavaron y se inmunotíñeron con anticuerpo secundario IgG de cabra anti-ratón marcado con AF488 y se analizaron mediante citometría de flujo para revelar los niveles de unión de SIRP α -Fc.

25 Generación y análisis de células que sobreexpresan CD47 y QPCTL

30 [0205] Se transdijeron células HAP1 QPCTL KO ("clon 10" o "clon 21") con un vector lentiviral que contenía el ADNc de QPCTL(1) o QPCTL(2) según se ha descrito anteriormente. Después de 48 horas, las células transducidas se seleccionaron con 2 ug/ml de puromicina durante 72 horas. A continuación, las células se recolectaron y tiñeron con anticuerpo anti-CD47 clones CC2C6, 2D3 o con SIRP α -Fc (seguido de tinción con un anticuerpo secundario contra IgG humana) y se analizaron por citometría de flujo. Consulte la Tabla 1 para obtener información sobre los anticuerpos, incluida la dilución utilizada y la información del proveedor).

35 **Resultados**

Cribado genético basado en flujo para identificar reguladores de CD47

40 [0206] Con el fin de identificar nuevos reguladores de CD47, se utilizó un enfoque de cribado genético directo en células HAP1 humanas haploides, ya que observamos que las células HAP1 expresan CD47.

45 [0207] Se creó una biblioteca de mutantes con pérdida de función en células HAP1 utilizando una versión modificada de una trampa génica retroviral (Jae *et al.* (2013), *Science*, vol. 340, páginas 479-483), se expandieron estas células y se sometieron a una tinción para CD47 en la superficie celular usando un anticuerpo contra CD47 humana (clon CC2C6). Esto dio como resultado la distribución de la intensidad de la señal cuando se analizó mediante citometría de flujo. Para el cribado genético, seleccionamos aquellos mutantes que mostraron la tinción de CD47 más fuerte y más débil y clasificamos aproximadamente 10 millones de células para cada población, y después analizamos sus sitios de integración de trampa génica, de manera similar a lo descrito anteriormente (Blomen *et al.* (2015), *Science*, vol. 350, páginas 1092-1096).

50 [0208] El cribado arrojó un total de 667 resultados donde la pérdida de expresión en este gen da como resultado niveles alterados de CD47. De ellos, 406 valores atípicos ocurrieron en la población de CD47 alto ("CD47^{ALTO}") y 261 valores atípicos en la población de CD47 bajo ("CD47^{BAJO}"). Además del gen que codifica para CD47 en sí, la población de CD47 bajo incluía ELAVL1 (HuR), una proteína de unión a ARN que forma parte de un complejo proteico que se sabe que facilita la translocación de CD47 a la membrana plasmática (Berkovits y Mayr (2015) *Nature*, vol. 522, páginas 363-367) y similar a la glutaminil-péptido ciclotransferasa (QPCTL) (véase la Figura 1).

CC2C6 y SIRP α -Fc del anticuerpo anti-CD47 muestran una unión reducida a las células QPCTL KO HAP1

60 [0209] A continuación, se buscó validar la implicación de QPCTL en la unión del anticuerpo CC2C6 a CD47, y evaluar su implicación en la unión de SIRP α a CD47 mediante la disruptión de QPCTL mediada por Cas9 o, como control, CD47.

65 [0210] Para evaluar el impacto de QPCTL en la expresión de CD47, inmunoteñimos células HAP1 WT, CD47 KO y QPCTL KO con diferentes anticuerpos anti-CD47 (véase la Tabla 1). Observamos que, mientras que la unión

de los anticuerpos anti-CD47 2D3 y B6H12.2 a CD47 en células HAP1 QPCTL KO no se vio afectada, la unión de CC2C6 a CD47 en células HAP1 QPCTL KO disminuyó en comparación con las células HAP1 WT (véase la Figura 2A).

5 [0211] Es importante destacar que la unión de SIRP α -Fc a CD47 en las células HAP1 QPCTL KO en comparación con las células HAP1 WT también disminuyó (Figura 2B). Por lo tanto, QPCTL modifica la unión de CD47 a su ligando fisiológico SIRP α y al anticuerpo anti-CD47 CC26, mientras que los niveles generales de CD47 en la superficie celular, determinados por inmunotinción con los anticuerpos anti-CD47 2D3 y B6H12.2, permanecen inalterados. Para investigar si QPCTL KO tiene el mismo efecto sobre la unión de anticuerpos y SIRP α en otras líneas celulares, se generaron células QPCTL y CD47 KO en la línea celular de melanoma humano A375 y la línea celular de carcinoma rectal humano RKO y se tiñeron con el anticuerpo anti-CD47 CD47 CC2C6, 2D3 o con SIRP α -Fc. Como se ve en las células HAP1 QPCTL KO, la unión de CC2C6 y SIRP α -Fc a CD47 se redujo en las células QPCTL KO en comparación con la línea celular WT parental, mientras que la unión 2D3 permanece inalterada (Figuras 3 y 4). Por lo tanto, el papel de QPCTL en la regulación de la unión de CD47 a su ligando fisiológico SIRP α y al anticuerpo anti-CD47 CC26 se extiende más allá de la línea celular HAP1, y se ha observado en todas las líneas celulares en las que se ha analizado.

El anticuerpo anti-CD47 CC2C6 bloquea la unión de SIRP α -Fc a las células HAP1

20 [0212] Para investigar si el anticuerpo anti-CD47 CC2C6 se une a un sitio en CD47 que se superpone con el sitio de unión de SIRP α , las células HAP1 WT se dejaron sin teñir (es decir, no se sometieron a tinción inmunohistoquímica) o se tiñeron (es decir, se sometieron a tinción inmunohistoquímica) con anticuerpos anti-CD47 CC2C6 o 2D3. Después del lavado, las células se inmunotíñeron con SIRP α -Fc. El análisis de citometría de flujo mostró que cuando las células se tiñeron por primera vez con anti-CD47 clon 2D3, la posterior unión de SIRP α -Fc a CD47 no se vio afectada (Figura 5). Por el contrario, cuando las células se tiñeron primero con el anticuerpo anti-CD47 CC2C6, la unión posterior de SIRP α -Fc a las células HAP1 disminuyó, lo que demuestra que el clon anti-CD47 CC2C6 y SIRP α -Fc interactúan con la misma superficie de CD47.

Restauración del anticuerpo anti-CD47 CC2C6 y unión de SIRP α -Fc a células QPCTL KO por transducción con la variante 1 de transcripto QPCTL

30 [0213] Para investigar si la disminución de la unión del clon CD47 CC2C6 a CD47 en las células HAP1 QPCTL KO podría rescatarse mediante la reconstitución genética de QPCTL, las células HAP1 QPCTL KO se transdujeron con un vector que expresa el ADNc de la variante 1 de transcripto QPCTL ("QPCTL(1)") o variante 2 de transcripto QPCTL ("QPCTL (2)") según se ha descrito anteriormente. Después de la selección, las células se inmunotíñeron con anticuerpos anti-CD47 CC2C6 o 2D3, o con SIRP α -Fc. La unión del anticuerpo anti-CD47 2D3 no se vio afectada por la introducción de QPCTL(1) o QPCTL(2). Por el contrario, la unión de CC2C6 y SIRP α -Fc a las células CD47 HAP1 QPCTL KO aumentó en las células que sobreexpresaron QPCTL(1), al nivel observado para las células HAP1 WT (Figura 6). La variante 1 de transcripto QPCTL es el transcripto dominante, mientras que el transcripto 2 de QPCTL se considera el transcripto secundario.

La mutagénesis del extremo N-terminal de CD47 impide la unión del anticuerpo anti-CD47 CC2C6 y de SIRP α -Fc

40 [0214] Para investigar si el aminoácido glutamina (Q) que está presente en el extremo N-terminal de CD47 después de la eliminación del péptido señal está involucrado en la unión al clon anti-CD47 CC2C6 y SIRP α -Fc, se generó una proteína CD47 mutante en la que la Q del extremo N-terminal muta a una asparagina (N) ("CD47 MUT"). A continuación, se transdujeron células HAP1 CD47 KO ("clon 4", "clon 17" y "clon 21") con un vector lentiviral que codifica CD47 de tipo silvestre (WT) o CD47 MUT, inmunotíñido con anticuerpos anti-CD47 CC2C6 y clon 2D3, o con SIRP α -Fc. Tanto los anticuerpos como SIRP α -Fc podrían unirse a las células HAP1 CD47 KO que se diseñaron para expresar la variante de tipo silvestre de CD47. Por el contrario, solo el clon 2D3 podía unirse a las células HAP1 CD47 KO que se diseñaron para expresar la forma mutante de CD47 (Figura 7).

Inhibición de molécula pequeña de glutaminil ciclasa

45 [0215] En este caso nos propusimos investigar si la inhibición de la actividad de la piroglutaminil ciclasa por medio de un inhibidor de molécula pequeña da como resultado una disminución de la unión del clon CC2C6 anti-CD47. Para este experimento elegimos PBD150 como inhibidor de piroglutamilo (QPCT, QPCTL) (Schilling *et al.* (2008), *Nature medicine*, vol. 14, páginas 1106-1111). Las células HAP1 se cultivaron durante 72 horas con PBD150 o vehículo y se evaluaron los niveles del clon CC2C6 de CD47. El análisis de citometría de flujo mostró que cuando las células se incubaron con PBD150 (1000 microM), se unieron niveles reducidos de CC2C6 a la superficie, de manera dependiente de la dosis (Figura 8A). Para determinar si la unión de CC2C6 disminuyó transitoriamente, cultivamos posteriormente las células durante 48 horas sin PBD150. El análisis de citometría de flujo mostró que la unión de CC2C6 a las células se restableció a niveles normales, lo que indica claramente que es un proceso reversible (Figura 8B). Por lo tanto, la inhibición tanto genética como farmacológica de las piroglutaminil ciclasas (QPCTL) derivó en una disminución de la unión a CC2C6.

[0216] A continuación, las células HAP1, RKO, A375, A549 y DLD1 se trataron durante 72 horas con PBD150 (1000 microM) o vehículo y el medio se actualizó cada 24 horas. El análisis de citometría de flujo mostró que la unión de CC2C6 y SIRPa-Fc disminuyó en relación con las células que se incubaron con PBD150, mientras que

5 la unión de 2D3 permaneció sin cambios (Figura 9). Por lo tanto, la inhibición tanto genética como farmacológica de las piroglutaminil ciclasas (QPCTL) resultó en una disminución de la unión de CC2C6 y SIRPa-Fc en 5 líneas celulares diferentes.

EJEMPLO 2

10 **Materiales y métodos**

Cribado basado en citometría de flujo genético haploide

15 [0217] Se prepararon células HAP1 mutagenizadas usando retrovirus de trampa génica que expresan proteína fluorescente azul (BFP). En resumen, se sembraron 50 millones de células HAP1 y se transdujeron con virus de dos cosechas combinadas en tres días consecutivos en presencia de 8 µg/ml de sulfato de protamina (Sigma). La biblioteca de células mutagenizadas se expandió entonces a 30 matraces T175 a una confluencia de

20 aproximadamente el 80 %. Posteriormente, las células se disociaron con tripsina, se lavaron una vez con PBS (Lonza) y se tiñeron con α CD47-CC2C6 marcado con FITC (Biolegend, clon CC2C6, número de catálogo 323106) a una dilución de 1:80 durante 30 min a 4 °C en 20 ml de PBS que contenía albúmina de suero bovino al 0,5 % p/v (BSA; Sigma) y azida de sodio al 0,2 % p/v (Sigma). Posteriormente, las células se lavaron tres veces con PBS que contenía FCS al 10 % y se tiñeron con IgG de cabra anti-ratón polyclonal marcada con FITC (Biolegend, clon Poly4053, número de catálogo 405319) a una dilución de 1:100 durante 30 minutos a 4 °C en

25 PBS que contenía un 0,5 % p/v de BSA y un 0,2 % p/v de azida de sodio. Tras dos lavados con PBS que contenía FCS al 10 % y un lavado con PBS, las células se fijaron con BD Fix Buffer I (BD Biosciences) durante 10 min a 37 °C. Después de lavarlas dos veces con PBS que contenía FCS al 10 %, las células se filtraron a través de un filtro de 40 µm (BD Falcon) antes de aislar las dos poblaciones celulares de interés (es decir, 'CD47-

30 CC2C6^{BAJO} y 'CD47-CC2C6^{ALTO}') mediante clasificación celular activada por fluorescencia. Específicamente, la primera población celular, denominada 'CD47-CC2C6^{BAJO}', constituye aproximadamente el 1-2 % de las células con el nivel más bajo de unión a α CD47-CC2C6. La segunda población celular, denominada 'CD47-CC2C6^{ALTO}', constituye aproximadamente el 1-2 % de las células con el nivel más alto de unión a α CD47-CC2C6.

35 [0218] Para reducir los posibles efectos de confusión de las células diploides que son heterocigóticas para los alelos que llevan integraciones de trampa génica, la clasificación celular se restringió a las células con un contenido de ADN 1n, determinado mediante tinción con yoduro de propidio (Life Technologies). La clasificación de células se llevó a cabo en un clasificador de células Biorad S3 hasta que se recolectaron aproximadamente 10 millones de células para cada población.

40 [0219] Las células clasificadas se sedimentaron y se aisló el ADN genómico utilizando un mini kit de ADN (Qiagen). Para ayudar a eliminar el entrecruzamiento del ADN genómico, los sedimentos celulares se resuspendieron en PBS complementado con proteinasa K (Qiagen), seguido de una incubación durante la noche a 56 °C en tampón de lisis AL (Qiagen) con agitación. Los sitios de inserción presentes en ambas poblaciones de

45 células clasificadas se amplificaron y mapearon en el genoma humano mediante una reacción en cadena de la polimerasa de amplificación lineal (LAM-PCR) sobre el rendimiento total de ADN genómico aislado.

50 [0220] Las muestras se enviaron para secuenciación profunda y los sitios de inserción de la trampa génica se mapearon y analizaron de la siguiente manera: los sitios de inserción se recuperaron de lecturas recortadas (50b) que se alinearon sin ambigüedades con Hg19 usando Bowtie, lo que permitió una falta de coincidencia.

55 Usando intersectBed, las lecturas alineadas se mapearon a coordenadas de genes Refseq que no se superponen. Las inserciones intragénicas de trampas génicas en la orientación de sentido dentro de su gen se consideraron disruptivas y se mantuvieron para un análisis posterior. Para cada gen, se comparó el número de inserciones disruptivas únicas entre la población de CD47-CC2C6^{BAJO} y CD47-CC2C6^{ALTO}. Los genes que se

55 enriquecieron significativamente para las inserciones en cualquiera de las dos poblaciones (prueba exacta de Fisher bilateral con corrección de prueba múltiple de Benjamini-Hochberg, $P < 0,05$) se consideraron reguladores de la unión de CD47-CC2C6. Para reflejar la direcciónalidad del efecto en la abundancia de CD47, se calculó una puntuación de índice mutacional (MI) de la siguiente manera:

$$\text{Suma de ins. únicas en gen X en pob. alta}$$

$$(\text{Suma de ins. únicas en pob. alta}) - (\text{Suma de ins. únicas en gen X en pob. alta})$$

$$\text{Suma de ins. únicas en gen X en pob. baja}$$

$$\frac{1}{(\text{Total de ins. únicas en pob. baja}) - (\text{Suma de ins. únicas en gen X en pob. baja})}$$

[0221] Para aquellos genes para los que se identificaron inserciones disruptivas en solo una de las dos poblaciones, se asignó una inserción a la otra población para permitir la inclusión de estos genes en gráficos de visualización.

5

Líneas celulares

[0222] Las células HAP1 se han descrito previamente (Carette, JE *et al.* *Nature*, 2011; 477, 340-343). Las células A375, A431, A549, Ba/F3, DLD1, RKO, Raji y SKBR3 se adquirieron de American Type Culture Collection (ATCC). Las células B16F10 fueron proporcionadas amablemente por D. Peepo, las células B16-GM-CSF fueron proporcionadas amablemente por N. Haining.

[0223] Las células HAP1 se cultivaron en IMDM (ThermoFisher Scientific) complementado con suero de ternero fetal al 10 % (FCS, Sigma), 100 U/ml de penicilina-estreptomicina (ThermoFisher Scientific) y L-glutamina. Se cultivaron células A375, A549, B16F10 y B16-GM-CSF en DMEM complementado con FCS al 10 % y 100 U/ml de penicilina/estreptomicina. Se cultivaron células A431, DLD1 y Raji en RPMI complementado con FCS al 10 % y 100 U/ml de penicilina/estreptomicina. Las células Ba/F3-Her2 se cultivaron en RPMI complementado con FCS al 10 %, 100 U/ml de penicilina/estreptomicina, 0,2 ng/ml de IL-3 de ratón (Immunotools) y 5,0 µg/ml de puromicina. Las células SKBR3 se cultivaron en IMDM complementado con FCS al 20 % y 100 U/ml de penicilina-estreptomicina.

Citometría de flujo

[0224] Se utilizaron los siguientes anticuerpos y dominios extracelulares recombinantes de SIRP α : anti-CD47 humana: CC2C6 (BioLegend), anti-CD47 humana: 2D3 (BioLegend), anti-CD47 humana: B6H12 (BioLegend), anti-CD47 de ratón: MIAP301 (BioLegend), proteína químérica SIRP alfa/CD172a Fc humana recombinante (R&D Systems), proteína químérica SIRP alfa/CD172a Fc recombinante de ratón (R&D Systems), IgG de cabra anti-ratón: Poly4053 (BioLegend), IgG anti-humana Fc: HP6017 (BioLegend).

[0225] La unión a la superficie celular de CD47 se evaluó mediante tinción de células con anticuerpos marcados con fluorocromo dirigidos contra CD47 humana (clones CC2C6, 2D3, B6H12) o CD47 de ratón (clon MIAP301) a una dilución de 1:50 (o 1:80 en caso de dobles tinciones α CD47-CC2C6/ α CD47-B6H12) en PBS que contenía un 0,5 % p/v de BSA (Sigma) y un 0,2 % p/v de azida de sodio (Sigma) ("tampón FACS") durante 30 min, a 4 °C, protegido de la luz. La unión de SIRP α a CD47 se evaluó incubando células con SIRP α humano recombinante (hSIRP α -Fc) o SIRP α de ratón recombinante (mSIRP α -Fc) a una dilución de 4 µg/ml o 2 µg/ml, respectivamente, en tampón FACS durante 30 min a temperatura ambiente, protegido de la luz. Después de un lavado con tampón FACS para eliminar la SIRP α -Fc no unida, las células se inmunotíñeron con un anticuerpo de ratón marcado con fluorocromo contra IgG humana (HP6017) o un anticuerpo políclonal de cabra contra IgG de ratón, a una dilución de 1:100 durante 30 minutos, a 4 °C, protegido de la luz. Después de las tinciones de anticuerpos indicadas, las células se lavaron con tampón FACS para eliminar el anticuerpo no unido y se añadió DAPI para permitir la exclusión de células muertas y las muestras se analizaron en un LSRII o LSR-Fortessa (BD Bioscience).

[0226] Las células Ba/F3-Her2 y efectoras recuperadas del peritoneo de ratones BALB/c transgénicos FcaRI se analizaron después de la incubación con suero de ratón normal al 5 % durante 45 min a 4-7 °C. Posteriormente, las células se tiñeron durante 45-60 min a 4-7 °C con los siguientes anticuerpos marcados con fluorescencia para determinar la composición de los infiltrados inmunitarios: anti B220 de ratón (RA3-6B2), anti CD3 ϵ de ratón (145-2C11), anti MHC clase II de ratón (M5/114.15.2), anti CD89 humano (A59), anti CD80 de ratón (53-6.7), anti Ly-6G de ratón (1A8), anti CD45 de ratón (30-F11), anti CD4 de ratón (RM4-5), anti Fc γ IV de ratón (CD16.2, 9E9), anti F4/80 de ratón (BM8) (Biolegend), anti CD11b de ratón (m1/70) y anti Siglec-F de ratón (E50-2440) (BD Biosciences). Las mediciones se realizaron en un FACSCantoll (BD Biosciences), los datos se analizaron utilizando el software FACS Diva (BD Biosciences).

Generación de vectores

[0227] El ADNc de las dos variantes de transcripto humano de QPCTL, similar a la glutaminil-péptido ciclotransferasa, transcripto 1 (RefSeq: NM_017659.3) y similar a la glutaminil-péptido ciclotransferasa, transcripto 2 (RefSeq: NM_001163377.1), se ordenaron como fragmentos génicos optimizados por codón gBlock (IDT DNA) que codifican una etiqueta FLAG N-terminal. QPCTL(1) consta de 7 exones, mientras que QPCTL(2) consta de 6 exones, sin una región exónica (exón 3) que codifica la secuencia de aminoácidos:

60

[0228] FLEATLRSLTAGWHVELDPFTASTPLGPVDFGNVATLDPRAARHLLTACHYDSKLFPP GSTPFVGATDSAVPCALLLELAQALDLELSRAKKQ (SEQ ID NO: 11). El ADNc de la variante de transcripto de *mus musculus* de QPCTL (RefSeq: NM_026111.3) ("mQPCTL"), se ordenó como un fragmento de gen gBlock optimizado por codón. Una variante optimizada por codón del ADNc de la variante 2 del transcripto de CD47 (RefSeq: NM_198793.2), la variante de transcripto de CD47 más abundante que contiene la región larga 3' no traducida, se generó como un fragmento de gen gBlock que codifica una etiqueta HA C-terminal. El vector

lentiviral pCDH-CMV-MCS-EF1-Puro que codifica el QPCTL-WT humano marcado con His C-terminal (ENST00000012049.9) y el mutante QPCTL (D326E) se generaron mediante la clonación de fragmentos de gen gBlock digeridos con Spel y EcoRI en pCDH-CMV-MCS-EF1-Puro digerido con NheI y EcoRI. Todas las demás construcciones se clonaron en el vector pCDH-CMV-MCS-EF1-Puro (CD510-B1) que contenía un casete de selección de puromicina, o en el vector pCDH-CMV-MCS-mPGK-BSR (amablemente proporcionado por R. Agami) que contenía un casete de selección de blasticidina usando los sitios de restricción EcoRI y NotI. Las construcciones se verificaron mediante secuenciación de Sanger.

Generación mediada por CRISPR/Cas9 de CD47, células knockout QPCTL

[0229] Para generar células HAP1 CD47- y QPCTL-knockout, las células se cotransfectaron con el vector PX330 que contenía ARNg específico del gen contra QPCTL o CD47 y un plásmido que contenía un casete de expresión para un ARN guía dirigido al gen *TIA* de pez cebra (5'-GGTATGTCGGAACCTCTCC-3' (SEQ ID NO: 5)) seguido de una secuencia promotora de CMV que dirige la expresión de un gen de resistencia a la blasticidina flanqueado por dos sitios de destino *TIA*. La cotransfección de estos plásmidos ocasionalmente da como resultado la incorporación del casete de resistencia a la blasticidina en el sitio del locus genómico objetivo mediante la unión de extremos no homólogos, lo que hace que las células sean resistentes a la blasticidina y al mismo tiempo proporciona una etiqueta genómica en el sitio de la mutación. Cuatro días después de la transfección de ADN, se complementó el medio de cultivo con 20 µg/ml de blasticidina (Invivogen). Las colonias supervivientes se expandieron clonalmente y sus mutaciones y/o la incorporación genómica del gen de resistencia a la blasticidina se verificaron mediante PCR y secuenciación de Sanger.

[0230] Para generar líneas celulares CD47- y QPCTL-knockout A431, A375, A549, DLD1, RKO y SKBR3, las células se transfecaron con el vector pLentiCRISPR v.2 (Addgene 52961) que codifica ARNsg dirigido al gen QPCTL o CD47. Un día después de la transfección, se complementó el medio de cultivo con 2 µg/ml de puromicina durante dos días. Se expandieron los clones de una sola célula y se validó la disupción del gen mediante la secuenciación del locus del gen, el análisis TIDE y, en el caso de CD47, la citometría de flujo.

[0231] Para generar células B16F10 de CD47- y QPCTL-knockout a granel, las células se transfecaron con el vector pLentiCRISPR v.2. que codifica ARNsg dirigido al gen murino QPCTL o CD47. Un día después de la transfección, se complementó el medio de cultivo con 2 µg/ml de puromicina durante dos días. Las células seleccionadas se expandieron y clasificaron sobre la base de amCD47-MIAP301^{BAJO} mSIRPa-Fc^{BAJO} (en el caso de inactivación de CD47) y amCD47-MIAP301^{ALTO} mSIRPa-Fc^{BAJO} (en el caso de la inactivación de QPCTL) para obtener poblaciones knockout a granel.

[0232] Se generaron células Ba/F3 que expresan Her2 mediante transducción retroviral con HER2 humano (pMX-puro-Her2), y se seleccionaron clones positivos usando puromicina. Para generar células knockout Ba/F3-Her2 CD47 y QPCTL, se usó la nucleofección para administrar el vector pLentiCRISPR v.2. que codifica ARNsg dirigido al gen murino QPCTL o CD47, junto con un plásmido que contiene Cas9 y un casete de resistencia a la blasticidina y GFP. Un día después de la nucleofección, se complementó el medio de cultivo con 2 µg/ml de blasticidina durante dos días. Las células seleccionadas se expandieron y clasificaron para obtener poblaciones knockout a granel. A continuación, se aislaron células individuales y se expandieron para obtener poblaciones knockout clonales.

Generación y análisis de células que sobreexpresan CD47 y QPCTL

[0233] Se transdujeron células A375 de tipo silvestre y QPCTL-knockout (clon 4.1) con un vector lentiviral pCDH-Puro que contenía ADNc que codifica CD47 más una etiqueta HA C-terminal (CD47-HA) y que incluye la región no traducida larga 3' de CD47. Dos días después de la transducción, las células se seleccionaron con 2 µg/ml de puromicina de dos a tres días.

[0234] Se transdujeron células A375 QPCTL-knockout (clon 4.1 y clon 4.6), células A431 QPCTL-knockout (clon 6 y clon 11) y células A549 QPCTL-knockout (clon 3 y clon 9) con un vector lentiviral pCDH-Puro que contenía ADNc que codifica la QPCTL(1)-FLAG humana (y también QPCTL(2)-FLAG en el caso de A375), como se ha descrito anteriormente. Se transdujeron células B16F10 QPCTL-knockout (a granel KO n.º 1 y KO n.º 2) y células Ba/F3-Her2 QPCTL-knockout (clon 8 y clon 30) con un vector lentiviral que contenía ADNc que codifica QPCTL-FLAG de ratón, como se ha descrito anteriormente. Dos días después de la transducción, las células se seleccionaron con 2 µg/ml de puromicina durante entre dos y tres días.

Tratamiento SEN177 y PQ912

[0235] Para el análisis de citometría de flujo, las células se sembraron en placas por triplicado en el medio apropiado que contenía DMSO al 0,03 % (v/v) (control del vehículo), 10 µM de SEN177 (Sigma Aldrich) o 10 µM de PQ912 (Syncrom). El DMSO o el inhibidor se renovaron todos los días y, después de cuatro días, las células se analizaron mediante citometría de flujo.

Inmunoprecipitación, SDS-PAGE, análisis de Western blot e isoelectroenfoque

[0236] Para SDS-PAGE y análisis de Western blot, las células se sembraron en placas para obtener una confluencia del 70-90 % al día siguiente. El día del análisis, las células se lavaron con PBS y se lisaron con tampón RIPA (1 % Triton, 0,1 % SOC, 0,1 % SDS, 1 mM EDTA, 10 mM Tris pH 8,0, 140 mM NaCl) complementado con cóctel inhibidor de proteasa (Roche) y 1 mM PMSF (Sigma). Después de 30 minutos de incubación en hielo, los lisados celulares se centrifugaron a 20 000 g durante 20 minutos a 4 °C. Los sobrenadantes se procesaron posteriormente y las concentraciones de proteínas se midieron utilizando el kit de ensayo de proteínas Pierce BCA, de acuerdo con las instrucciones del fabricante (ThermoFisher Scientific).

10 Posteriormente se procesaron cantidades equivalentes de sobrenadantes de proteínas utilizando un sistema de electroforesis Novex NuPAGE (ThermoFisher Scientific) y un sistema de transferencia Trans-Blot Turbo (Bio-Rad), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se detectó la expresión de QPCTL(1)-FLAG o QPCTL(2)-FLAG usando anti-FLAG® M2 (Sigma) (1:1000) y anti HRP de ratón (dilución 1:10.000).

15 [0237] Para el análisis de inmunoprecipitación y pulso-caza, se sembraron en placas células A375 WT y QPCTL KO que sobreexpresaban células CD47-HA o CD47 KO para obtener una confluencia del 70-90 % al día siguiente y, cuando estaba indicado, se trataron con 10 µM inhibidor SEN177 durante 16 h. El día del análisis, las células se privaron de alimento en medio libre de metionina y cisteína durante 1 hora a 37 °C. Posteriormente, las células se marcaron con pulsos de 0,75 mCi/600 µl [³⁵S]Cys/[³⁵S]Met (PerkinElmer) durante el período de tiempo indicado. Las células se lavaron con PBS para eliminar el [³⁵S]Cys/[³⁵S]Met residual y después se cultivaron en medio regular con 1 mM metionina y cisteína "frías" durante el período de tiempo indicado. Las células se lisaron y la incorporación de [³⁵S]Cys/[³⁵S] se midió mediante la precipitación con TCA de alícuotas de lisados en papel Whatman de 3 MM y el recuento en un contador de centelleo Perkin Elmer LSC 2800 ultima gold. A continuación, con fines de preclarado e IP, el control de isotipo kappa de IgG1 de ratón purificado (Biologend, 400102), anticuerpo anti-CD47 humana B6H12.2 (Novus, NBP2-31106) y anticuerpo anti-CD47 humana purificado CC2C6 (Biologend, 323102) se unió a Dynabeads recubiertas con proteína G (ThermoFisher Scientific) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los lisados de proteínas se incubaron con mezclas de perlas/control de isotipo kappa de IgG1 de ratón durante 1 hora a 4 °C para reducir la unión inespecífica. A continuación, los sobrenadantes proteicos previamente aclarados se incubaron con mezclas de perlas anti-CD47 B6H12.2 o anti-CD47 CC2C6 a 4 °C durante la noche. Los inmunoprecipitados se dejaron sin tratar con endoglucosidasa H (EndoH, New England Biolabs) o N-glucosidasa F (PNGase F, New England Biolabs), según las instrucciones del fabricante. A continuación, los inmunoprecipitados se calentaron a 50 °C durante 10 min con tampón Laemmli 2x y se analizaron utilizando un sistema de electroforesis en gel Novex NuPAGE (Thermo Fisher Scientific). Los geles se trataron con 1 M salicilato de Na de pH 5,6 antes del secado y luego se analizaron en pantallas de imágenes de fósforo Fujifilm BAS-MP a 4 °C. Las pantallas se analizaron en un escáner láser Typhoon FLA 9500.

40 [0238] Se realizó 1D-IEF esencialmente como se ha descrito anteriormente (Neefjes, J. J. et al., Hum. Immunol., 1986; 16, 169-181). Los inmunoprecipitados de las líneas celulares indicadas se prepararon como se ha descrito anteriormente y se eluyeron con 30 µl de tampón IEF (9,0 M urea, Triton-X100 al 2 %, anfolita al 2 % (v/v) pH 3-10, beta-mercaptop-etanol al 5 %), y las muestras se analizaron en geles IEF recién preparados (9,5 M urea, Triton-X100 al 2 %, acrilamida al 4,5 %/bisacrilamida al 0,24 %, anfolita al 4 % pH 5-7, anfolita al 1 % pH 3-10, anfolita al 0,4 % pH 6,5 -9), que se ejecutó durante 16 horas. A continuación, el gel se fijó con ácido acético al 10 %, metanol al 45 % y se secó. Los geles se expusieron en una placa de imágenes Fuji y se leyeron en un escáner láser Typhoon FLA 9500.

ADCC de células diana Ba/F3-Her2 marcadas con ⁵¹Cr por células efectoras humanas

50 [0239] Brevemente, se marcaron 1×10⁶ células diana con 100 µCi (3,7 MBq) ⁵¹Cr durante 2 h. Después de un lavado extenso, el número de células se ajustó a 1 × 10⁵/ml. La fracción de leucocitos polimorfonucleares (PMN) de sangre periférica de donantes sanos (UMC Utrecht, Utrecht) se aisló mediante separación Ficoll/Histopaque (GE Healthcare; Sigma-Aldrich). Se añadieron células efectoras y células diana a placas de microtitulación de fondo redondo (Corning Incorporated) (proporción E:T = 40:1), en presencia de la concentración indicada de un anticuerpo Her2. Tras 4 h de incubación a 37 °C, se midió la liberación de ⁵¹Cr. El porcentaje de lisis específica se calculó utilizando la siguiente fórmula: ((cpm experimental - cpm basal)/(cpm máximo - cpm basal)) × 100, con la lisis máxima determinada en presencia de 3 % de tritón y la lisis basal determinada en ausencia de anticuerpo y células efectoras. Para los experimentos con SEN177, se añadió 10 µM SEN177 o DMSO tres días antes del ensayo, se añadió justo el día del ensayo y se mantuvo presente durante el ensayo. Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

ADCC de células diana Ba/F3-Her2 marcadas con ⁵¹Cr por células efectoras de ratón

60 [0240] En pocas palabras, para obtener células efectoras de ratón, se recogió sangre de ratones Balb/c transgénicos Fc α RI humanos estimulados con factor estimulante de colonias de granulocitos pegilados (G-CSF) del plexo retroorbital en tubos de heparina de litio. Los eritrocitos se lisaron mediante incubación en agua durante

30 min y los leucocitos totales se resuspendieron en medio (la mitad del volumen del volumen de sangre original). Se añadieron por pocillo 50 μ l de leucocitos totales, que contenían -70 % de PMN.

Ensayos de destrucción *in vivo*

- 5 [0241] El modelo de tumor peritoneal Ba/F3 en ratones transgénicos de Fc α R humano se ha descrito previamente (P. Boross *et al.*, EMBO Mol Med. 5, 1213-1226 (2013)). Brevemente, las células Ba/F3-Her2 y Ba/F3-Her2 CD47 KO o Ba/F3-Her2 QPCTL KO se marcaron con 10 μ M o 2 μ M violeta CT (Invitrogen, ThermoFisher) respectivamente, durante 15 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se generaron mezclas 1:1 de células Ba/F3-Her2 y Ba/F3-Her2 CD47 KO, o células Ba/F3-Her2 y Ba/F3-Her2 QPCTL KO. Posteriormente, a los ratones se les inyectó por vía intraperitoneal 1×10^7 células, en 200 μ l de PBS. Justo después de la inyección de células tumorales, los ratones recibieron PBS o 100 μ g de 1-Her2 mediante inyección intraperitoneal. Dieciséis horas después de la inyección, se sacrificó a los ratones, se lavó la cavidad peritoneal con PBS que contenía 5 mM EDTA, se determinó el número absoluto de células Ba/F3-Her2, Ba/F3-Her2 CD47 KO y Ba/F3-Her2 QPCTL KO mediante citometría de flujo utilizando tubos TruCount (BD Biosciences), y se calculó la proporción de células Ba/F3-Her2 y Ba/F3-Her2 CD47 KO o Ba/F3 QPCTL KO. Los tipos de células efectoras indicadas se midieron en el peritoneo mediante tinción con los anticuerpos indicados y cuantificación relativa a una cantidad constante de microesferas de citometría de flujo (Invitrogen).
- 10 [0242] El uso de muestras de sangre humana y de ratones en los experimentos descritos fue aprobado por el comité ético de Ámsterdam y el comité IVD de Utrecht.

Resultados

- 15 [0243] Para revelar nuevos determinantes genéticos de la unión de CD47-SIRPa, se realizó un cribado genético de haploides basado en clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS) usando un anticuerpo contra CD47 humana (α CD47-CC2C6) que se une al sitio de reconocimiento de SIRPa. El análisis de los sitios de integración de la trampa génica en células con unión alterada de α CD47-CC2C6 reveló dos fuertes aciertos, el propio gen CD47, y la enzima similar a la glutaminil-péptido ciclotransferasa (QPCTL, isoQC) (Figura 10A).
- 20 [0244] Para determinar cómo influye QPCTL en la proteína CD47, generamos células HAP1 deficientes en CD47 y QPCTL. La deficiencia de CD47 condujo a una unión deficiente tanto de SIRPa recombinante (SIRPa-Fc) como de todos los anticuerpos anti-CD47 analizados (α CD47-CC2C6, α CD47-2D3, α CD47-B6H12). Por el contrario, QPCTL-knockout afectó selectivamente la unión de SIRPa y α CD47-CC2C6 recombinantes, mientras que los niveles generales de CD47 en la superficie celular, determinados por la unión de otros anticuerpos anti-CD47 (α CD47-2D3 y α CD47-B6H12), permanecieron inalterados (Fig. 10B, C y D). El papel de QPCTL como modificador de CD47 no se restringió a HAP1, sino que también se observó en células cancerosas de melanoma maligno (A375), carcinoma epidermoide (A431), cáncer de pulmón (A549), cáncer colorrectal (DLD1) y carcinoma rectal (RKO) (Fig. 10E y Fig. 14A, B y C). Los experimentos de reconstitución demostraron que esta actividad está codificada por la variante 1 del transcripto de QPCTL (Fig. 15A, B, C y D), y la introducción de una variante de QPCTL catalíticamente muerta (D326E, basada en la homología con QPCT) demostró que la actividad enzimática de QPCTL es esencial para su papel como modificador de CD47 (Fig. 15E, F).
- 25 [0245] Para evaluar en qué parte del ciclo de vida de la proteína QPCTL modifica CD47, se analizó el destino de las moléculas de CD47 en células de melanoma de tipo silvestre y QPCTL-knockout transducidas con un producto del gen CD47 marcado con HA mediante análisis de pulso y caza. La comparación de inmunoprecipitados obtenidos con α CD47-CC2C6 y α CD47-B6H12 reveló una pérdida selectiva de la conformación CD47 reconocida por α CD47-CC2C6 en células deficientes en QPCTL (Fig. 11A). En todos los puntos de tiempo analizados, α CD47-CC2C6 no pudo aislar niveles perceptibles de proteína CD47, lo que indica que la formación de piroglutamato en CD47 depende estrictamente de QPCTL y no implica un nivel apreciable de conversión espontánea. La modificación de CD47 mediada por QPCTL ocurre muy temprano en el ciclo de vida de la proteína, como lo demuestra la presencia de moléculas de CD47 reactivas a α CD47-CC2C6 que son sensibles a la desglicosilación por endoglucosidasa H, lo que indica residencia en el retículo endoplásmico/Golgi temprano (Fig. 11A), y como se demuestra por el hecho de que ya se alcanza un nivel máximo de CD47 modificado con piroglutamato después de un marcaje de 10 minutos (Fig. 11B).

30 [0246] El tratamiento con el inhibidor de la glutaminil ciclase SEN177 (IC_{50} de 0,013 μ M para QPCTL) redujo la tinción de SIRPa-Fc para 8 de las 8 líneas celulares analizadas (Fig. 12A y B, Fig. 16A), y en la misma medida que se observa en las células deficientes en QPCTL (Fig. 10C, D y E, Fig. 14), mientras que los niveles de CD47 en la superficie no se vieron afectados. El tratamiento con el inhibidor de glutaminil ciclase PQ912 produjo resultados similares (Fig. 16B y C).

35 [0247] Tras la ciclación de un residuo N-terminal para formar un piroglutamato, un grupo amino saliente se reemplaza por un grupo hidroxilo, alterando así el punto isoeléctrico (pI) de la molécula. Se usó isoelectroforesis unidimensional (1D-IEF) para visualizar esta alteración de pI de CD47 marcado con HA en células de melanoma A375 de tipo silvestre y QPCTL-knockout. CD47 de células QPCTL-knockout se caracterizó por un pI aumentado

en comparación con CD47 de células de tipo silvestre (Fig. 12C). Además, el tratamiento con SEN177 aumentó el pl de CD47 presente en las células de tipo silvestre al de las células QPCTL-*knockout*, pero no afectó al pl de las moléculas de CD47 aisladas de las células QPCTL-*knockout*. Como segundo enfoque para evaluar en qué medida la inhibición de moléculas pequeñas puede influir en la modificación de CD47, se realizó un análisis 5 Western blot en inmunoprecipitados de CD47 marcado con HA de células no tratadas o tratadas con SEN177. SEN177 resultó en una inhibición casi completa de CD47 modificado con piroglutamato (Fig. 3D). El tratamiento con SEN177 de células de cáncer de pulmón (A549) y carcinoma epidermoide (A431) deficientes en QPCTL no redujo más la unión de SIRPa, según lo evaluado por citometría de flujo (Fig. 12D). Juntos, estos datos 10 demuestran que los inhibidores de la glutaminil ciclase alteran la proteína CD47 al inhibir la función QPCTL, y que el bloque resultante en CD47 modificado con pE está casi completo.

[0248] El papel de QPCTL como modificador de la proteína CD47 se conservó en ratones. Específicamente, la 15 deleción de QPCTL en células de melanoma B16F10 o células Ba/F3 pro-B redujo la unión de SIRPa murino (mSIRPa-Fc), y esto podría restaurarse mediante la sobreexpresión lentiviral (Fig. 17A y B). Asimismo, el tratamiento con SEN177 condujo a una unión reducida de SIRPa sin alterar los niveles totales de superficie de 20 CD47 para ambas líneas celulares (Fig. 17C). Se usaron células Ba/F3 que expresan Her2 humano para evaluar si la inhibición de la formación de piroglutamato podría aumentar la destrucción de células tumorales por neutrófilos humanos en presencia de anticuerpo anti-Her2. Tanto el tratamiento con QPCTL-*knockout* como con SEN177 se sinergizaron con el tratamiento anti-Her2 para inducir la lisis mediada por neutrófilos de las células 25 tumorales (Fig. 13A y B). La eficiencia de destrucción de células tumorales deficientes en CD47 y QPCTL por parte de los neutrófilos no mejoró más mediante el tratamiento con SEN 177, lo que demuestra que los efectos funcionales de SEN 177 dependen de la ruta de CD47 (Fig. 17D). Se observaron los mismos efectos de deleción de QPCTL e inhibición de moléculas pequeñas cuando se usaron células inmunitarias murinas aisladas de sangre completa como células efectoras (Fig. 17E y F).

[0249] Se usaron células Ba/F3 que expresan Her2 en un modelo de tumor peritoneal singénico a corto plazo para evaluar el papel de QPCTL en la destrucción de células tumorales *in vivo* (de Haij, S., et al., Cancer Res., 2010: 70, 3209-3217; Boross, P., et al., Haematologica, 2011: 96, 1822-1830; Boross, P. et al., EMBO Mol Med., 2013: 5, 1213-1226). A ratones transgénicos (Tg) BALB/c de Fc α RI humana se les inyectó una mezcla 1:1 de 30 células de tipo silvestre y deficientes en QPCTL o, como comparación, células de tipo silvestre y deficientes en CD47. Posteriormente, los ratones se trataron con anticuerpo anti-Her2 o PBS y, después de 16 horas, se analizó la proporción de células deficientes en QPCTL frente a células de tipo silvestre (Fig. 18A). En ratones tratados con PBS, la proporción de células deficientes en QPCTL frente a células de tipo silvestre no se vio afectada, lo que indica que QPCTL no influye en el injerto de células tumorales a corto plazo. Por el contrario, en 35 los ratones tratados con anti-Her2 se observó una destrucción profunda de las células tumorales deficientes en QPCTL sobre las células de tipo silvestre (proporción WT: QPCTL deficiente en PBS/anti-Her2 es 1,01/0,10) (Fig. 13C y D, Fig. 18B). Esta destrucción selectiva de células deficientes en QPCTL en ratones tratados con anti-Her2 vino acompañada por un gran flujo de leucocitos polimorfonucleares (PMN), lo que demuestra un ciclo de 40 retroalimentación positiva que mejora la inmunidad antitumoral (Fig. 13E y Fig. 18C). Un experimento independiente confirmó la destrucción mejorada de células tumorales lograda mediante el bloqueo de la formación de piroglutamato e indicó que esta era similar a la lograda mediante la deficiencia genética total del punto de control CD47 (Fig. 18D-F).

EJEMPLO 3

Líneas celulares

[0250] Las células HAP1 se han descrito previamente (Carette et al. (2011), Nature, vol. 477, páginas 340-343). Las células HAP1 se cultivaron en IMDM (ThermoFisher Scientific) complementado con suero de ternero fetal al 50 10 % (FCS, VWR), 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina y 2,92 µg/ml de L-glutamina (ThermoFisher Scientific).

[0251] Las células A375 y RKO se adquirieron de American Type Culture Collection (ATCC). Las células A375 y RKO se cultivaron en DMEM complementado con FCS al 10 % (BioWest), 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina y 2,92 µg/ml de L-glutamina (ThermoFisher Scientific).

Generación de vectores

[0252] El vector LentiCRISPRv2 (Genscript) se cortó con las enzimas de restricción Pael y EcoRI (New England 60 Biolabs) y la secuencia principal se aisló del gel usando un kit de extracción en gel Qiaquick (Qiagen) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Se insertó un fragmento de ADN sintético (CAGGGACAGCAGAGATCCAGTTGGTTATTAGGTACCGAGGGCCTATTCCCAT GATTCCCTCATATTGCATATACGATACAAGGCTGTAGAGAGATAATTAGAATTAAT TTGACTGTAAACACAAAGATATTAGTACAAAATACGTGACGTAGAAAGTAATAATTTC 65 TTGGGTAGTTGCAGTTAAATTATGTTTAAAATGGACTATCATATGCTTACCGT AACTTGAAAGTATTCGATTTCTGGCTTATATCTTGTGGAAAGGACGAAACACC

GGAGACGGATTAATTAAACCGTCTCAGTTAACGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAATA
 AGGCTAGTCGTTATCAACTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCTTTTGAAATT
 GCTAGCTAGGTCTTGAAGGAGTGG (SEQ ID NO: 12, IDTDNA) utilizando NEBuilder HiFi DNA Assembly
 Master Mix (New England Biolabs) para obtener pSCNC-LentiCRISPR. Posteriormente, el pSCNC-LentiCRISPR
 5 digerido por BsmBI (New England Biolabs) se aisló del gel utilizando un kit de extracción en gel Qiaquick
 (Qiagen) y los oligonucleótidos que codifican los ARNg dirigidos a QPCTL
 (TATCTGTGGAAAGGACGAAACACCGCGGGAGGCTCCGATCAATGTTAAG
 CTAGAAATAGCAAGTTAAA) (SEQ ID NO: 13) o CD47
 (TATCTGTGGAAAGGACGAAACACCGCCTGCTGGTGTGCGAACCGTTAAG CTAGAAATAGCAAGTTAAA)
 10 (SEQ ID NO: 14) se clonaron utilizando NEBuilder HiFi DNA Assembly Master Mix (New England Biolabs) para
 obtener pSCNC-LentiCRISPR-QPCTL y pSCNC-LentiCRISPR-CD47 respectivamente.

Creación de células knockout QPCTL y CD47

15 [0253] Se transfecaron células HAP1, A375 o RKO con pSCNC-LentiCRISPR-QPCTL o pSCNC-LentiCRISPR-
 CD47 utilizando Lipofectamin 2000 (ThermoFisher Scientific) según las instrucciones del fabricante. Después de
 20 24 horas de incubación, las células se seleccionaron con puromicina (Invivogen, 1 pg/ml) durante 48 horas. Las
 células se recogieron utilizando el reactivo de disociación TrypLE (ThermoFisher Scientific), se centrifugaron
 25 durante 3 minutos a 3000 rpm y se resuspendieron en tampón FACS (FCS al 10 % en PBS) antes de realizar el
 recuento utilizando un contador de células TC10 (BioRad). Se transfirieron 750.000 células a un vial nuevo, se
 centrifugaron durante 3 minutos a 3000 rpm y se incubaron en 100 µl de tampón FACS que contenía el clon
 CC2C6 anti CD47 humana conjugado con FITC 1:100 en el caso de células en las que QPCTL era la diana y el
 30 clon 2D3 anti CD47 humana conjugado con FITC 1:100 para células en las que CD47 era la diana, durante 30
 minutos a 4 grados. Las células se centrifugaron y se lavaron una vez con tampón FACS para eliminar el
 anticuerpo no unido. Las células se centrifugaron de nuevo y se recogieron en 500 µl de tampón FACS. Las
 35 células negativas se clasificaron directamente en medio de cultivo celular usando un software FACSaria III y
 FACS Diva (BD Biosciences).

Compuestos

30 [0254] Los compuestos 000044, 000060 y 000066 se sintetizaron como racematos. La separación de los
 enantiómeros se realizó en un sistema Waters 80Q Preparative SFC con una columna Chiralpak AS, 250 x 30
 mm de D.I., tamaño de partícula de 10 um a temperatura ambiente usando elución isocrática con fase A al 50 %
 35 (CO₂ supercrítico), fase B al 50 % (MeOH, NH₃H₂O al 0,1 % para 000044 y 000066; EtOH, 0,1 % NH₃H₂O para
 40 000060). Se añadieron aproximadamente 30 ml de MeOH a la muestra que se inyectó a 4 ml/inyección. El caudal
 fue de 70 g/min, la contrapresión de 100 bar y UV a 220 nm. Para el compuesto 000044 se aisló el pico con un
 tiempo de retención de 2,69 min, para el compuesto 000060 el pico con un tiempo de retención de 3,28 min y
 para el compuesto 000066 el pico con un tiempo de retención de 2,93 min. En los tres casos esto se refiere al
 más rápido de los dos picos.

Ensayos de inhibidores de QPCTL

45 [0255] Para probar los compuestos en cuanto a su efecto sobre la piroglutamilación y la unión de SIRPa, se
 realizaron diluciones de 10 veces de los compuestos en placas de 24 pocillos (Corning Life Science) con la
 concentración más alta acercándose a la solubilidad media máxima con un máximo de 500 µM. Se añadió un
 volumen igual de células HAP1 (200.000/pocillo), A375 (50.000/pocillo) o RKO (100.000/pocillo) y se tomaron
 50 células knockout QPCTL y CD47 en pocillos de control.

55 [0256] Tras 48 horas de incubación a 37 grados, CO₂ al 5 %, las células se lavaron una vez con PBS antes de
 liberarlas con 100 µl de reactivo de disociación TrypLE por pocillo y se transfirieron a placas de 96 pocillos con
 fondo en V (Greiner Bio-One) precargadas con 100 µl de tampón FACS (10 % FCS/PBS). Las células se
 centrifugaron durante 3 minutos a 3000 rpm, se lavaron una vez con tampón FACS y se centrifugaron de nuevo
 durante 3 minutos a 3000 rpm. A continuación, las células se incubaron durante 2 horas a 4 grados con una
 mezcla de clon 2D3 anti CD47 humana conjugado con FITC 1:500 y clon CC2C6 anti CD47 humana conjugado
 con Alexa647 1:500 para los ensayos de piroglutamilación. Alternativamente, las células se incubaron con 50 µl
 60 de proteína de fusión recombinante SIRPa-Fc humana 1:50 en tampón FACS para los ensayos de SIRPa. Para
 los ensayos de SIRPa, se realizaron dos etapas de lavado seguidas de centrifugación durante 3 minutos a 3000
 rpm y se resuspendieron las células en tampón FACS antes de centrifugar por última vez y resuspender e
 incubar el precipitado durante 1 hora a 4 grados en 100 µl de anticuerpo de conejo anti humano conjugado con
 65 APC 1:100. Las células de ambos ensayos se centrifugaron y se lavaron dos veces con tampón FACS para
 eliminar el anticuerpo no unido. Las células se centrifugaron de nuevo y se recogieron en 300 µl de tampón
 FACS antes de analizarlas en un FACSaria III utilizando el software FACS Diva (BS Biosciences). La intensidad
 de fluorescencia media (MFI) de cada muestra se transformó linealmente a escala entre las MFI de células de
 tipo silvestre y CD47 knockout en el caso del anticuerpo 2D3 y las células de tipo silvestre y QPCTL knockout en
 el caso del anticuerpo CC2C6.

Resultados

[0257] Dado que QC e isoQC tienen características enzimáticas y estructurales muy similares (Stephan *et al.*, FEBS Journal, 2009), es muy probable que los compuestos que inhiben QC también inhiban isoQC. Por lo tanto, probamos 38 compuestos con actividad inhibidora de QC observada perteneciente a cinco grupos estructurales por su efecto en la piroglutamilación de CD47 en células HAP1, junto con inhibidores de isoQC conocidos PQ912 ($K_i = 5$ nM, Lues *et al.*, Alzheimer's & Dementia, 2015) y SEN-177 ($K_i = 13$ nM, Jimenez-Sanchez, Nat. Chem. Biol., 2015) (Figuras 19-25). Para 34 de los compuestos analizados, se observó una reducción dependiente de la dosis de la señal de pE-CD47, medida usando el clon CC2C6 del anticuerpo específico de pE-CD47. Las tinciones de control que utilizan el clon de anticuerpo 2D3, que se une a CD47 independientemente de su estado de piroglutamilación, muestran que los niveles generales de CD47 no se ven afectados negativamente por los compuestos (Figuras 19-24). Puesto que la inactivación de *QPCT* (que codifica QC) en las células HAP1 no influyó en los niveles de pE-CD47, las reducciones observadas no pueden explicarse por la inhibición de la enzima QC y, por lo tanto, se atribuyen a la actividad inhibidora de isoQC de los compuestos utilizados. Cuatro compuestos no mostraron inhibición de la piroglutamilación de CD47 a pesar de ser inhibidores de QC, lo que demuestra que no necesariamente todos los inhibidores de QC tienen actividad en este ensayo de isoQC (Figura 25 y Tabla 2).

Tabla 2. Compuestos que no tienen actividad en el ensayo mediado por isoQC (véase Fig. 25).

000015	1-(1H-Benzimidazol-5-il)-4-ciclohexanocarbonil-5-(3,4-dicloro-fenil)-3-hidroxi-1,5-dihidro-pirrol-2-ona	
000033	1-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-4-benzoil-5-(2,3-difluorofenil)-3-hidroxi-1H-pirrol-2(5H)-ona	
000046	3-hidroxi-4-(4-hidroxi-fenil)-1-(3-imidazol-1-il-propil)-5-p-tolil-1,5-dihidro-pirrol-2-ona	
000040	1-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-5-(2,3-difluoro-4-metilfenil)-4-tioxoimidazolidin-2-ona	

Repetimos los experimentos para al menos un compuesto en cada grupo en células A375 y RKO y obtuvimos resultados muy comparables, lo que demuestra que la reducción observada en la piroglutamilación de CD47 es probablemente independiente de la línea celular.

5 [0258] Finalmente, como lectura funcional de la piroglutamilación de CD47, evaluamos el grado de unión de SIRP α a las células A375 que se incubaron durante 48 horas con al menos 1 compuesto de cada grupo. Esto demostró una reducción dependiente de la dosis de la unión de SIRP α que se correlaciona bien con las reducciones observadas en pE-CD47, lo que confirma una consecuencia funcional de los inhibidores de isoQC analizados en este documento.

10 **EJEMPLO 4**

IsoQC recombinante

15 [0259] La región enzimáticamente activa y luminal de Golgi del isoQC humano (S53-L382, Huang *et al.*, JBC, 286, 12439-12449, 2011) se obtuvo por expresión en *E. coli* de una GST-enteroquinasa N-terminal, una construcción marcada con 6xHis C-terminal en el vector pET41(+) y su posterior purificación y digestión con enteroquinasa. La ausencia de actividad piroglutamilante en una variante enzimática muerta que se clonó, expresó y purificó en paralelo descartó que la estrategia de purificación aísle cualquier actividad piroglutamilante endógenamente presente.

Ensayo isoQC

25 [0260] La inhibición de la actividad de isoQC se evaluó incubando 30 μ l de soluciones de 50 mM Tris pH 8,0 que contenían 10 μ M H-Gln-AMC (n.º de catálogo Bachem 4003647.0100, disuelto en 25 mM HEPES), DMSO al 1 % y 750 pg/ μ l de isoQC recombinante en presencia o ausencia de inhibidor durante 1 hora a 37 °C. A esto le siguió una incubación durante 5 minutos a 98 °C para detener la reacción e inactivar la enzima. A continuación, se transfirieron 25 μ l de la reacción a una placa de 384 pocillos que contenía 25 μ l de enzima pGAPasa (diluida 1:200 en 50 mM Tris pH 8,0, 10 mM ditiotreitol (DTT), enzima obtenida de Qiagen, n.º de catálogo 34342) y se incubó durante 10 minutos a 37 °C antes de leer la fluorescencia utilizando un lector de placas SpectraMax Id3 con una longitud de onda de excitación establecida en 380 nm y una emisión de 450 nm. Las lecturas se corrigieron restando la señal de fondo de un pocillo de control que no contenía enzima isoQC y, posteriormente, se normalizaron dividiendo la señal de un pocillo que contenía enzima, pero no inhibidor.

35 Ensayo de pGAPasa

40 [0261] La inhibición de la actividad de pGAPasa se probó de manera similar al ensayo isoQC, salvo porque en lugar de glutamina-ácido aminocumárico (H-Gln-AMC), se utilizaron 2 μ M de AMC ya completamente piroglutamilado (Pyr-AMC, n.º de cat. Bachem 4004069.0050, disuelto en DMSO). La sustracción de fondo se realizó en un pocillo de control que no contenía enzima pGAPasa y posteriormente se normalizó dividiendo la señal de un pocillo que contenía enzima, pero no inhibidor.

Resultados

45 [0262] Se probaron inhibidores representativos de cada una de las cinco clases estructurales de inhibidores para la inhibición de la actividad piroglutamilante de isoQC en un ensayo acoplado. En este ensayo, isoQC primero convierte H-Gln-AMC en Pyr-AMC y, en un paso posterior, se determina la cantidad de Pyr-AMC formada después de la conversión saturada por la enzima piroglutamilaminopeptidasa (pGAPasa) en AMC que puede detectarse con fluorescencia en un lector de placas. Como se puede observar en la Figura 26, todos los inhibidores analizados mostraron actividad inhibidora en un rango de concentraciones. La conversión completa de Pyr-AMC a AMC en un ensayo de pGAPasa concomitante en presencia de las mismas concentraciones de inhibidores mostró además que la reducción en la señal mediada por isoQC no se debió a la inhibición de la enzima pGAPasa (Figura 27). Juntos, estos datos confirman que estos compuestos son inhibidores de la actividad enzimática de isoQC.

55 [0263] Algunos inhibidores no mostraron una reactividad convincente en el ensayo basado en células (SC-000015, SC-000033, SC-000040, SC-000045 y SC-000046 (SC-00045 es el enantiómero de SC-000046)), pero sí mostraron alguna actividad en el ensayo enzimático mostrado en la Fig. 26. Los compuestos sin actividad convincente en el ensayo basado en células son los que tienen la eficacia más baja en el ensayo enzimático. 60 Además de la capacidad inhibitoria disminuida, la falta de actividad celular también puede atribuirse a la diferente penetración celular, la degradación de los compuestos intracelulares, las concentraciones más altas necesarias para la inhibición intracelular, etc.

EJEMPLO 5

65 **Material y métodos**

[0264] Líneas celulares: se generaron líneas celulares a corto plazo a partir de xenoinjertos derivados de pacientes con melanoma primario (PDX) según lo descrito (Kemper *et al.*, EMBO Mol. Med. 7, 1104-1118, 2015) y fueron cortesía de D. Peeper y K. Kemper. Las líneas celulares PDX se trataron con 10 μ M SEN 177 durante 4 días, con una renovación del medio que contenía SEN177 cada 24 horas. 24 horas después del tratamiento, se determinó mediante FACS (como se describe en los ejemplos 1 y 2) la unión de los anticuerpos 2D3 y CC2C6 de CD47 y SIRP α -Fc recombinante.

Resultados

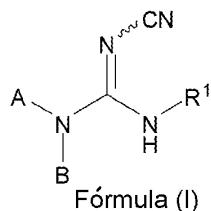
10

[0265] Para determinar si la inhibición de QPCTL en varias líneas de melanoma derivadas de pacientes afectó a la unión de los anticuerpos 2D3 de CD47 (una medida para la expresión total de CD47) y CC2C6 (una medida para la expresión de CD47 piroglutamilado) y SIRP α -Fc recombinante (que solo puede unirse a CD47 si está piroglutamilado), se trataron seis cultivos a corto plazo de xenoinjertos de melanoma con SEN177 (Fig. 28). La unión de SIRP α a las células tratadas con el inhibidor de QPCTL disminuyó significativamente en comparación con las células no tratadas, mientras que los niveles de proteína CD47 permanecieron inalterados.

15

REIVINDICACIONES

1. Composición farmacéutica que comprende un compuesto capaz de inhibir la actividad enzimática de la proteína similar a la glutaminil péptido ciclotransferasa (QPCTL),
 5 para su uso en un método de tratamiento de un sujeto para el cáncer,
 donde dicho tratamiento comprende administrar el compuesto al sujeto para aumentar la destrucción de células cancerosas mediada por células inmunitarias, donde las células cancerosas expresan CD47 en su superficie.
- 10 2. Composición para su uso según la reivindicación 1, donde las células cancerosas sobreexpresan CD47.
- 15 3. Composición para su uso según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, donde la destrucción de células cancerosas se realiza mediante fagocitosis.
4. Composición para su uso según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, donde la destrucción de células cancerosas se realiza mediante fagocitosis celular dependiente de anticuerpos (FCDA).
- 20 5. Composición para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, donde la célula inmunitaria es un macrófago, un monocito, un neutrófilo, un basófilo, un eosinófilo o una célula dendrítica.
6. Composición para su uso según la reivindicación 5, donde la célula inmunitaria es un macrófago.
- 25 7. Composición para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-6, donde el sujeto es un mamífero.
8. Composición para su uso según la reivindicación 7, donde el mamífero es un ser humano.
9. Composición para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, donde la composición se administra por vía oral.
- 30 10. Composición para su uso según la reivindicación 9, donde la composición es una cápsula o comprimido.
11. Composición para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-10, donde el compuesto para su uso es una molécula pequeña que tiene un límite de peso molecular de aproximadamente 900 daltons.
- 35 12. Composición para su uso según la reivindicación 11, donde el compuesto para uso tiene un peso molecular de menos de 500 daltons.
13. Composición para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-12, donde el compuesto tiene la
 40 Fórmula (I):



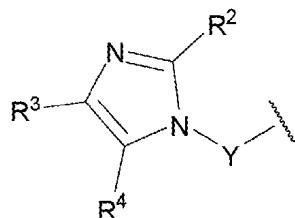
donde, en la Fórmula (I):

- 45 R¹ representa alquilo de C₁₋₁₂; alquenilo de C₂₋₁₂, donde el doble enlace no es adyacente al nitrógeno; carbociclico de C₃₋₁₂; alquilo de -C₁₋₆-carbociclico de C₃₋₁₂; heterociclico de C₃₋₁₂; alquilo de -C₁₋₆-heterociclico de C₃₋₁₂; arilo de C₆₋₁₂; heteroarilo de C₅₋₁₂; alquilarilo de -C₁₋₆-; -alquilo de -C₁₋₆-heteroarilo de C₅₋₁₂; fenilo fusionado con carbociclico de C₃₋₁₂ o fenilo fusionado con heterociclico de C₃₋₁₂; donde cualquiera de los grupos carbociclico de C₃₋₁₂ y heterociclico de C₃₋₁₂ anteriores pueden estar opcionalmente sustituidos con uno o más grupos seleccionados de metilo y oxo; y donde cualquiera de los mencionados grupos fenilo, arilo de C₆₋₁₂ y heteroarilo de C₅₋₁₂ puede estar opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes seleccionados de alquilo de C₁₋₆, alquenilo de C₂₋₆, alquinilo de C₂₋₆, haloalquilo de C₁₋₆, tioalquilo de -C₁₋₆, -SO₂-alquilo de C₁₋₄, alcoxi de C₁₋₆, -O-cicloalquilo de C₃₋₈, cicloalquilo de C₃₋₈, -SO₂-cicloalquilo de C₃₋₈, alqueniloxi de C₃₋₆, alquiniloxi de C₃₋₆, -C(O)-alquilo de C₁₋₆, alcoxi de C₁₋₆ - alquilo de C₁₋₆, nitro, halógeno, ciano, hidroxilo, -C(O)OH, -NH₂, -NH-alquilo de C₄₋₄, -N(alquilo de C₁₋₄)(alquilo de C₁₋₄), -C(O)N(alquilo de C₁₋₄)(alquilode C₁₋₄), -C(O)NH₂, -C(O)NH(alquilo de C₁₋₄), -C(O)O-alquilo de C₁₋₆, -SO-alquilo de C₁₁₋₄ y --SO-cicloalquilo de C₁₃₋₆;
- 50 o R¹ representa fenilo sustituido por fenilo, o fenilo sustituido por un grupo heteroarilo monocíclico de C₅₋₁₂ opcionalmente sustituido; en el que cualquiera de los grupos fenilo y heteroarilo de C₅₋₁₂ monocíclicos
- 55 o R¹ representa fenilo sustituido por fenilo, o fenilo sustituido por un grupo heteroarilo monocíclico de C₅₋₁₂ opcionalmente sustituido; en el que cualquiera de los grupos fenilo y heteroarilo de C₅₋₁₂ monocíclicos

5 pueden estar opcionalmente sustituidos por uno o más grupos seleccionados de alquilo de C₁₋₄, halógeno y alcoxi de C₁₋₄;

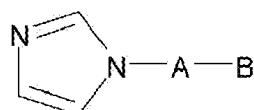
o R¹ representa fenilo sustituido por benciloxi- en el que cualquiera de los grupos fenilo o benciloxi mencionados anteriormente puede tener opcionalmente sustituyentes en el anillo que son uno o más grupos seleccionados de alquilo de C₁₋₄, halógeno y alcoxi de C₁₋₄;

A representa



10 donde Y representa una cadena de alquíleno de C₂₋₅, que puede estar opcionalmente sustituida por uno o dos grupos metilo u opcionalmente puede estar sustituida por dos sustituyentes alquíleno en la misma posición en la que los dos sustituyentes alquíleno están unidos entre sí para formar un grupo espirocicloalquilo de C₃₋₅; y R², R³ y R⁴ representan independientemente H o alquilo de C₁₋₂, siempre que R² y R³ y R⁴ no representen todos H; y

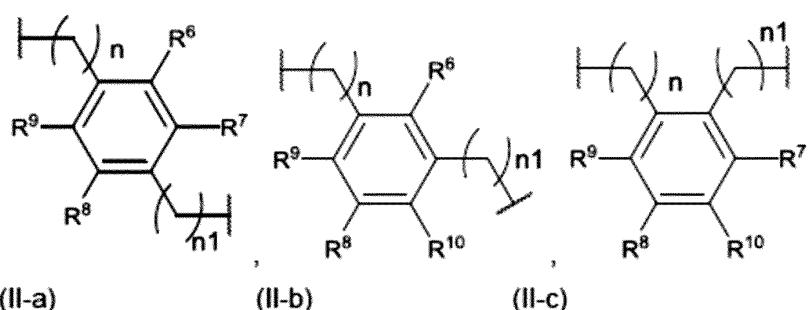
15 B representa H o metilo; o donde el compuesto tiene la Fórmula (II):



20 fórmula (II)

donde, en la Fórmula (II):

25 A es un residuo seleccionado del grupo que consiste en (II-a), (II-b) o (II-c):

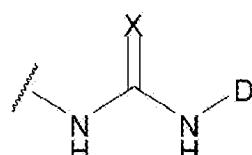


25 donde:

R⁶-R¹⁰ son H o metilo;

n y n1 son independientemente 1-5; y

30 B es;

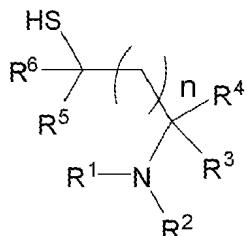


35 donde:

D representa fenilo sustituido, donde sustitución significa -oxialquilo, -tioalquilo, halogenilo;

o D representa dihidrobenzodioxina, benzodioxol, benzoditiool dihidrobenzoditiina, benzooxatiol o dihidrobenzooxatiina; y
 X representa O, S, N-CN;

5 o donde el compuesto tiene la Fórmula (III):

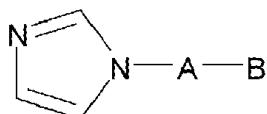


fórmula (III)

donde, en la fórmula (III):

10 R¹-R⁶ son independientemente H o una cadena de alquilo ramificada o no ramificada, una cadena de alquenilo ramificada o no ramificada, una cadena de alquínilo ramificada o no ramificada, carbocíclico, arilo, heteroarilo, heterocíclico, aza-aminoácido, aminoácido o un mimético del mismo, péptido o un mimético del mismo; estando opcionalmente sustituidos todos los residuos anteriores; y n puede ser 0 o 2;

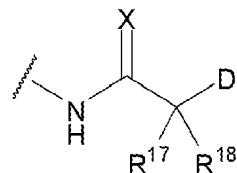
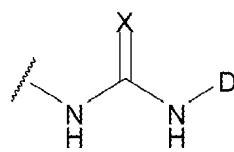
15 o donde el compuesto tiene la fórmula (IV):



fórmula (IV)

20 donde, en la fórmula (IV):

A es una cadena de alquilo de C₃ no ramificada; y
 B es un grupo seleccionado de (IV-a) o (IV-b):



25 (IV-a)

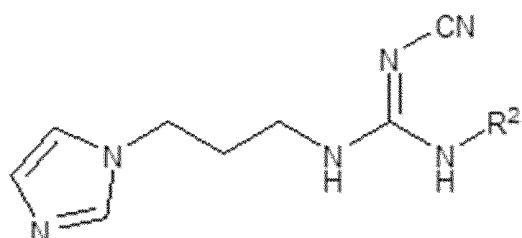
(IV-b)

donde:

30 cuando B es un grupo (IV-a),
 D representa dihidrobenzodioxina, benzodioxol, benzoditiool dihidrobenzoditiina, benzooxatiol o dihidrobenzooxatiina;
 o D representa tert-butilo, bencilo, fenilo, 4-fluoro-fenilo, 4-cloro-fenilo, 4-etyl-fenilo, 4-(trifluorometil)-fenilo, 4-(metoxicarbonil)-fenilo, 4-(acetilo)-fenilo, 4-(metoxi)-fenilo, biciclo[2.2.1]hept-5-en-2-ilo, 3,4-(dimetoxi)-fenilo, 2,4-(dimetoxi)-fenilo, 3,5-(dimetoxi)-fenilo, 2-(metoxicarbonil)-fenilo, 4-(oxazol-5-il)-fenilo, 4-(pirazol-1-il)-fenilo, 4-isopropilfenilo, 4-(piperidin-1-sulfonil)-fenilo, 4-(morpholin-4-il)-fenilo, 4-ciano-fenilo, 2,3-dihidro-benzo[1,4]-dioxin-6-ilo, benzo[1,3]dioxol-5-ilo, 3,4,5-(trimetoxi)-fenilo, 3-(metoxi)-fenilo, 4-(etoxi)-fenilo, 4-(benciloxi)-fenilo, 4-yodofenilo, 4-bromo-fenilo, 4-metil-fenilo, naftalen-1-ilo, 4-nitro-fenilo, ciclooctilo, furan-2-il-metilo, tetrahidrofuran-2-il-metilo, benzo[1,3]dioxol-5-ilmetilo, 2-(morpholin-4-il)-etilo, 4-(metilsulfanil)-fenilo, 4-(dimetilamino)-fenilo, 4-(trifluorometoxi)-fenilo, benzoilo o piridin-4-ilo;

- o cuando B es un grupo (IV-b),
 D representa fenilo sustituido, en el que sustitución significa alcoxi-, -tioalquilo, halógeno o un éster de arilo o alquilo de ácido carboxílico;
- 5 o D representa dihidrobenzodioxina, benzodioxol, benzoditiol dihidrobenzoditiina, benzooxatiol o dihidrobenzooxatiina;
- o cuando B es un grupo (IV-b) y R¹⁷ y R¹⁸ ambos son hidrógeno, D es además fenilo; X representa S;
- 10 Y representa S;
 uno de R¹⁷ y R¹⁸ es H y el otro es metilo;
- o R¹⁷ y R¹⁸ se pueden conectar para formar un carbociclo con hasta 6 átomos en el anillo;
- 15 o cuando D representa fenilo o 3,4-(dimetoxi)-fenilo, los grupos R¹⁷ y R¹⁸ son ambos H;
 y donde el término "alquilo" denota un grupo alquilo de C₁₋₆,

o donde el compuesto tiene la Fórmula (V):

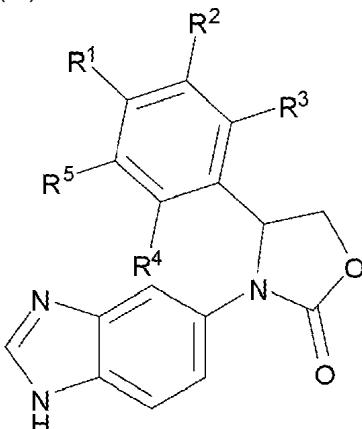


Fórmula (V)

donde, en la Fórmula (V):

- 20 R² representa fenilo opcionalmente sustituido en la posición 4 con un sustituyente seleccionado de entre etoxi, benciloxi, metoxi, acetilo, nitro, halo, metilo, etilo, metiltio, dimetilamino o trifluorometilo; o 3-metoxifenilo, 3,4-dimetoxifenilo, 2,4-dimetoxifenilo, 3,5-dimetoxifenilo o 3,4,5-trimetoxifenilo;
- 25 o metilo, 2,3-dihidrobenzo[b][1,4]dioxin-7-ilo, benzo[d][1,3]dioxol-6-ilo, bencilo, naftalenilo, ciclooctilo, tert-butilo, butilo, tritilo, benzo[d][1,3]dioxol-6-ilmetilo, (tetrahidrofuran-2-il)metilo, (furan-2-il)metilo o 2-(morpholin-4-il)etilo;

o donde el compuesto tiene la Fórmula (VI):

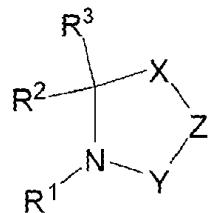


Fórmula (VI)

donde, en la Fórmula (VI):

- 30 R¹ representa alquilo, -O-alquilo, heterociclico o cicloalquilo;
- R² y R³ representan independientemente hidrógeno, halógeno o CN;
- R⁴ y R⁵ representan independientemente hidrógeno o halógeno;
- 35 donde al menos uno de R², R³, R⁴ y R⁵ es halógeno o CN;
- y donde los grupos alquilo, -O-alquilo, heterociclico o cicloalquilo anteriores están sustituidos con uno o más halógenos;

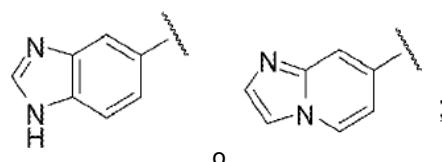
o donde el compuesto tiene la Fórmula (VII):



Fórmula (VII)

donde, en la Fórmula (VII):

5 R¹ representa



- 10 R² representa alquilo de C₁₋₈, arilo, heteroarilo, carbociclico, heterociclico, alquilarilo de -C₁₋₄, alquilo de -C₁₋₄-heteroarilo, alquilcarbociclico de -C₁₋₄ o alquilheterociclico de -C₁₋₄; donde cualquiera de los grupos arilo y heteroarilo mencionados anteriormente puede estar opcionalmente sustituido por uno o más grupos seleccionados de alquilo de C₁₋₆, alquenilo de C₂₋₆, alquinilo de C₂₋₆, haloalquilo de C₁₋₆, tioalquilo de -C₁₋₆, -SO-alquilo de C₁₁₋₄, -SO₂-alquilo de C₁₋₄, alcoxi de C₁₋₆, -O-cicloalquilo de C₃₋₈, cicloalquilo de C₃₋₈, -SO₂-cicloalquilo de C₃₋₈, -SO-cicloalquilo de C₁₃₋₆, alqueniloxi de C₃₋₆, alquiniloxi de C₃₋₆, -C(O)-alquilo de C₁₋₆, -C(O)O-alquilo de C₁₋₆, alcoxi de C₁₋₆-alquilo de C₁₋₆, alcoxi de C₁₋₆-alcoxi de C₁₋₆, nitro, halógeno, haloalquilo de C₁₋₆, halo-alcoxi de C₁₋₆, ciano, hidroxilo, -C(O)OH, -NH₂, NH-alquilo de C₁₋₄, -N(alquilo de C₁₋₄)(alquilo de C₁₋₄), -N(alquilo de C₁₋₄)(alquilo de C₁₋₄)-N(alquilo de C₁₋₄)(alquilo de C₁₋₄), alquilo de -C₁₋₄-N(alquilo de C₁₋₄)(alquilo de C₁₋₄), alcoxi de -C₁₋₄-N(alquilo de C₁₋₄)(alquilo de C₁₋₄)-N(cicloalquilo de C₃₋₈)(cicloalquilo de C₃₋₈), -N(alquilo de -C₁₋₆ alcoxi de -C₁₋₆)(alquilo de -C₁₋₆-alcoxi de C₁₋₆), -C(O)N(alquilo de C₁₋₄)(alquilo de C₁₋₄), -C(O)NH₂, -C(O)NH(alquilo de C₁₋₄) y -C(O)NH(cicloalquilo de C₃₋₁₀); y donde cualquiera de los grupos carbociclico y heterociclico mencionados anteriormente puede estar opcionalmente sustituido con uno o más grupos seleccionados de alquilo de C₁₋₄, oxo, halógeno, -C(O)-alquilo de C₁₋₆ y alcoxi de C₁₋₄;
- 15 o R² representa fenilo sustituido por un grupo heteroarilo monocíclico, fenilo sustituido por fenoxi, fenilo sustituido por heterociclico, fenilo sustituido por heterociclico en el que dicho heterociclico está sustituido por fenilo, fenilo sustituido por y -O- alquilo de C₁₋₄-heterociclico, fenilo sustituido por benciloxi, fenilo sustituido por carbociclico, fenilo sustituido por carbociclico en el que dicho carbociclico está sustituido por heterociclico, fenilo sustituido por -O-carbociclico, heterociclico sustituido por fenilo, carbociclico sustituido por fenilo, fenilo condensado con carbociclico, fenilo fusionado con heterociclico, alquilo de -C₁₋₄ (fenilo sustituido por fenilo), alquilo de -C₁₋₄ (fenilo sustituido por un grupo heteroarilo monocíclico), alquilo de -C₁₋₄ (fenilo sustituido por un grupo heterociclico monocíclico), alquilo de -C₁₋₄ (fenilo sustituido por un grupo -O-carbociclico), alquilo de -C₁₋₄ (fenilo sustituido por benciloxi), alquilo de -C₁₋₄ (fenilo opcionalmente sustituido condensado con carbociclico opcionalmente sustituido o alquilo de -C₁₋₄ (fenilo opcionalmente sustituido condensado con heterociclico opcionalmente sustituido); en el que cualquiera de los grupos fenilo, benciloxi y heteroarilo mencionados anteriormente puede estar opcionalmente sustituido con uno o más grupos seleccionados de alquilo de C₁₋₄, halógeno y alcoxi de C₁₋₄, y en el que cualquiera de los grupos carbociclico y heterociclico mencionados anteriormente puede estar opcionalmente sustituido con uno o más grupos seleccionados de metilo, fenilo, oxo, halógeno, hidroxilo y alcoxi de C₁₋₄; R³ representa H, alquilo de -C₁₋₄ o arilo; en el que dicho arilo puede estar opcionalmente sustituido por uno o más grupos seleccionados de alquilo de C₁₋₆, alquenilo de C₂, alquinilo de C₂₋₆, haloalquilo de C₁₋₆, tioalquilo de -C₁₋₆, -SO-alquilo de C₁₋₄, -SO₂-alquilo de C₁₋₄, alcoxi de C₁₋₆, -O-cicloalquilo de C₃₋₈, cicloalquilo de C₃₋₈, -SO₂-cicloalquilo de C₃₋₈, -SO-cicloalquilo de C₁₃₋₆, alqueniloxi de -C₃₋₆, alquiniloxi de C₃₋₆, -C(O)-alquilo de C₁₋₆, -C(O)O-alquilo de C₁₋₆, alcoxi de C₁₋₆-alquilo de C₁₋₆, nitro, halógeno, ciano, hidroxilo, -C(O)OH, -NH₂, NH-alquilo de C₁₋₆, -N(alquilo de C₁₋₄)(alquilo de C₁₋₄), -C(O)N(alquilo de C₁₋₄)(alquilo de C₁₋₄), -C(O)NH₂, -C(O)NH(alquilo de C₁₋₄) y -C(O)NH(cicloalquilo de C₃₋₁₀);
- 20 o R² y R³ se unen para formar un anillo carbociclico que está opcionalmente sustituido por uno o más grupos alquilo de C₁₋₂;
- 25 o R² y R³ se unen para formar un anillo de carbociclico que se fusiona con fenilo, en el que el carbociclico y/o el fenilo mencionados anteriormente pueden estar opcionalmente sustituidos con uno o más grupos seleccionados de alquilo de C₁₋₄, halógeno y alcoxi de C₁₋₄;
- 30
- 35
- 40
- 45
- 50

o R² y R³ se unen para formar un anillo de carbociclico que se fusiona con heteroarilo monocíclico, en el que el carbociclico y/o heteroarilo mencionados anteriormente pueden estar opcionalmente sustituidos con uno o más grupos seleccionados de alquilo de C₁₋₄, halógeno y alcoxi de C₁₋₄;

5 X representa C=O, O, S, CR⁷R⁸, -O-CH₂- o -CH₂-CH₂-;

Y representa CDH⁹, C=O o C=S;

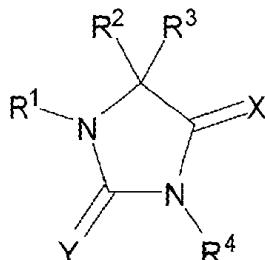
10 Z representa -N-R⁴, O o CHR¹⁰, de tal modo que cuando X representa O o S, Z debe representar CHR¹⁰; o X y Z representan dos átomos de carbono adyacentes de un anillo de fenilo que está fusionado en esa posición y que está opcionalmente sustituido por uno o más halógenos o grupos alquilo de C₁₋₂; R⁴ representa H, alquilo de -C₁₋₈, -C(O)-alquilo de C₁₋₆ o -NH₂;

15 R⁷ y R⁸ representan independientemente H o -alquilo de C₁₋₄;

R⁹ y R¹⁰ representan independientemente H o metilo;

siempre que el residuo -Y-Z-X- represente un residuo distinto de -C(=O)-N(-R⁴)-C(=O)- o -C(=S)-N(-R⁴)-C(=O)-;

15 o donde el compuesto tiene la Fórmula (VIII):



Fórmula (VIII)

donde, en la Fórmula (VIII):

20 R¹ representa carbocicloheteroarilo de -C₃₋₈, alquenilheteroarilo de -C₂₋₆, alquilheteroarilo de -C₁₋₆, o heteroarilo de (CH₂)_aRC⁵R⁶(CH₂)_b;

donde a y b representan independientemente los números enteros 0-5 siempre que a+b=0-5; y

R⁵ y R⁶ son alqueno que, junto con el carbono al que están unidos, forman un grupo cicloalquilo de C₃₋₅, o un grupo heteroarilo bicíclico;

25 donde cualquiera de dichos grupos heteroarilo está opcionalmente sustituido con uno o más grupos seleccionados de alquilo de C₁₋₆, alquenilo de C₂₋₆, alquinilo de C₂₋₆, haloalquilo de C₁₋₆, tioalquilo de -C₁₋₆, -SO-alquilo de C₁₋₄, -SO₂-alquilo de C₁₋₄, alcoxi de C₁₋₆, -O-cicloalquilo de C₃₋₈, cicloalquilo de C₃₋₈, -SO₂-cicloalquilo de C₃₋₈, -SO-cicloalquilo de C₁₃₋₆, alqueniloxi de -C₃₋₆, alquiniloxi de C₃₋₆, -C(O)-alquilo de C₁₋₆, -C(O)O-alquilo de C₁₋₆, alcoxi de C₁₋₆- alquilo de C₁₋₆, nitro, halógeno, ciano, hidroxilo, -C(O)OH, -NH₂, NH-

30 alquilo de C₁₋₄, -N(alquilo de C₁₋₄)(alquilo de C₁₋₄), -C(O)N(alquilo de C₁₋₄)(alquilo de C₁₋₄), -C(O)NH₂, -C(O)NH(alquilo de C₁₋₄) y -C(O)NH(cicloalquilo de C₃₋₁₀) y cualquiera de dichos grupos carbociclico está opcionalmente sustituido con uno o más grupos seleccionados de alquilo de C₁₋₄, oxo, halógeno y alcoxi de C₁₋₄;

R² y R³ son uno de (i), (ii), (iii), (iv) o (v) definidos de la siguiente manera:

35 (i) R² representa alquilo de C₁₋₈, arilo, heteroarilo, carbociclico, heterociclico, alquilarilo de -C₁₋₄, alquiheteroarilo de -C₁₋₄, alquilcarbociclico de -C₁₋₄ o alquilheterociclico de -C₁₋₄; donde cualquiera de dichos grupos arilo y heteroarilo está opcionalmente sustituido con uno o más grupos seleccionados de alquilo de C₁₋₆, alquenilo de C₂₋₆, alquinilo de C₂₋₆, haloalquilo de C₁₋₆, hioalquilo de -C₁₋₆, -SO-alquilo de C₁₋₄, -SO₂-alquilo de C₁₋₄, alcoxi de C₁₋₆, -O-cicloalquilo de C₃₋₃, cicloalquilo de C₃₋₈, -SO₂-cicloalquilo de C₃₋₈,

40 -SO-cicloalquilo de C₁₃₋₆, alqueniloxi de C₃₋₆, alquiniloxi de C₃₋₆, -C(O)-alquilo de C₁₋₆, -C(O)O-alquilo de C₁₋₆, alcoxi de C₁₋₆- alquilo de C₁₋₆, nitro, halógeno, ciano, hidroxilo, -C(O)OH, -NH₂, NH-alquilo de C₁₋₄, -N(alquilo de C₁₋₄)(alquilo de C₁₋₄), -C(O)N(alquilo de C₁₋₄) (alquilo de C₁₋₄), -C(O)NH₂, -C(O)NH(alquilo de C₁₋₄) y -C(O)NH(cicloalquilo de C₃₋₁₀); y cualquiera de los grupos carbociclico y heterociclico mencionados anteriormente opcionalmente sustituido con uno o más grupos seleccionados de alquilo de C₁₋₄, oxo, halógeno y alcoxi de C₁₋₄; y

45 R³ representa H, alquilo de -C₁₋₄ o arilo con dicho arilo opcionalmente sustituido con uno o más grupos seleccionados de alquilo de C₁₋₆, alquenilo de C₂₋₆, alquinilo de C₂₋₆, haloalquilo de C₁₋₆, tioalquilo de -C₁₋₆, -SO-alquilo de C₁₁₋₄, -SO₂-alquilo de C₁₋₄, alcoxi de C₁₋₆, -O-cicloalquilo de

2-ciano(4-cianofenil)-3-(3-(4-metil-1H-imidazol-1-il)propil)guanidina,
 (3,4-diclorofenil)-2-ciano-3-(3-(4-metil-1H-imidazol-1-il)propil)guanidina,
 2-ciano(4-metoxifenil)-3-(3-(4-metil-1H-imidazol-1-il)propil)guanidina,
 2-ciano-1-[3-(4-metil-1H-imidazol-1-il)propil]-4-fenilbenceno-1-guanidina,
 2-ciano(3-(4-metil-1H-imidazol-1-il)propil)-3-(naftalen-2-il)guanidina,
 (S)-3-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-4-(4-(3,3-difluorobutoxi)-2,3-difluorofenil)-oxazolidin-2-ona,
 (S)-3-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-4-(4-(3,3-difluoropropoxi)-2-fluorofenil)oxazolidin-2-ona,
 (S)-3-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-4-(4-(3,3-difluorobutoxi)-2-fluorofenil)oxazolidin-2-ona,
 (S)-3-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-4-(4-(3,3-difluoropropoxi)fenil)oxazolidin-2-ona,
 (S)-3-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-4-(4-(2,2-difluoropropoxi)-3-fluorofenil)oxazolidin-2-ona,
 (S)-3-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-4-(4-(2,2-difluoropropoxi)-2,6-difluorofenil)oxazolidin-2-ona,
 (S)-3-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-4-(4-(2,2-difluoropropoxi)-2-fluorofenil)oxazolidin-2-ona,
 (S)-3-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-4-(4-(2,2-difluoropropoxi)-3,5-difluorofenil)oxazolidin-2-ona,
 (S)-3-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-4-(4-(3,3-difluorobutoxi)-3-fluorofenil)oxazolidin-2-ona,
 (S)-3-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-4-(4-(3,3-difluoropropoxi)-2,3-difluorofenil)oxazolidin-2-ona,
 (S)-3-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-4-(4-(3,3-difluoropropoxi)-3-fluorofenil)oxazolidin-2-ona,
 (S)-3-(1H-benzo[d]imidazol-6-il)-4-(4-(3,3-difluoropropoxi)-3,5-difluorofenil)oxazolidin-2-ona,
 (S)-5-(3-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-2-oxooxazolidin-4-il)-2-(2,2-difluoropropoxi)benzonitrilo,
 (S)-2-(3-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-2-oxooxazolidin-4-il)-5-(2,2-difluoropropoxi)benzonitrilo,
 (S)-3-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-4-(4-(4,4-difluorobutoxi)fenil)oxazolidin-2-ona,
 (S)-3-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-4-(4-(2,2-difluoropropoxi)-2,6-difluorofenil)oxazolidin-2-ona,
 (S)-3-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-4-(4-(3,3-difluoropirrolidin-1-il)-2-fluorofenil)oxazolidin-2-ona,
 (S)-3-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-4-(4-(3,3-difluoropirrolidin-1-il)-2,3-difluorofenil)oxazolidin-2-ona,
 (S)-3-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-4-(4-(3,3-difluoropirrolidin-1-il)-2,6-difluorofenil)oxazolidin-2-ona,
 (S)-3-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-4-(4-(3,3-difluoropirrolidin-1-il)-3-fluorofenil)oxazolidin-2-ona,
 3-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-4-(4-(3,3-difluoropirrolidin-1-il)fenil)oxazolidin-2-ona,
 (S)-2-(3-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-2-oxooxazolidin-4-il)-5-(3,3-difluoropirrolidin-1-il)benzonitrilo,
 (S)-5-(3-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-2-oxooxazolidin-4-il)-2-(3,3-difluoropirrolidin-1-il)benzonitrilo,
 (S)-3-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-4-(4-(4,4-difluorociclohexil)-2-fluorofenil)oxazolidin-2-ona,
 (S)-3-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-4-(4-(4,4-difluorociclohexil)fenil)oxazolidin-2-ona,
 (S)-3-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-4-(4-(3,3-difluorobutil)-2,3-difluorofenil)oxazolidin-2-ona,
 (S)-3-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-4-(4-(3,3-difluorobutil)-3-fluorofenil)oxazolidin-2-ona,
 (S)-3-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-4-(4-(3,3-difluorobutil)-2-fluorofenil)oxazolidin-2-ona,
 (R)-3-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-4-(4-(2,2-difluoropropoxi)-2-fluorofenil)oxazolidin-2-ona,
 3-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-4-(4-(2,2-difluoropropoxi)-2-fluorofenil)oxazolidin-2-ona,
 (R)-3-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-4-(4-(3,3-difluoropropoxi)-2,3-difluorofenil)oxazolidin-2-ona,
 5-tert-butil-1-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)imidazolidin-2-ona,
 1-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-5-ciclohexilimidazolidin-2-ona,
 40 1-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-5-fenilimidazolidin-2-ona,
 1-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-5-m-tolilimidazolidin-2-ona,
 1-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-5-(4-metoxifenil)imidazolid en-2-ona,
 1-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-5-(4-metoxifenil)imidazolid en-2-ona,
 1-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-5-(4-metoxifenil)imidazolid en-2-ona,
 (4R,5S)-1-(1H-benzo[d]imidazol-6-il)-5-(4-metoxifenil)-4-metilimidazolidin-2-ona,
 1-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-5-(3-metoxifenil)imidazolidin-2-ona,
 1-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-5-(2-metoxifenil)imidazolidin-2-ona,
 1-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-5-(4-etoxifenil)imidazolidin-2-ona,
 1-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-5-(4-propoxifenil)imidazolidin-2-ona,
 (R)-1-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-5-(4-propoxifenil)imidazolidin-2-ona,
 (S)-1-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-5-(4-propoxifenil)imidazolidin-2-ona,
 1-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-5-(4-butoxifenil)imidazolidin-2-ona,
 1-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-5-(4-pentiloxi)fenil)imidazolidin-2-ona,
 1-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-5-(4-isopropoxifenil)imidazolidin-2-ona,
 55 1-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-5-(4-metoxibenzo[d][1,3]dioxol-6-il)imidazolidin-2-ona,
 1-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-5-(2,3-dihidrobenzo[b][1,4]dioxin-6-il)imidazolidin-2-ona,
 5-(4-(1,1,2,2-tetrafluoroetoxi)fenil)-1-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)imidazolidin-2-ona,
 1-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-5-(2,2-difluorobenzo[d][1,3]dioxol-5-il)imidazolidin-2-ona,
 1-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-5-(3-fluoro-4-metoxifenil)imidazolidin-2-ona,
 60 1-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-5-(2,6-difluoro-4-metoxifenil)imidazolidin-2-ona,
 5-(4-(2-morfolinoetoxi)fenil)-1-(1H-benzo[d]imidazol-6-il)imidazolidin-2-ona,
 5-(4-(3-morfolinopropoxi)fenil)-1-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)imidazolidin-2-ona,
 5-(2-(2-morfolinoetoxi)fenil)-1-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)imidazolidin-2-ona,
 1-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-5-(4-fluorofenil)imidazolidin-2-ona,
 65 1-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-5-(2-fluorofenil)imidazolidin-2-ona,
 1-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-5-(3-fluorofenil)imidazolidin-2-ona,

1-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-5-(2,6-difluorofenil)imidazolidin-2-ona,
 1-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-5-(3,4-difluorofenil)imidazolidin-2-ona,
 1-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-5-(2-fluoro-5-(trifluorometil)fenil)imidazolidin-2-ona,
 1-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-5-(3-fluoro-5-(trifluorometil)fenil)imidazolidin-2-ona,
 1-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-5-(2-fluoro-4-(trifluorometil)fenil)imidazolidin-2-ona,
 1-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-5-(3-fluoro-4-(trifluorometil)fenil)imidazolidin-2-ona,
 1-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-5-(2-clorofenil)imidazolidin-2-ona,
 1-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-5-(3-clorofenil)imidazolidin-2-ona,
 1-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-5-(2,6-diclorofenil)imidazolidin-2-ona,
 1-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-5-(2,3-diclorofenil)imidazolidin-2-ona,
 1-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-5-(3,4-diclorofenil)imidazolidin-2-ona,
 (S)-1-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-5-(3,4-diclorofenil)imidazolidin-2-ona,
 1-(1H-1,3-benzodiazol-5-il)-5-(4-bifenil)imidazolidin-2-ona,
 (S)-1-(1H-1,3-benzodiazol-5-il)-5-(4-bifenil)imidazolidin-2-ona,
 (R)-1-(1H-1,3-benzodiazol-5-il)-5-(4-bifenil)imidazolidin-2-ona,
 1-(1H-1,3-benzodiazol-5-il)-5-(3-fluoro-4-bifenil)imidazolidin-2-ona,
 1-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-5-[4-(3-clorofenil)fenil]imidazolidin-2-ona,
 1-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-5-(3',4'-dicloro-4-bifenil)imidazolidin-2-ona,
 1-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-5-(3-fenilfenil)imidazolidin-2-ona,
 1-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-5-[3-(3-clorofenil)fenil]imidazolidin-2-ona,
 1-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-5-(3-cloro-4-morfolinofenil)imidazolidin-2-ona,
 1-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-5-(4-(4-fenilpiperazin-1-il)fenil)imidazolidin-2-ona,
 1-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-5-(2-cloro-6-(4-etylpirerazin-1-il)fenil)imidazolidin-2-ona,
 1-(H-imidazo[1,2-a]piridin-7-il)-5-fenilimidazolidin-2-ona,
 1-(H-imidazo[1,2-a]piridin-7-il)-5-(4-propoxifenil)imidazolidin-2-ona,
 5-(4-butoxifenil)-1-(H-imidazo[1,2-a]piridin-7-il)imidazolidin-2-ona,
 5-(2,6-difluoro-4-metoxifenil)-1-(H-imidazo[1,2-a]piridin-7-il)imidazolidin-2-ona,
 1-(H-imidazo[1,2-a]piridin-7-il)-5-(4-metoxibenzo[d][1,3]dioxol-6-il)imidazolidin-2-ona,
 5-(4-(2-morfolinoetoxi)fenil)-1-(H-imidazo[1,2-a]piridin-7-il)imidazolidin-2-ona,
 5-(2,6-difluorofenil)-1-(H-imidazo[1,2-a]piridin-7-il)imidazolidin-2-ona,
 5-(bifenil)-1-(H-imidazo[1,2-a]piridin-7-il)imidazolidin-2-ona,
 5-(3-fluorobifenil)-1-(H-imidazo[1,2-a]piridin-7-il)imidazolidin-2-ona,
 1-(H-imidazo[1,2-a]piridin-7-il)-5-(4-(4-fenilpiperazin-1-il)fenil)imidazolidin-2-ona,
 1-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-5-fenilimidazolidin-4-ona,
 1-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-5-(2,3,5-trifluorofenil)imidazolidin-4-ona,
 1-amino-3-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-4-(4-metoxifenil)imidazolidin-2-ona,
 (S)-3-(1H-benzo[d]imidazol-6-il)-4-feniloxazolidin-2-ona,
 (R)-3-(1H-benzo[d]imidazol-6-il)-4-feniloxazolidin-2-ona,
 (S)-3-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-4-isopropiloxazolidin-2-ona,
 (S)-3-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-4-benciloxazolidin-2-ona,
 (4S,5R)-3-(1H-benzo[d]imidazol-6-il)-4,5-difeniloxazolidin-2-ona,
 (4S,5S)-3-(1H-benzo[d]imidazol-6-il)-5-metil-4-feniloxazolidin-2-ona,
 (S)-3-(1H-benzo[d]imidazol-6-il)-5,5-dimetil-4-feniloxazolidin-2-ona,
 (S)-3-(1H-benzo[d]imidazol-6-il)-4-(4-propoxifenil)oxazolidin-2-ona,
 (S)-3-(1H-benzo[d]imidazol-6-il)-4-(2,3-dihidrobenzo[b][1,4]dioxin-7-il)oxazolidin-2-ona,
 (S)-4-(benzo[d][1,3]dioxol-6-il)-3-(1H-benzo[d]imidazol-6-il)oxazolidin-2-ona,
 (4S,5R)-3-(1H-benzo[d]imidazol-6-il)-4,5-bis(4-propoxifenil)oxazolidin-2-ona,
 (4S,5R)-3-(1H-benzo[d]imidazol-6-il)-4,5-bis(4-propoxifenil)oxazolidin-2-ona,
 3-(1H-benzo[d]imidazol-6-il)-5-fenil-4-(4-propoxifenil)oxazolidin-2-ona,
 (1H-benzo[d]imidazol-6-il)-5-fenil-4-(4-propoxifenil)oxazolidin-2-ona,
 (S)-4-(4-(2-(piperazin-1-il)etoxi)fenil)-3-(1H-benzo[d]imidazol-6-il)oxazolidin-2-ona,
 (S)-4-(4-(2-morfolinoetoxi)fenil)-3-(1H-benzo[d]imidazol-6-il)oxazolidin-2-ona,
 (S)-3-(1H-benzo[d]imidazol-6-il)-4-(2,3-difluorofenil)oxazolidin-2-ona,
 (S)-3-(1H-benzo[d]imidazol-6-il)-4-(3-fluorofenil)oxazolidin-2-ona,
 (S)-3-(1H-benzo[d]imidazol-6-il)-4-(3-fluoro-5-(trifluorometil)fenil)oxazolidin-2-ona,
 (S)-3-(1H-benzo[d]imidazol-6-il)-4-(3-clorofenil)oxazolidin-2-ona,
 (S)-3-(1H-benzo[d]imidazol-6-il)-4-(4-(4-clorofenil)oxazolidin-2-ona,
 (S)-3-(1H-benzo[d]imidazol-6-il)-4-[4-(3-clorofenil)fenil]oxazolidin-2-ona,
 (S)-3-(1H-benzo[d]imidazol-6-il)-4-[3-(3-clorofenil)fenil]oxazolidin-2-ona,
 (S)-3-(1H-benzo[d]imidazol-6-il)-4-(4-(4-fenilpiperazin-1-il)fenil)oxazolidin-2-ona,
 (S)-3-(1H-benzo[d]imidazol-6-il)-4-(4-(4-metilpiperazin-1-il)fenil)oxazolidin-2-ona,
 (S)-3-(1H-benzo[d]imidazol-6-il)-4-(3-(4-fenilpiperazin-1-il)fenil)oxazolidin-2-ona,
 (S)-3-(2-metil-1H-benzo[d]imidazol-6-il)-4-feniloxazolidin-2-ona,
 (S)-4-(1H-benzo[d]imidazol-6-il)-5-(4-propoxifenil)morfolin-3-ona,
 3-(1H-benzo[d]imidazol-6-il)-4-(4-propoxifenil)-1,3-oxazinan-2-ona,
 (S)-3-(H-imidazo[1,2-a]piridin-7-il)-4-feniloxazolidin-2-ona,

(4S,5R)-3-(H-imidazo[1,2-a]piridin-7-il)-4,5-difeniloxazolidin-2-ona,
 (4S,5R)-3-(imidazo[1,2-a]piridin-6-il)-4,5-difeniloxazolidin-2-ona,
 (S)-3-(H-imidazo[1,2-a]piridin-7-il)-4-(4-propoxifenil)oxazolidin-2-ona,
 (S)-4-(4-clorofenil)-3-(H-imidazo[1,2-a]piridin-7-il)oxazolidin-2-ona,
 3-(imidazo[1,2-a]piridin-7-il)-4-(4-propoxifenil)-1,3-oxazinan-2-ona,
 5-(2-fenilpirrolidin-1-il)-1H-benzo[d]imidazol,
 5-(2-(4-metoxifenil)pirrolidin-1-il)-1H-benzo[d]imidazol,
 5-(2-(4-fluorofenil)pirrolidin-1-il)-1H-benzo[d]imidazol,
 5-(2-(4-clorofenil)pirrolidin-1-il)-1H-benzo[d]imidazol,
 5-(2-bencilpirrolidin-1-il)-1H-benzo[d]imidazol,
 5-(2-(4-clorobencil)pirrolidin-1-il)-1H-benzo[d]imidazol,
 5-(2-(4-fluorobencil)pirrolidin-1-il)-1H-benzo[d]imidazol,
 5-(pirrolidin-1-il)-1H-benzo[d]imidazol,
 5-(2-(4-metoxibencil)pirrolidin-1-il)-1H-benzo[d]imidazol,
 3-(1H-benzo[d]imidazol-6-il)-2-(4-clorofenil)tiazolidin-4-ona,
 3-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-2-feniltiazolidin-4-ona,
 3-(1H-benzo[d]imidazol-6-il)-2-(4-fluorofenil)tiazolidin-4-ona,
 3-(1H-benzo[d]imidazol-6-il)-2-(naftalen-1-il)tiazolidin-4-ona,
 3-(1H-benzo[d]imidazol-6-il)-2-(4-fenoxifenil)tiazolidin-4-ona,
 3-(1H-benzo[d]imidazol-6-il)-2-(2,6-difluorofenil)tiazolidin-4-ona,
 3-(1H-benzo[d]imidazol-6-il)-2-(tiofen-3-il)tiazolidin-4-ona,
 3-(1H-benzo[d]imidazol-6-il)-5-metil-2-feniltiazolidin-4-ona,
 3-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-2-feniltiazolidina-4-tiona,
 3-(1H-benzo[d]imidazol-6-il)-2-(4-fenoxifenil) tiazolidina-4-tiona,
 1-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-5-(4-fluorofenil)pirrolidin-2-ona,
 1-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-5-(4-metoxifenil)pirrolidin-2-ona,
 1-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-5-(4-propoxifenil)pirrolidin-2-ona,
 1-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-5-(2,3-dihidrobenzo[b][1,4]dioxin-6-il)pirrolidin-2-ona,
 1-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-5-fenilpirrolidin-2-ona,
 2-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-3-fenilisoindolin-1-ona,
 2-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-3-(4-bifenil)isoindolin-1-ona,
 2-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-3-(4-fluorofenil)isoindolin-1-ona,
 2-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-3-(3-fluorofenil)isoindolin-1-ona,
 2-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-3-(3,5-difluorofenil)isoindolin-1-ona,
 2-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-3-(4-clorofenil)isoindolin-1-ona,
 2-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-3-(3,4-diclorofenil)isoindolin-1-ona,
 2-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-3-(3-cloro-5-fluorofenil)isoindolin-1-ona,
 2-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-3-(4-metoxifenil)isoindolin-1-ona,
 2-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-3-(4-propoxifenil)isoindolin-1-ona,
 2-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-3-(3-fluoro-4-metoxifenil)isoindolin-1-ona,
 2-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-3-(3,4-dimetoxifenil)isoindolin-1-ona,
 3-(benzo[d][1,3]dioxol-6-il)-2-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)isoindolin-1-ona,
 2-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-3-(4-fenoxifenil)isoindolin-1-ona,
 2-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-4,7-dicloro-3-(4-metoxifenil)isoindolin-1-ona,
 2-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-5,6-dicloro-3-(4-metoxifenil)isoindolin-1-ona,
 2-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-5,6-dicloro-3-(4-propoxifenil)isoindolin-1-ona,
 (S)-2-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-3-(3,4-dimetoxifenil)isoindolin-1-ona,
 (R)-2-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-3-(3,4-dimetoxifenil)isoindolin-1-ona,
 (R)-2-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-3-(4-propoxifenil)isoindolin-1-ona,
 (S)-2-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-3-(4-propoxifenil)isoindolin-1-ona,
 (R)-2-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-3-(4-clorofenil)isoindolin-1-ona,
 (S)-2-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-3-(4-clorofenil)isoindolin-1-ona,
 1-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-5-(4-fenilciclohexil)imidazolidin-2-ona,
 1-(1H-benzo[d]imidazol-6-il)-5-(1-fenilpiperidin-4-il)imidazolidin-2-ona,
 1-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-5-(4-(3-metoxipropil)fenil)imidazolidin-2-ona,
 1-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-5-(4-hidroxifenil)imidazolidin-2-ona,
 1-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-5-(2-hidroxifenil)imidazolidin-2-ona,
 1-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-5-(2,4-dihidroxifenil)imidazolidin-2-ona,
 1-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-5-(3,4-dihidroxifenil)imidazolidin-2-ona,
 1-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-5-(3-hidroxifenil)imidazolidin-2-ona, 1-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-5-(4-ciclohexiloxi)fenil)imidazolidin-2-ona,
 5-(4-(2-metoxietoxi)fenil)-1-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)imidazolidin-2-ona,
 (S)-5-(4-(2-(dimetilamino)etoxi)fenil)-1-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)imidazolidin-2-ona,
 3-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-1-fenetil-4-(4-propoxifenil)imidazolidin-2-ona,
 3-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-1-(naftalen-2-il)metil)-4-(4-propoxifenil)imidazolidin-2-ona,
 3-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-1-(3-fenilpropil)-4-(4-propoxifenil)imidazolidin-2-ona,

3-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-1-bencil-4-(4-propoxifenil)imidazolidin-2-ona,
 1-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-5-(4-fluoro-3-metoxifenil)imidazolidin-2-ona,
 1-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-5-(3-fluoro-4-propoxifenil)imidazolidin-2-ona,
 1-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-5-(2-fluoro-4-propoxifenil)imidazolidin-2-ona,
 5 (S)-1-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-5-(4-(dietilamino)fenil)imidazolidin-2-ona,
 1-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-5-(4-clorofenil)imidazolidin-2-ona,
 1-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-5-(4-ciclohexilfenil)imidazolidin-2-ona,
 1-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-5-(4-(4-morfolinociclohexil)fenil)imidazolidin-2-ona,
 10 (S)-1-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-5-(4-(1-metilpiperidin-4-il)fenil)imidazolidin-2-ona,
 1-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-5-(4-(tetrahidro-2H-piran-4-il)fenil)imidazolidin-2-ona,
 1-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-5-(4-(4-oxociclohexil)fenil)imidazolidin-2-ona,
 (S)-1-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-5-(4-(4,4-difluorociclohexil)fenil)imidazolidin-2-ona,
 15 1-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-5-(3-(pirrolidin-1-il)fenil)imidazolidin-2-ona,
 1-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-5-(4-(piperidin-1-il)fenil)imidazolidin-2-ona,
 1-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-5-(3-(piperidin-1-il)fenil)imidazolidin-2-ona,
 20 1-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-5-(4-morfolinofenil)imidazolidin-2-ona,
 5-(4-ciclohexilfenil)-1-(H-imidazo[1,2-a]piridin-7-il)imidazolidin-2-ona,
 1-(H-imidazo[1,2-a]piridin-7-il)-5-(4-(pirrolidin-1-il)fenil)imidazolidin-2-ona,
 1-(H-imidazo[1,2-a]piridin-7-il)-5-(3-(pirrolidin-1-il)fenil)imidazolidin-2-ona,
 25 1-(H-imidazo[1,2-a]piridin-7-il)-5-(4-(piperidin-1-il)fenil)imidazolidin-2-ona,
 1-(H-imidazo[1,2-a]piridin-7-il)-5-(3-(piperidin-1-il)fenil)imidazolidin-2-ona,
 1-(H-imidazo[1,2-a]piridin-7-il)-5-(1-fenilpiperidin-4-il)imidazolidin-2-ona,
 (S)-3-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-4-(4-(3-metoxipropil)fenil)oxazolidin-2-ona,
 3-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-4-(4-(3-dimetilamino)propil)fenil)oxazolidin-2-ona,
 25 (S)-3-(7-metil-1H-benzo[d]imidazol-5-il)-4-feniloxazolidin-2-ona,
 (S)-3-(6-fluoro-1H-benzo[d]imidazol-5-il)-4-feniloxazolidin-2-ona,
 (S)-3-(7-fluoro-1H-benzo[d]imidazol-5-il)-4-feniloxazolidin-2-ona,
 (S)-3-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-4-(ciclohexilmetyl)oxazolidin-2-ona,
 30 (S)-3-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-4-ciclohexiloxazolidin-2-ona,
 (S)-3-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-4-(4-fenilciclohexil)oxazolidin-2-ona,
 (S)-3-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-4-(1-fenilpiperidin-4-il)oxazolidin-2-ona,
 (S)-4-(1-acetilpiperidin-4-il)-3-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)oxazolidin-2-ona,
 35 3-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-4-(1-feniletil)oxazolidin-2-ona,
 (S)-4-(4-propoxibencil)-3-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)oxazolidin-2-ona,
 (S)-4-(4-isopropoxibencil)-3-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)oxazolidin-2-ona,
 (S)-4-(4-(ciclohexiloxi)bencil)-3-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)oxazolidin-2-ona,
 40 4-(4-morfolinobencil)-3-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)oxazolidin-2-ona,
 (S)-3-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-4-fenetiloxazolidin-2-ona,
 3-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-4-(4-(ciclohexiloxi)fenil)oxazolidin-2-ona,
 (S)-3-(7-metil-1H-benzo[d]imidazol-5-il)-4-(4-propoxifenil)oxazolidin-2-ona,
 45 (S)-3-(6,7-dimetil-1H-benzo[d]imidazol-5-il)-4-(4-propoxifenil)oxazolidin-2-ona,
 (S)-4-(4-(2-metoxietoxi)fenil)-3-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)oxazolidin-2-ona,
 (S)-4-(4-(2-dimetilamino)etoxi)fenil)-3-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)oxazolidin-2-ona,
 50 3-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-4-(2,6-difluoro-4-metoxifenil)oxazolidin-2-ona,
 (S)-3-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-4-(4-(4-dietilamino)fenil)oxazolidin-2-ona,
 (S)-3-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-4-(4-(bis(2-metoxietil)amino)fenil)oxazolidin-2-ona,
 (S)-3-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-4-(4-(diciclopropilamino)fenil)oxazolidin-2-ona,
 (S)-3-(1H-benzo[d]imidazol-6-il)-4-(bifenil-4-il)oxazolidin-2-ona,
 55 3-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-4-(4-(4-oxociclohexil)fenil)oxazolidin-2-ona,
 3-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-4-(4-(4-metoxiciclohexil)fenil)oxazolidin-2-ona,
 3-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-4-(4-(4-hidroxiciclohexil)fenil)oxazolidin-2-ona,
 3-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-4-(4-(4-morfolinociclohexil)fenil)oxazolidin-2-ona,
 60 3-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-4-(4-(pirrolidin-1-il)fenil)oxazolidin-2-ona,
 (S)-3-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-4-(4-(piperidin-1-il)fenil)oxazolidin-2-ona,
 (S)-3-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-4-(3-(piperidin-1-il)fenil)oxazolidin-2-ona,
 (S)-3-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-4-(4-morfolinofenil)oxazolidin-2-ona,
 (S)-3-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-4-(3-morfolinofenil)oxazolidin-2-ona,
 65 3-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-4-(4-(tetrahidro-2H-piran-4-il)fenil)oxazolidin-2-ona,
 3-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-4-(4-(1-metilpiperidin-4-il)fenil)oxazolidin-2-ona,
 (S)-3-(1H-benzo[d]imidazol-6-il)-4-(3-(4-metilpiperazin-1-il)fenil)oxazolidin-2-ona,
 (S)-3-(3-metilH-imidazo[1,2-a]piridin-7-il)-4-feniloxazolidin-2-ona,
 (S)-3-(3-(trifluorometil)H-imidazo[1,2-a]piridin-7-il)-4-feniloxazolidin-2-ona,
 (S)-4-(2,3-dihidrobenzo[b][1,4]dioxin-6-il)-3-(H-imidazo[1,2-a]piridin-7-il)oxazolidin-2-ona,
 (S)-4-(4-ciclohexilfenil)-3-(H-imidazo[1,2-a]piridin-7-il)oxazolidin-2-ona,
 (S)-3-(H-imidazo[1,2-a]piridin-7-il)-4-(4-(piperidin-1-il)fenil)oxazolidin-2-ona,
 65 (S)-3-(H-imidazo[1,2-a]piridin-7-il)-4-(4-morfolinofenil)oxazolidin-2-ona,

(S)-3-(H-imidazo[1,2-a]piridin-7-il)-4-(4-(4-fenilpiperazin-1-il)fenil)oxazolidin-2-ona,
 (S)-1-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-5-(4-(bis(2-metoxietil)amino)fenil)imidazolidin-2-ona,
 5-(4-(N-(2-(dimetilamino)etil)-N-metilamino)fenil)-1-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)imidazolidin-2-ona,
 3-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-4-(4-(4,4-difluorociclohexil)fenil)oxazolidin-2-ona,
 2-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-4,7-difluoro-3-(4-propoxifenil)isoindolin-1-ona,
 2-(H-imidazo[1,2-a]piridin-7-il)-3-(3,4-dimetoxifenil)isoindolin-1-ona,
 (S)-2-(H-imidazo[1,2-a]piridin-7-il)-3-(3,4-dimetoxifenil)isoindolin-1-ona,
 (S)-3-(3,4-dimetoxifenil)-2-(3-metilH-imidazo[1,2-a]piridin-7-il)isoindolin-1-ona,
 1-(1H-Benzoimidazol-5-il)-5-benzo[c][1,2,5]tiadiazol-5-il-4-ciclopropanocarbonil-3-hidroxi-1,5-dihidro-pirrol-2-ona ,
 1-(1H-benzoimidazol-5-il)-3-hidroxi-4-fenil-5-quinolin-3-il-1,5-dihidro-pirrol-2-ona,
 1-(1H-benzo[d]imidazol-6-il)-5-(2,3-difluorofenil)-3-hidroxi-4-metil-1H-pirrol-2(5H)-ona,
 1-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-5-(2,3-diclorofenil)-3-hidroxi-4-metil-1H-pirrol-2(5H)-ona,
 1-(1H-Benzoimidazol-5-il)-3-hidroxi-5-(8-hidroxi-quinolin-2-il)-4-(3-metil-butiril)-1,5-dihidro-pirrol-2-ona,
 1-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-4-(ciclopropanocarbonil)-3-hidroxi-5-(8-hidroxiquinolin-2-il)-1,5-dihidro-2H-pirrol-2-ona,
 1-(1H-benzoimidazol-5-il)-3-hidroxi-4-fenil-5-(2,3,5-trifluoro-fenil)-1,5-dihidro-pirrol-2-ona,
 1-(1H-Benzo[d]imidazol-6-il)-5-(2,3-difluorofenil)-3-metoxi-4-metil-1H-pirrol-2(5H)-ona,
 1-(1H-Benzo[d]imidazol-6-il)-5-(2,3-diclorofenil)-3-metoxi-4-metil-1H-pirrol-2(5H)-ona,
 1-(1H-Benzo[d]imidazol-6-il)-5-(4-ciclohexilfenil)-3-metoxi-4-metil-1H-pirrol-2(5H)-ona,
 5-(benzo[c][1,2,5]tiadiazol-6-il)-1-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)imidazolidin-2,4-diona,
 5-fenil-1-(100 μ l H-benzo[d]imidazol-5-il)imidazolidin-2,4-diona,
 1-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-5-(2-bromo-5-fluorofenil)imidazolidin-2,4-diona,
 1-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-5-(4-propoxifenil)imidazolidin-2,4-diona,
 1-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-5-(3-hidroxi-4-metoxifenil)imidazolidin-2,4-diona,
 1-(1H-bencimidazol-5-il)-5-(1,1'-bifenil-4-il)imidazolidin-2,4-diona,
 1-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-5-(3-clorofenil)imidazolidin-2,4-diona,
 1-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-5-(2,3-dihidrobenzo[b][1,4]dioxin-7-il)imidazolidin-2,4-diona,
 1-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-5-(2-clorofenil)imidazolidin-2,4-diona,
 1-(1H-Benzoimidazol-5-il)-4-bencilimino-5-(4-clorofenil)-imidazolidin-2-ona,
 5-benzo[1,3]dioxol-5-il-1-(1H-benzoimidazol-5-il)-4-(3-(2-oxo-pirrolidin-1-il)-propilimino)-imidazolidin-2-ona,
 1-(1H-Benzoimidazol-5-il)-5-(3-cloro-2,6-difluoro-fenil)-4-(1,2,3,4-tetrahydro-naftalen-1-ilimino)-imidazolidin-2-ona,
 1-(1H-benzoimidazol-5-il)-5-(4-bromo-fenil)-4-(ciclohexilimino)-imidazolidin-2-ona,
 1-(1H-Benzoimidazol-5-il)-5-(4-cloro-fenil)-4-(ciclopentilimino)-imidazolidin-2-ona,
 1-(1H-Benzoimidazol-5-il)-4-bencilimino-5-(4-bromo-fenil)-imidazolidin-2-ona,
 1-(1H-Benzoimidazol-5-il)-5-(3-cloro-2,6-difluoro-fenil)-4-(ciclohexilimino)-imidazolidin-2-ona,
 1-(1H-Benzoimidazol-5-il)-4-(ciclopentilimino)-5-(1H-indol-5-il)-imidazolidin-2-ona,
 1-(1H-benzoimidazol-5-il)-5-(3-cloro-2,6-difluoro-fenil)-4-(1,2,2-trimetil-propilimino)-imidazolidin-2-ona,
 1-(1H-benzoimidazol-5-il)-5-(4-bromo-fenil)-4-[2,3-dihidro-benzo[1,4]dioxin-6-ilimino]-imidazolidin-2-ona,
 (R,S)-1-(1H-Benzoimidazol-5-il)-5-(4-bromo-fenil)-4-(S)-indan-1-ilimino)-imidazolidin-2-ona,
 5-(4-propoxifenil)-1-(H-imidazo[1,2-a]piridin-7-il)imidazolidin-2-ona,
 (S)-3-(1H-benzo[d]imidazol-6-il)-4-(4-propoxifenil)oxazolidin-2-ona,
 2-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-3-(3,4-dimetoxifenil)isoindolin-1-ona, y
 2-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-3-(4-propoxi fenil)isoindolin-1-ona.

45 14. Composición para su uso según la reivindicación 13 que se selecciona del grupo que consiste en 1-(3,4-Dimetoxifenil)-3-[3-(1H-imidazol-1-il)propil]tiourea y (S)-1-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-5-(4-propoxifenil)imidazolidin-2-ona, y los compuestos 1-(1H-Benzoimidazol-5-il)-5-benzo[c][1,2,5]tiadiazol-5-il-4-ciclopropanocarbonil-3-hidroxi-1,5-dihidro-pirrol-2-ona, 1-(1H-Benzoimidazol-5-il)-3-hidroxi-4-fenil-5-quinolin-3-il-1,5-dihidro-pirrol-2-ona, 1-(1H-benzo[d]imidazol-6-il)-5-(2,3-difluorofenil)-3-hidroxi-4-metil-1H-pirrol-2(5H)-ona, 1-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-5-(2,3-diclorofenil)-3-hidroxi-4-metil-1H-pirrol-2(5H)-ona, 1-(1H-Benzoimidazol-5-il)-4-(3-metil-butiril)-1,5-dihidro-pirrol-2-ona, 1-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-3-hidroxi-5-(8-hidroxi-quinolin-2-il)-1,5-dihidro-2H-pirrol-2-ona, 1-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-3-hidroxi-4-fenil-5-(2,3,5-trifluoro-fenil)-1,5-dihidro-pirrol-2-ona, 1-(1H-Benzo[d]imidazol-6-il)-5-(2,3-difluorofenil)-3-metoxi-4-metil-1H-pirrol-2(5H)-ona, 1-(1H-benzo[d]imidazol-6-il)-5-(2,3-diclorofenil)-3-metoxi-4-metil-1H-pirrol-2(5H)-ona, 1-(1H-benzo[d]imidazol-6-il)-5-(4-ciclohexilfenil)-3-metoxi-4-metil-1H-pirrol-2(5H)-ona, 5-(benzo[c][1,2,5]tiadiazol-6-il)-1-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)imidazolidin-2,4-diona, 5-fenil-1-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)imidazolidin-2,4-diona, 1-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-5-(4-propoxifenil)imidazolidin-2,4-diona, 1-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-5-(3-hidroxi-4-metoxifenil)imidazolidin-2,4-diona, 1-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-5-(1,1'-bifenil-4-il)imidazolidin-2,4-diona, 1-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-3-hidroxi-4-fenil-5-(3-clorofenil)imidazolidin-2,4-diona, 1-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-5-(2-bromo-5-fluorofenil)imidazolidin-2,4-diona, 1-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-5-(2-clorofenil)imidazolidin-2,4-diona, 1-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-5-(4-ciclohexilfenil)-3-metoxi-4-metil-1H-pirrol-2(5H)-ona, 5-benzo[1,3]dioxol-5-il-1-(1H-benzoimidazol-5-il)-4-(3-oxo-pirrolidin-1-il)-imidazolidin-2-ona, 1-(1H-Benzoimidazol-5-il)-5-(3-cloro-2,6-difluoro-fenil)-4-(1,2,3,4-tetrahydro-naftalin-1-ilimino)-imidazolidin-2-ona, 1-(1H-Benzoimidazol-5-il)-5-(4-bromo-fenil)-4-(ciclohexilimino)-imidazolidin-2-ona, 1-(1H-Benzoimidazol-5-il)-4-bencilimino-5-(4-bromo-fenil)-imidazolidin-2-ona, 1-(1H-Benzoimidazol-5-il)-5-(3-cloro-2,6-difluoro-fenil)-4-(ciclohexilimino)-imidazolidin-2-ona , 1-(1H-Benzoimidazol-5-il)-4-(ciclopentilimino)-5-(1H-indol-5-

5 il)-imidazolidin-2-ona, 1-(1H-Benzoimidazol-5-il)-5-(3-cloro-2,6-difluoro-fenil)-4-(1,2,2-trimetil-propilimino)-imidazolidin-2-ona, 1-(1H-Benzoimidazol-5-il)-5-(4-bromo-fenil)-4-[2,3-dihidro-benzo[1,4]dioxin-6-ilimino]-imidazolidin-2-ona, (R,S)-1-(1H-Benzoimidazol-5-il)-5-(4-bromo-fenil)-4-((S)-indano-1-ilimino)-imidazolidin-2-ona, (S)-3-(1H-benzo[d]imidazol-6-il)-4-(4-propoxifenil)oxazolidin-2-ona, 2-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-3-(3,4-dimetoxifenilo))isoindolin-1-ona, o 2-(1H-benzo[d]imidazol-5-il)-3-(4-propoxifenil)isoindolin-1-ona.

10 15. Composición para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-14, donde el cáncer se selecciona del grupo que consiste en leucemia, leucemia mieloide aguda (LMA), leucemia mieloide crónica, leucemia linfoblástica aguda (LLA), linfoma no Hodgkin (LNH) , mieloma múltiple (MM), cáncer de ovario, gliomas, cáncer de colon, cáncer de mama, leiomiosarcoma, tumores neuroendocrinos pancreáticos, cáncer de pulmón de células pequeñas y cáncer de vejiga, HNSCC, cáncer gástrico, cáncer de esófago, T-ALL, mesotelioma, glioblastoma, melanoma , NSCLC.

Fig. 1

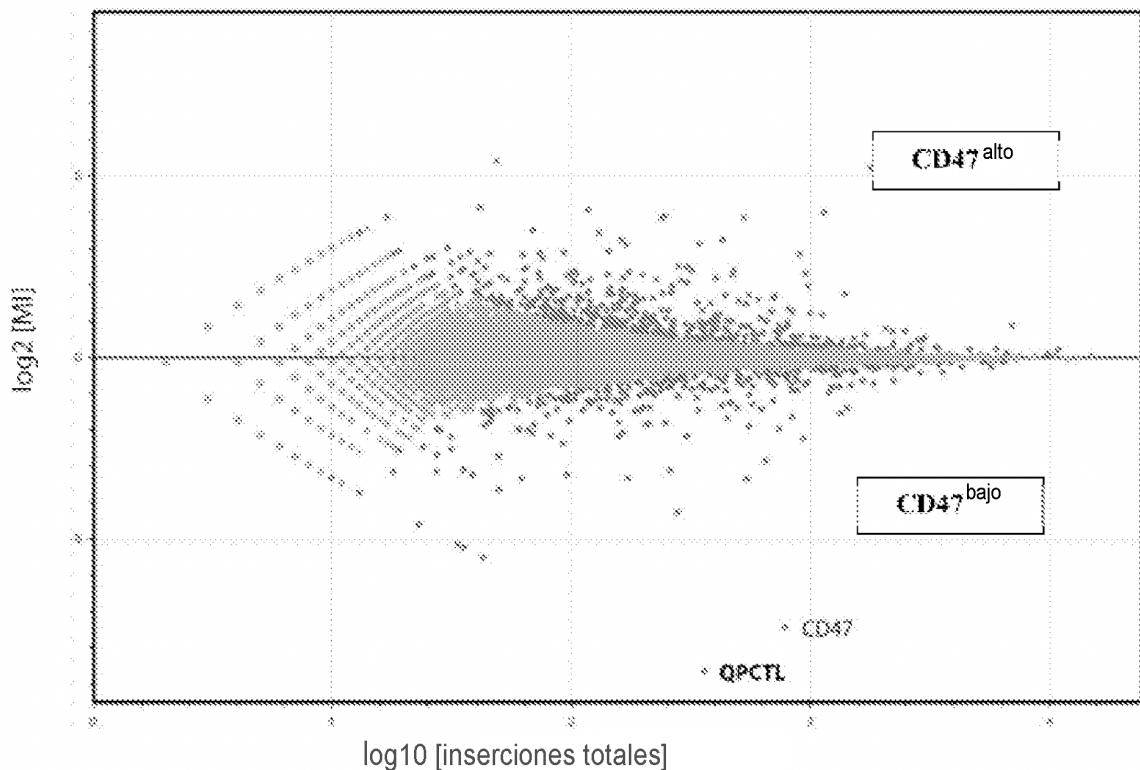


Fig. 2A

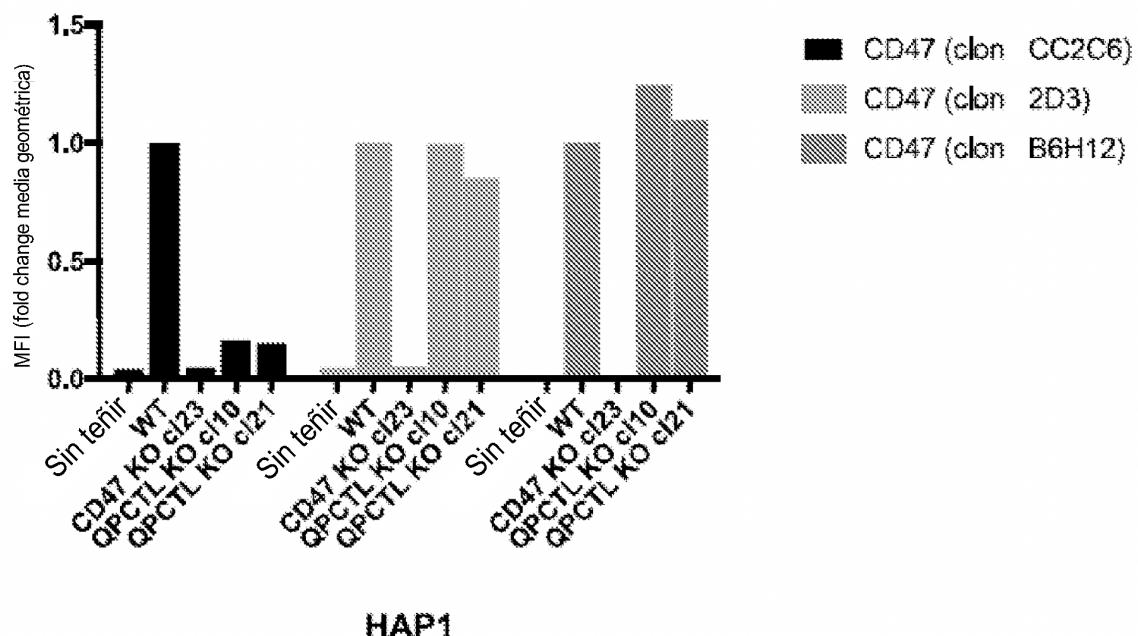
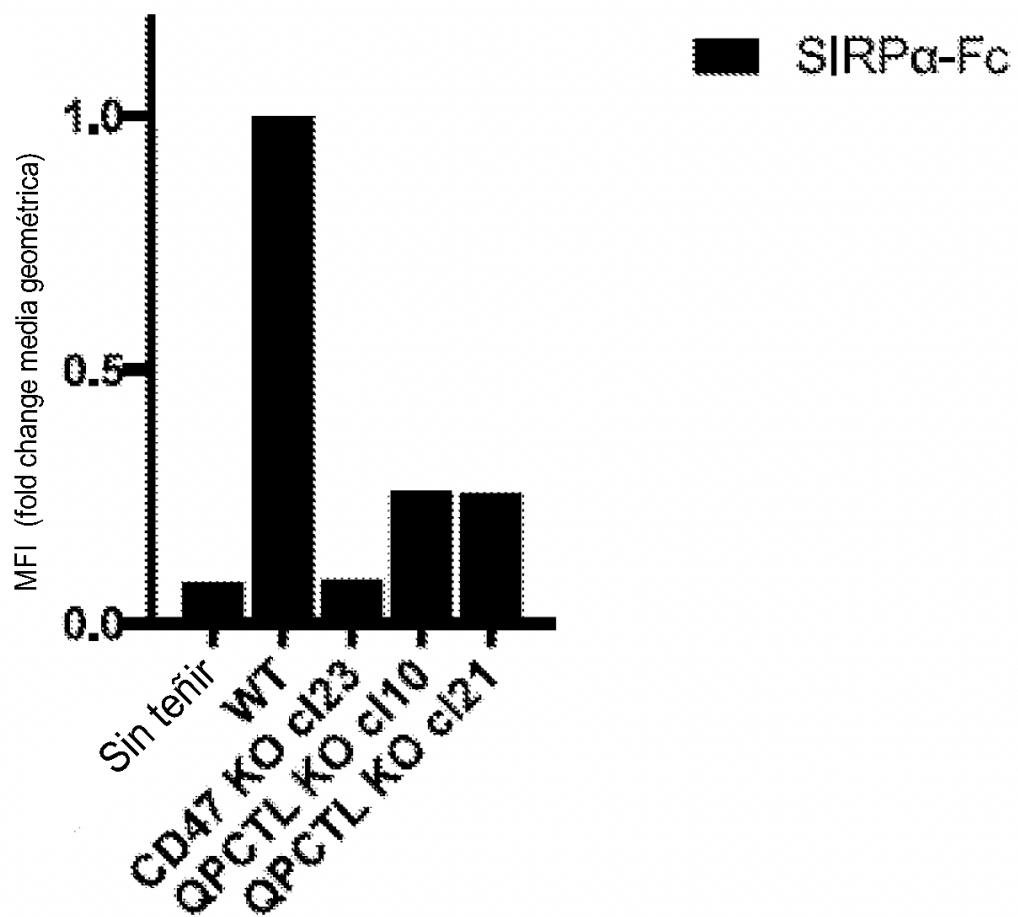


Fig. 2B



HAP1

Fig. 3

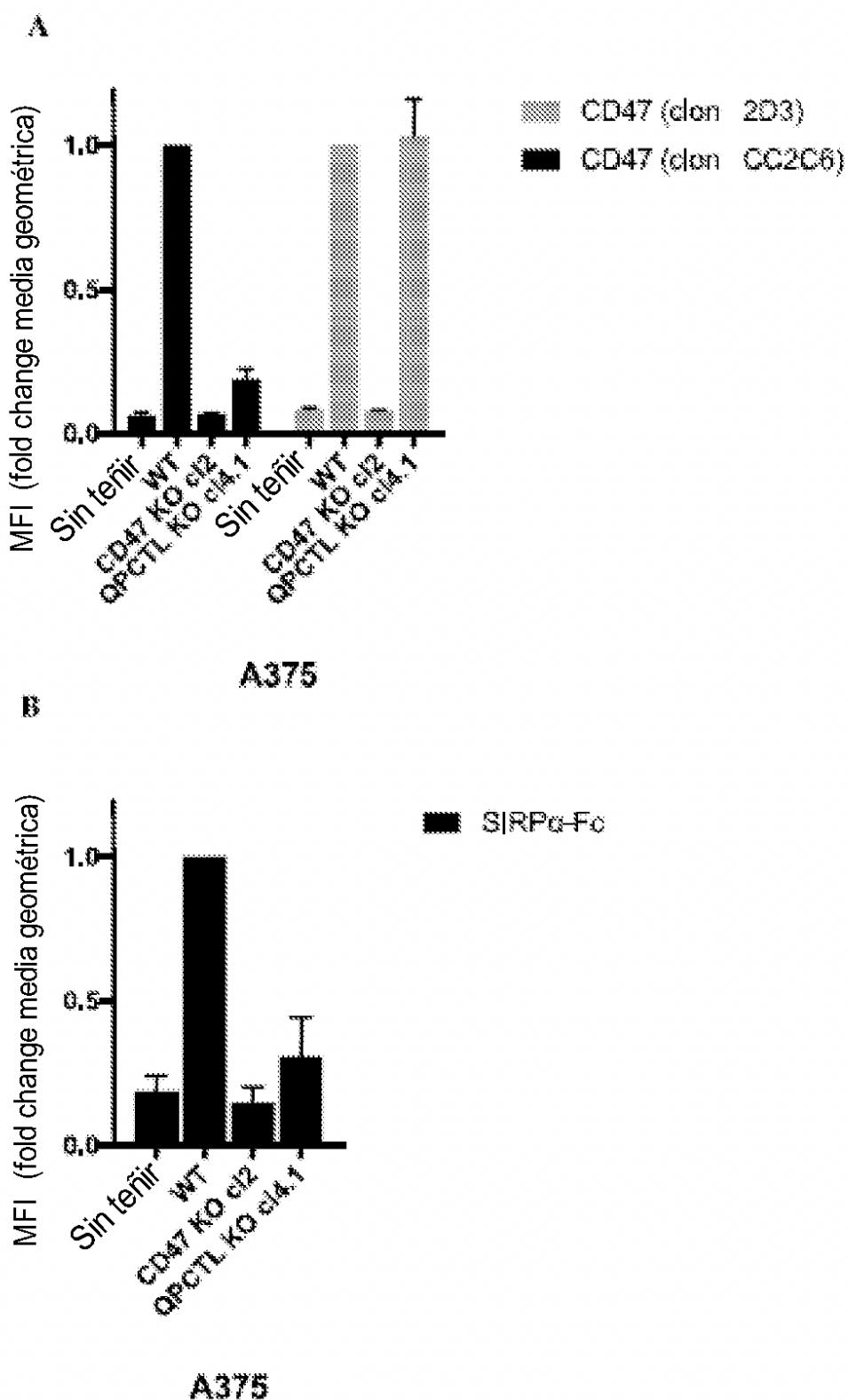


Fig. 4

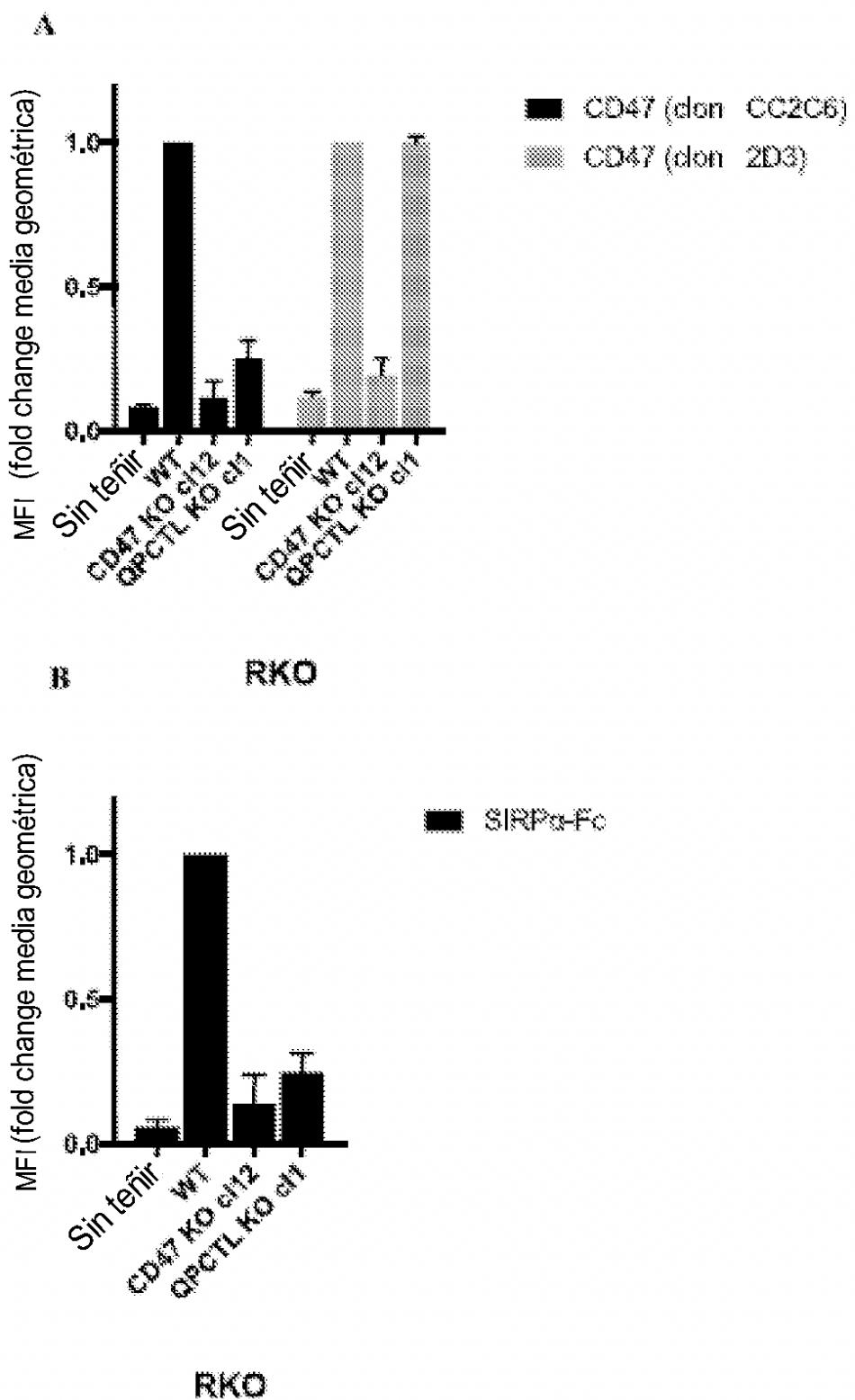


Fig. 5

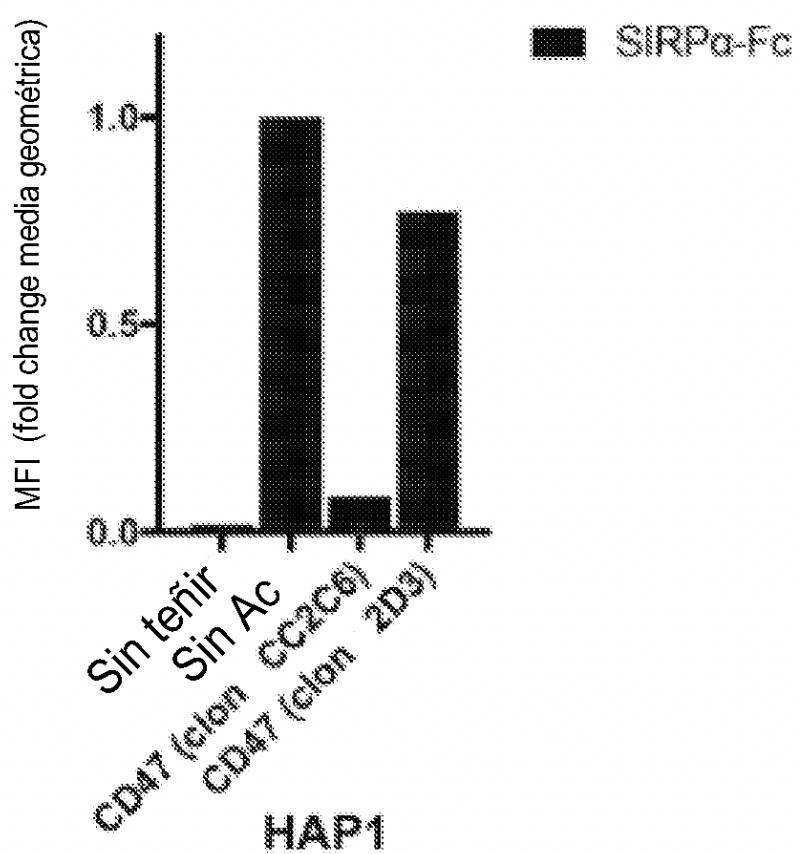


Fig. 6

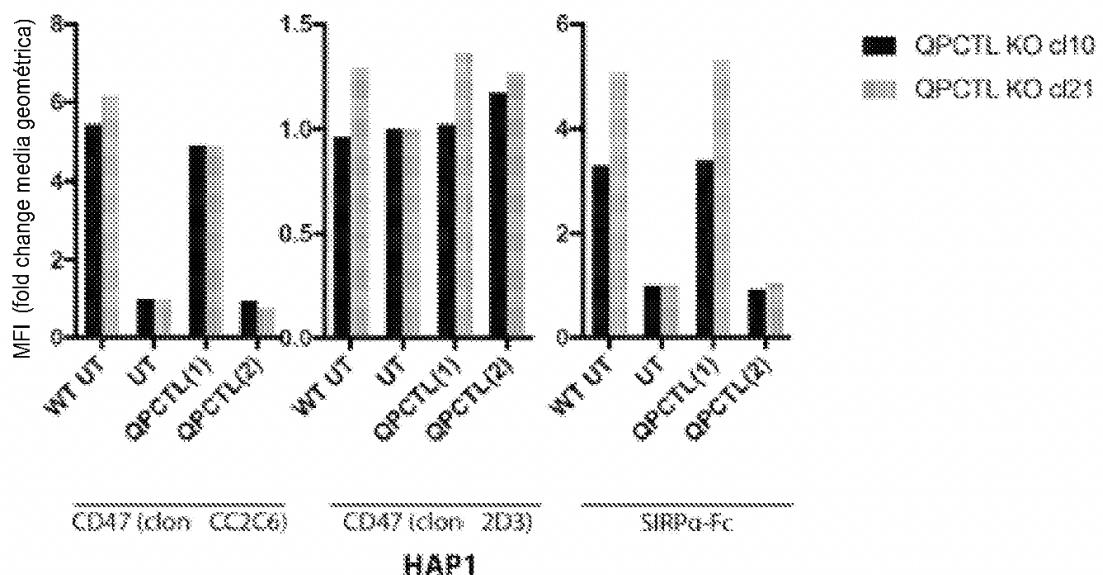


Fig. 7

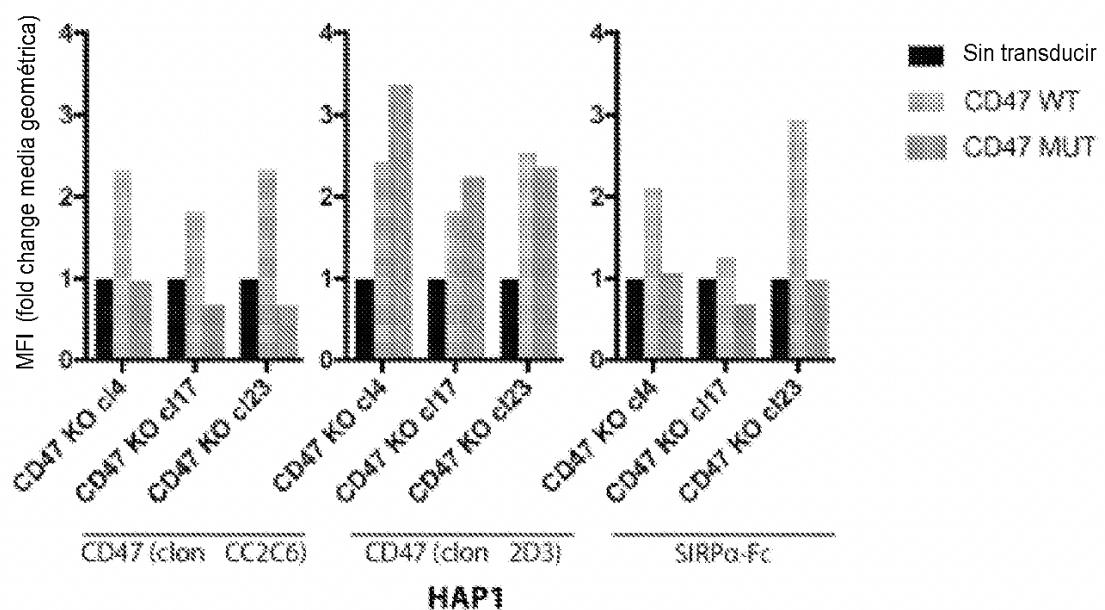


Fig. 8

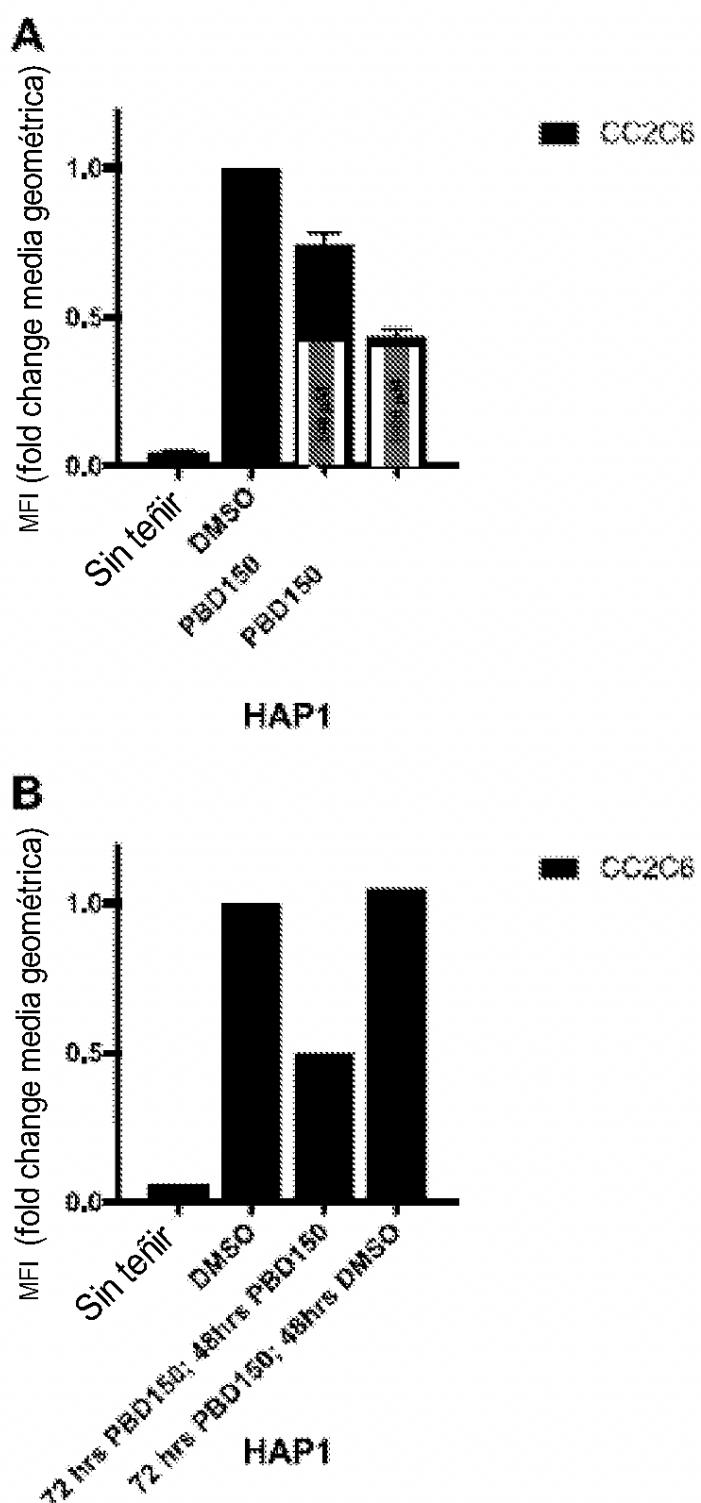


Fig. 9

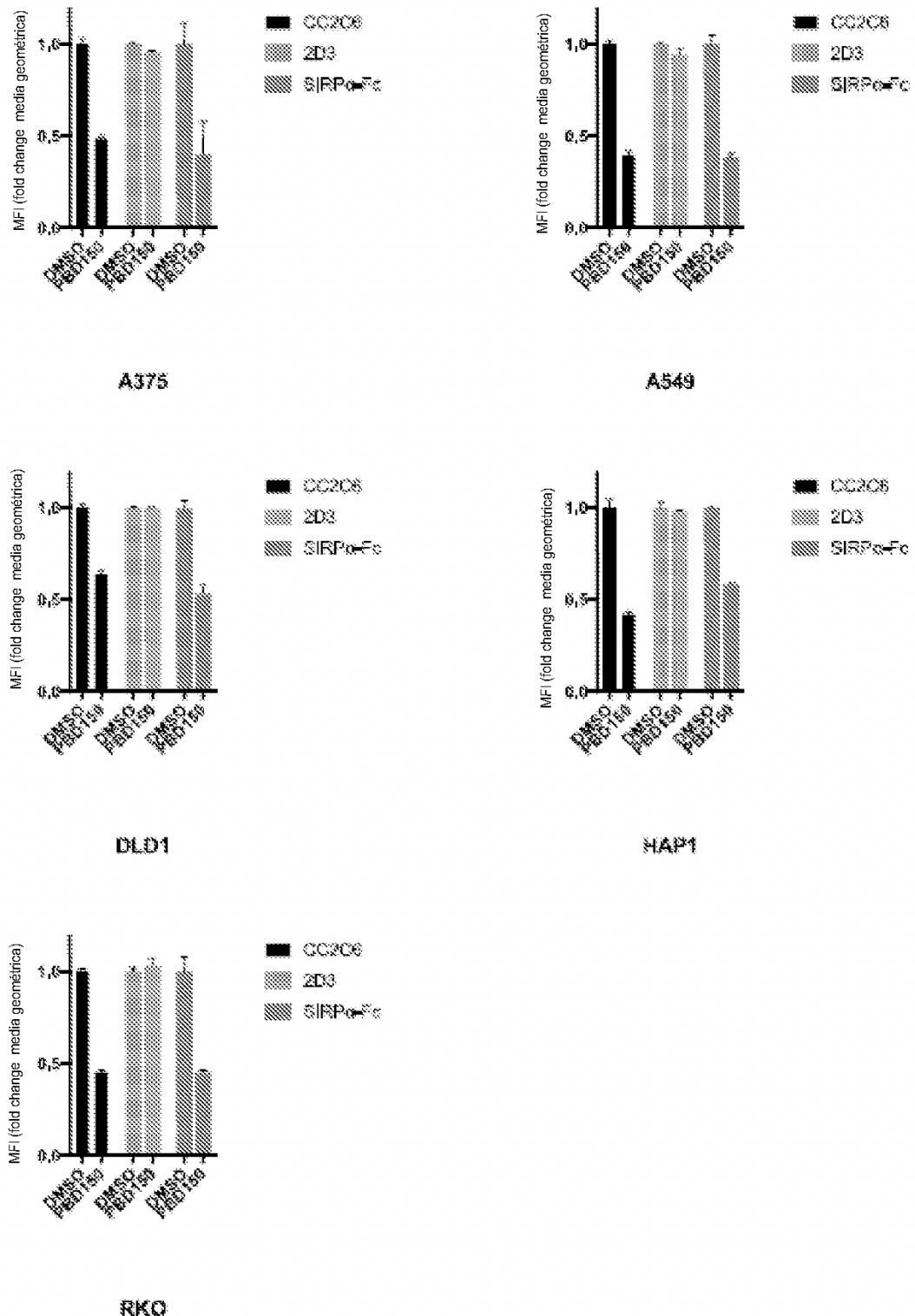
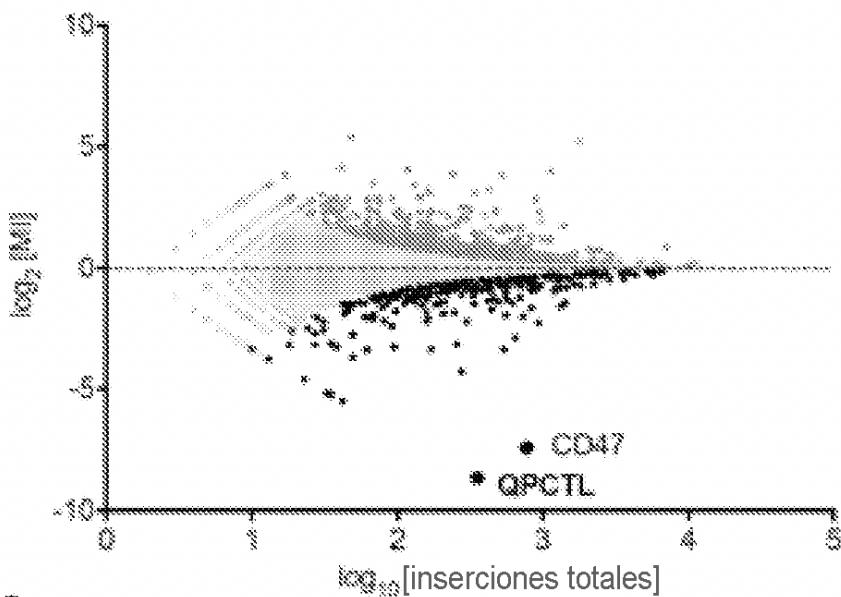


Fig. 10 A y B

A



B

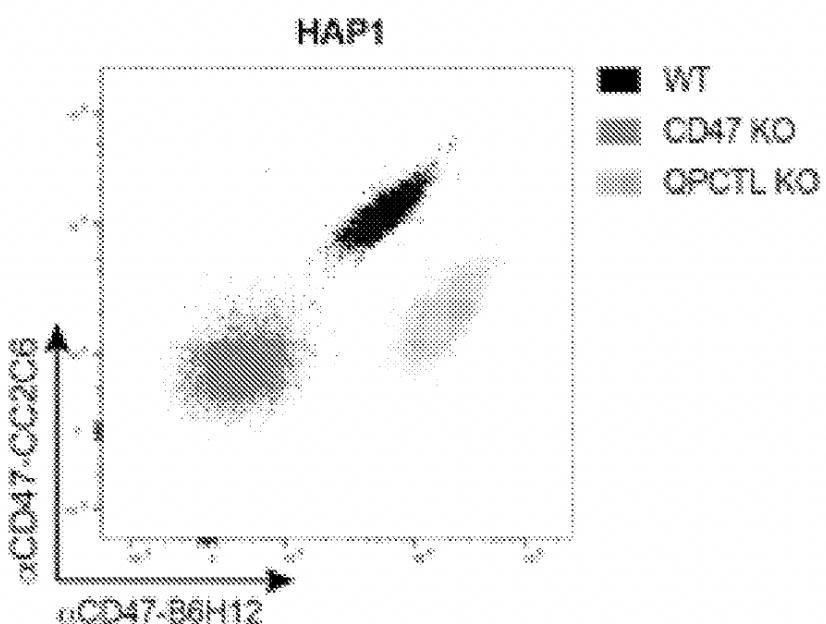
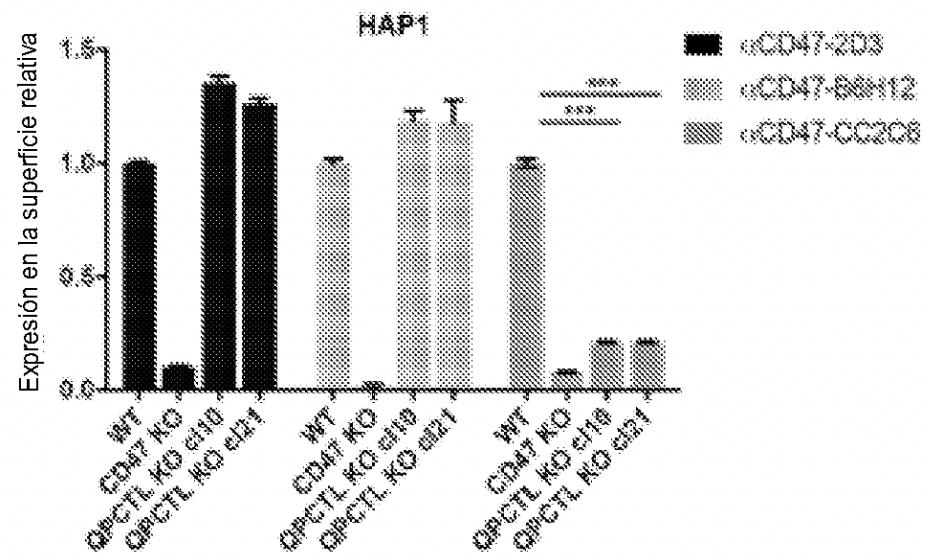


Fig. 10 C y D (cont)

C



D

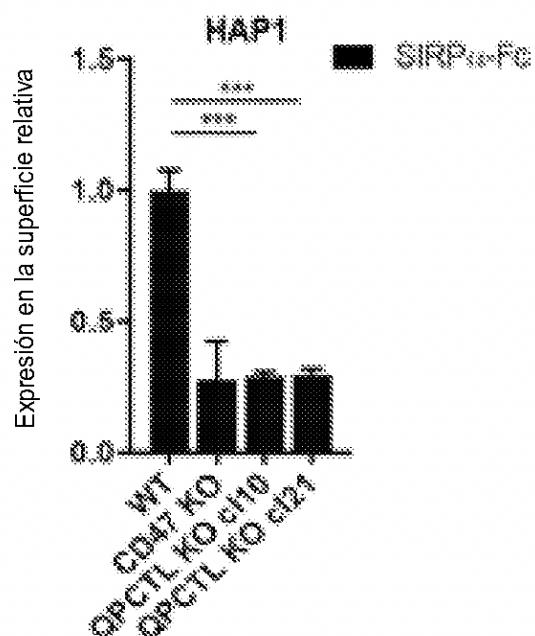


Fig. 10 E (cont)

E

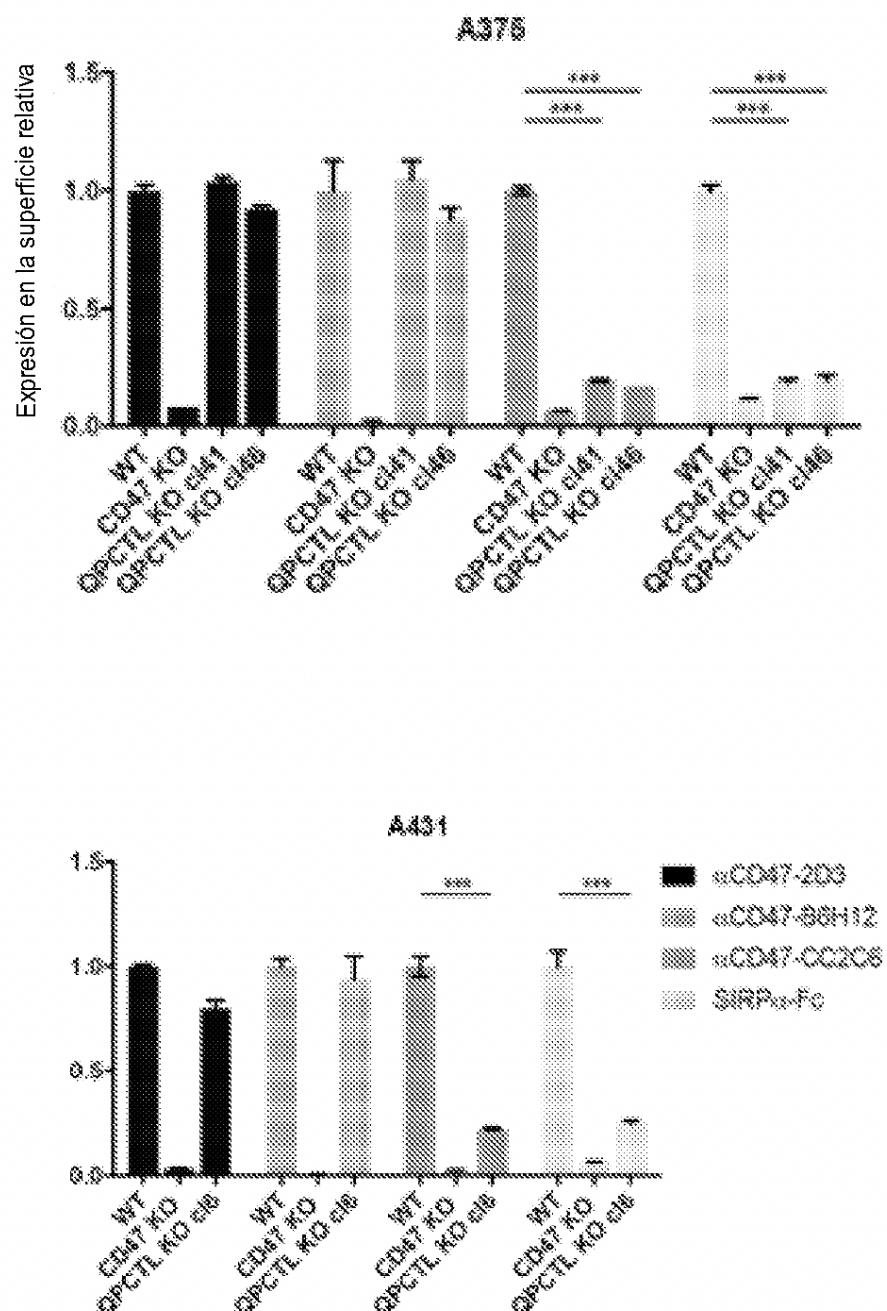


Fig. 11

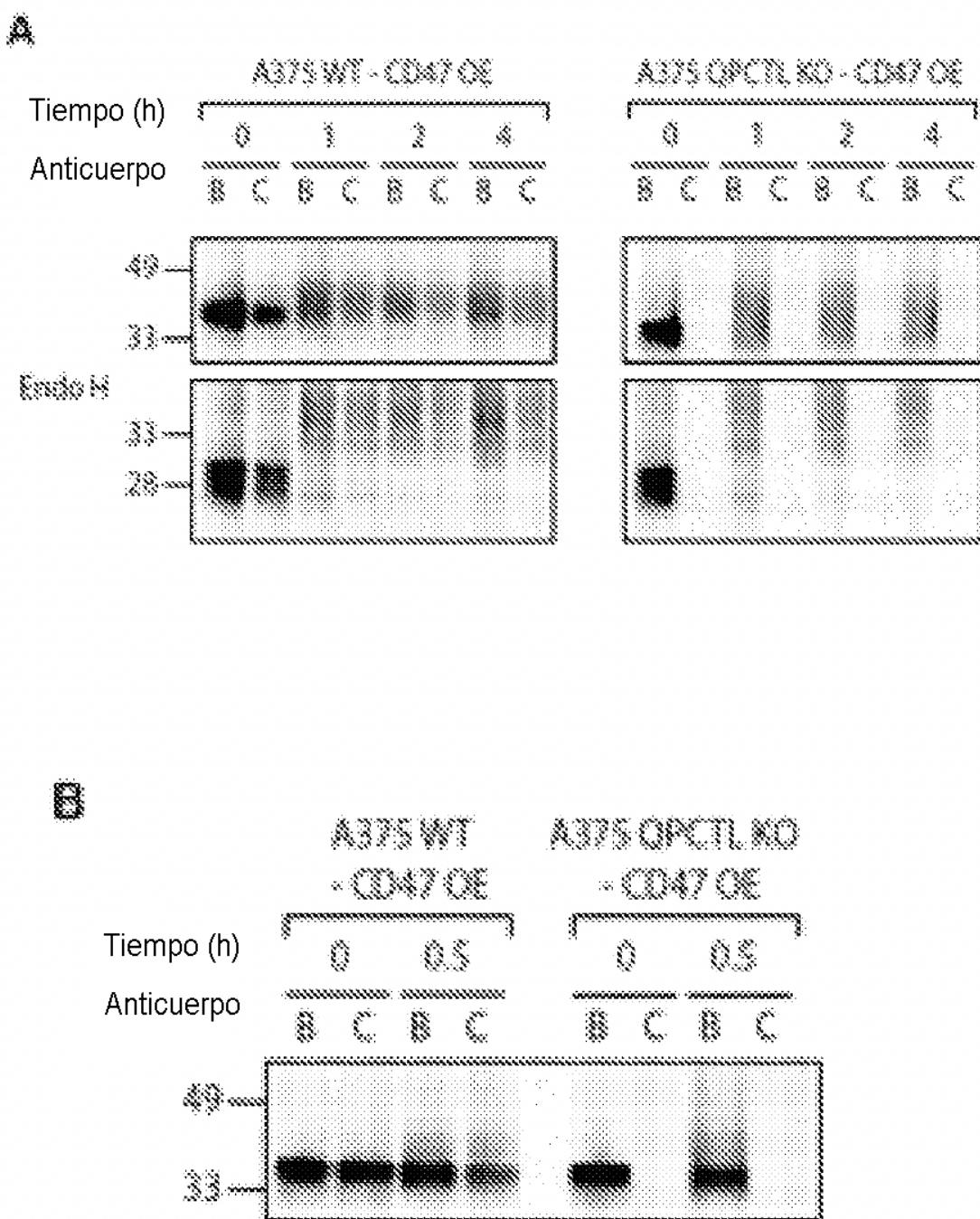


Fig. 12 A

A

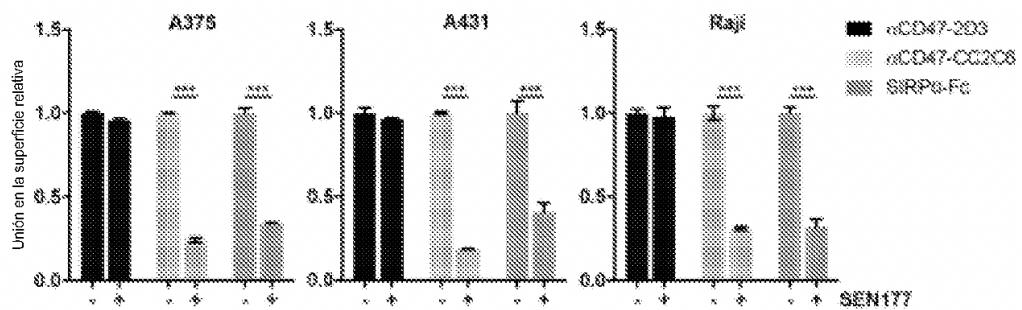


Fig. 12 B, C y D (cont)

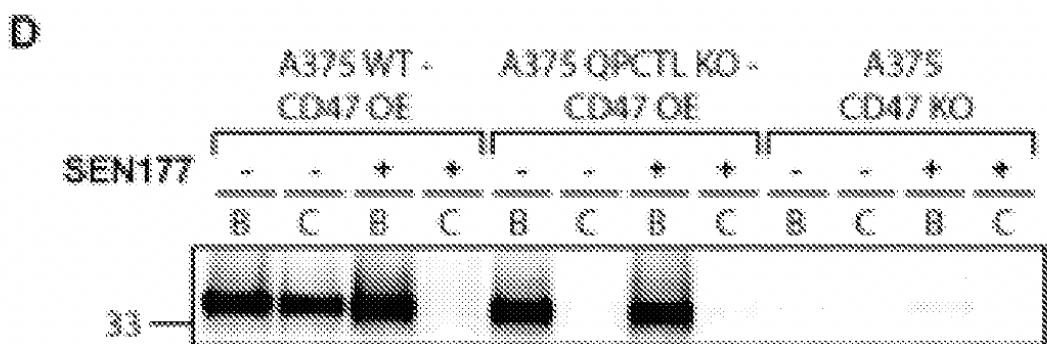
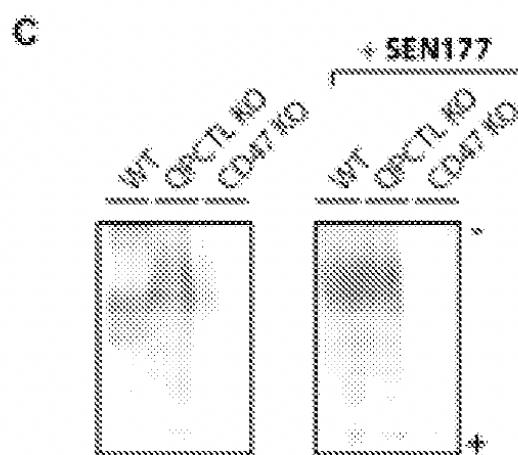
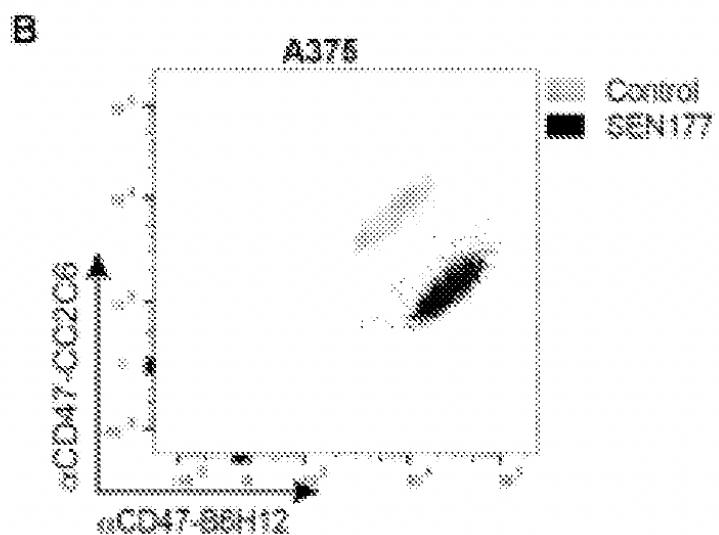
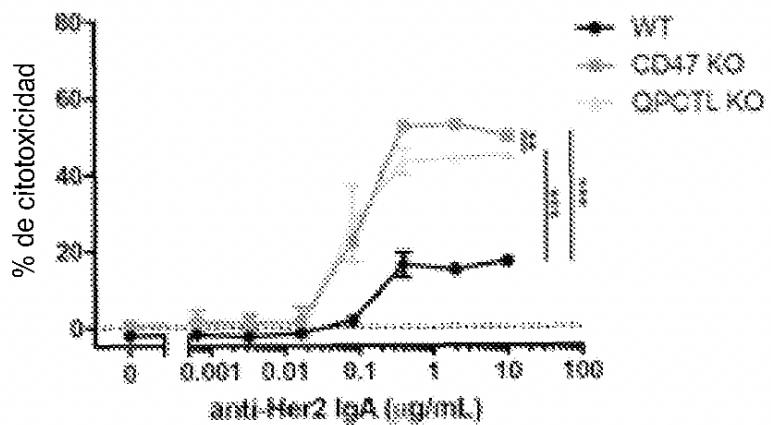


Fig. 13 A y B

A



B

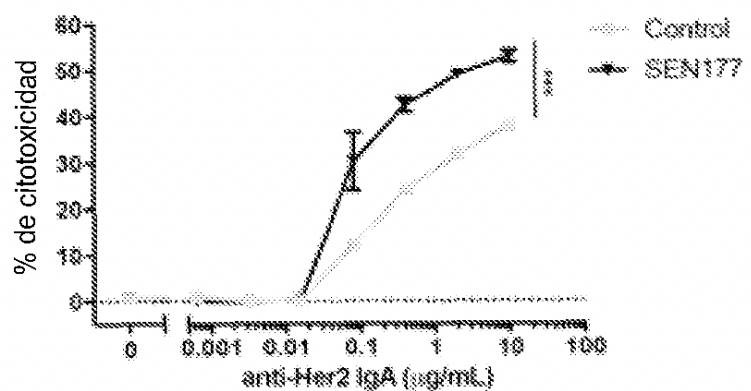


Fig. 13 C y D (cont)

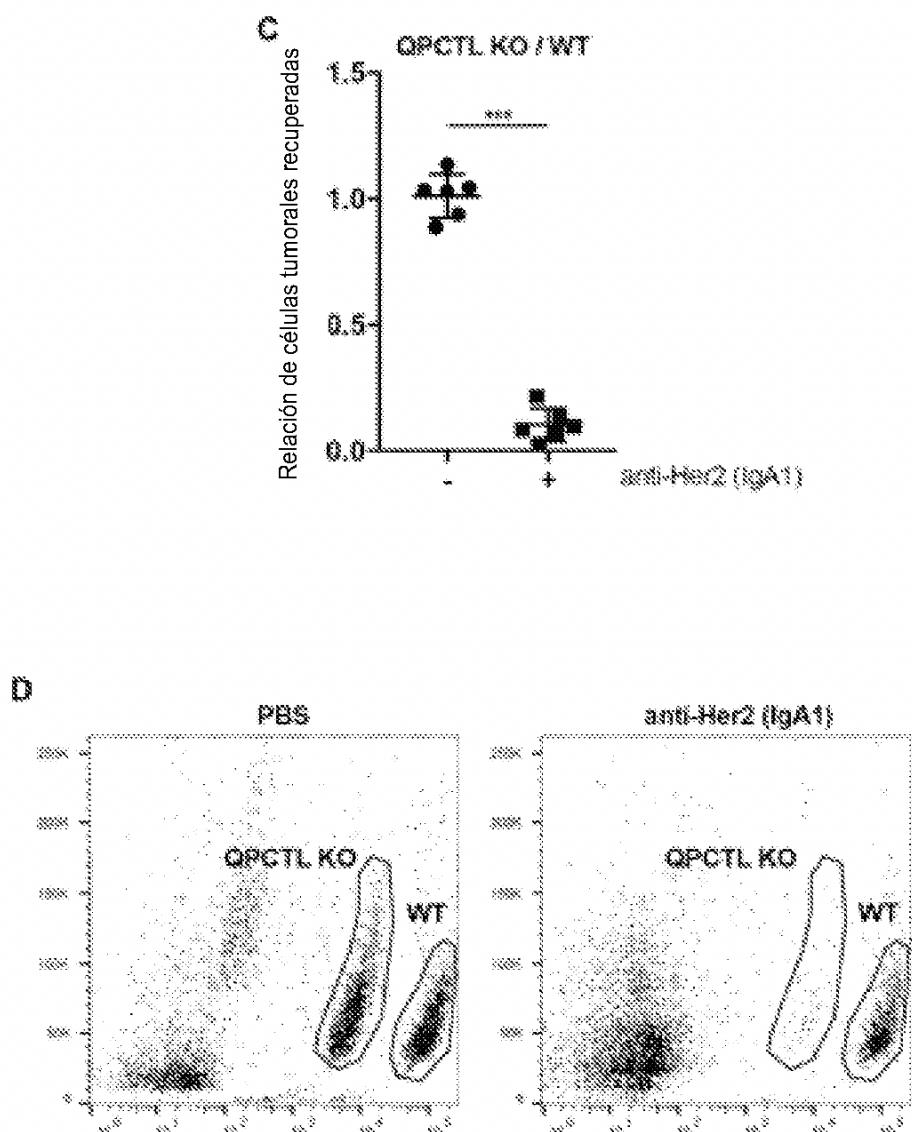


Fig. 13 E (cont)

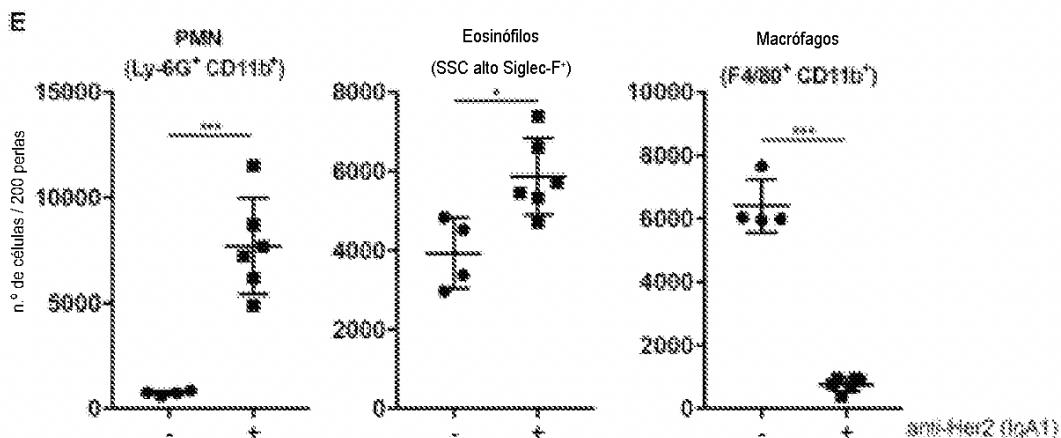


Fig. 14 A

A

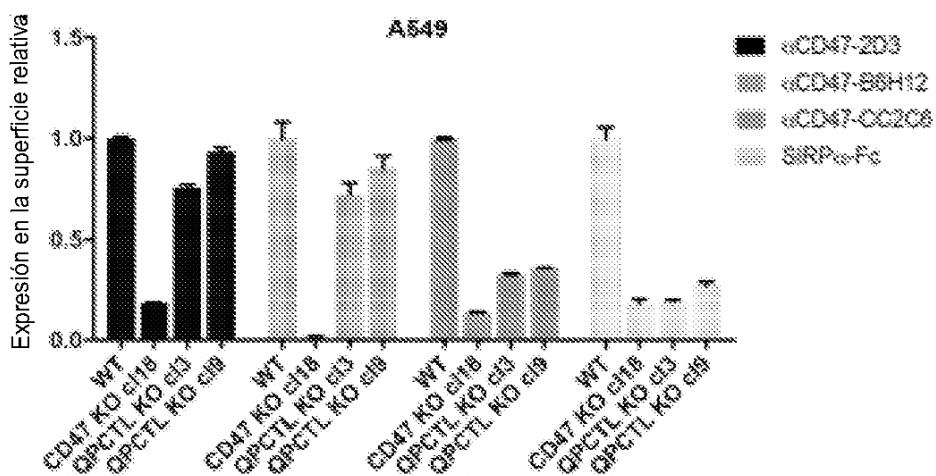


Fig 14 B (cont)

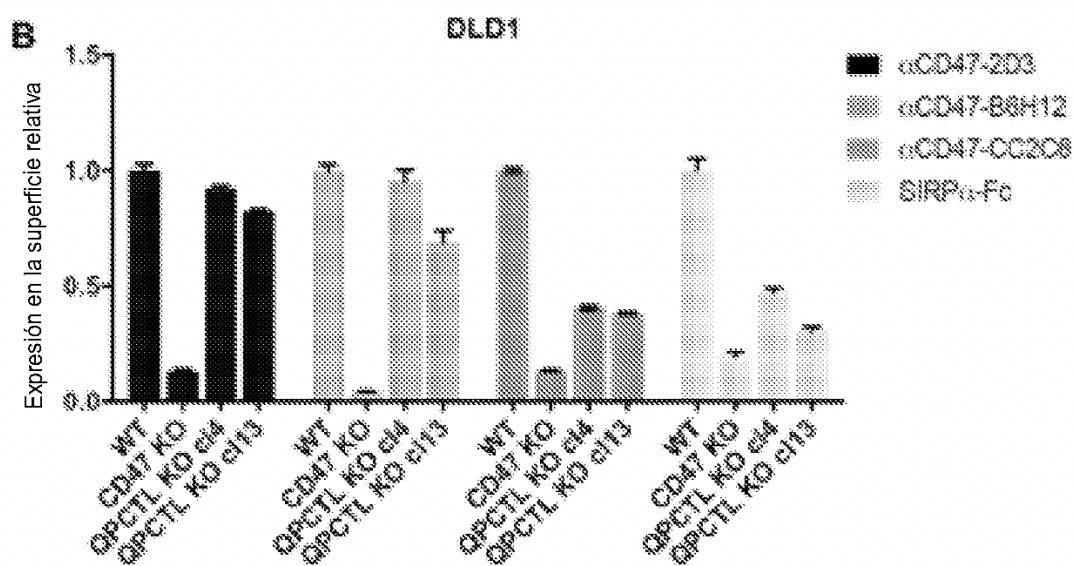


Fig. 14 C (cont)

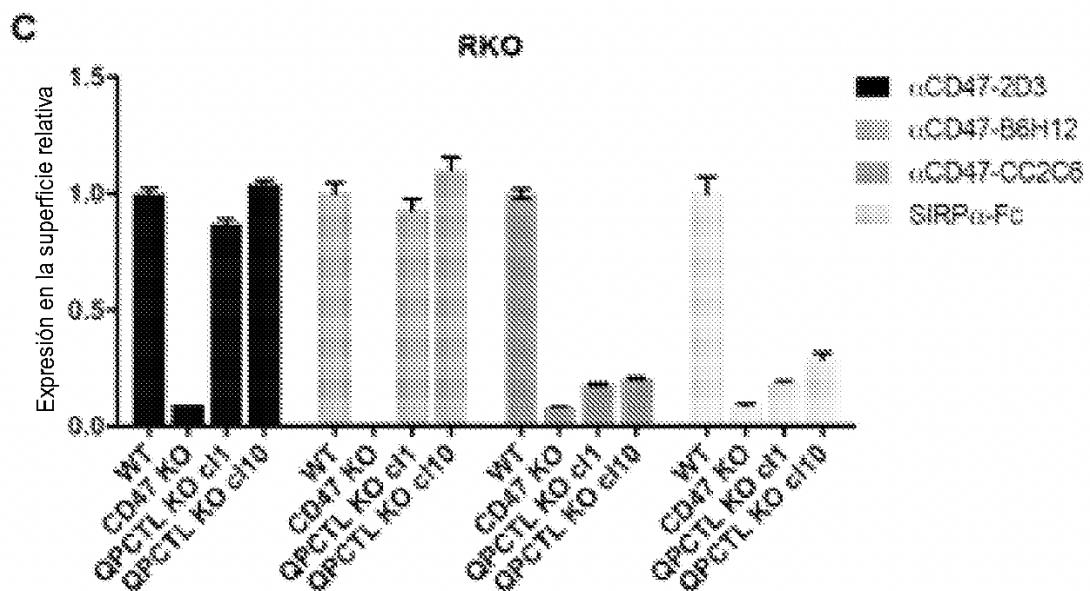


Fig. 15 A y B

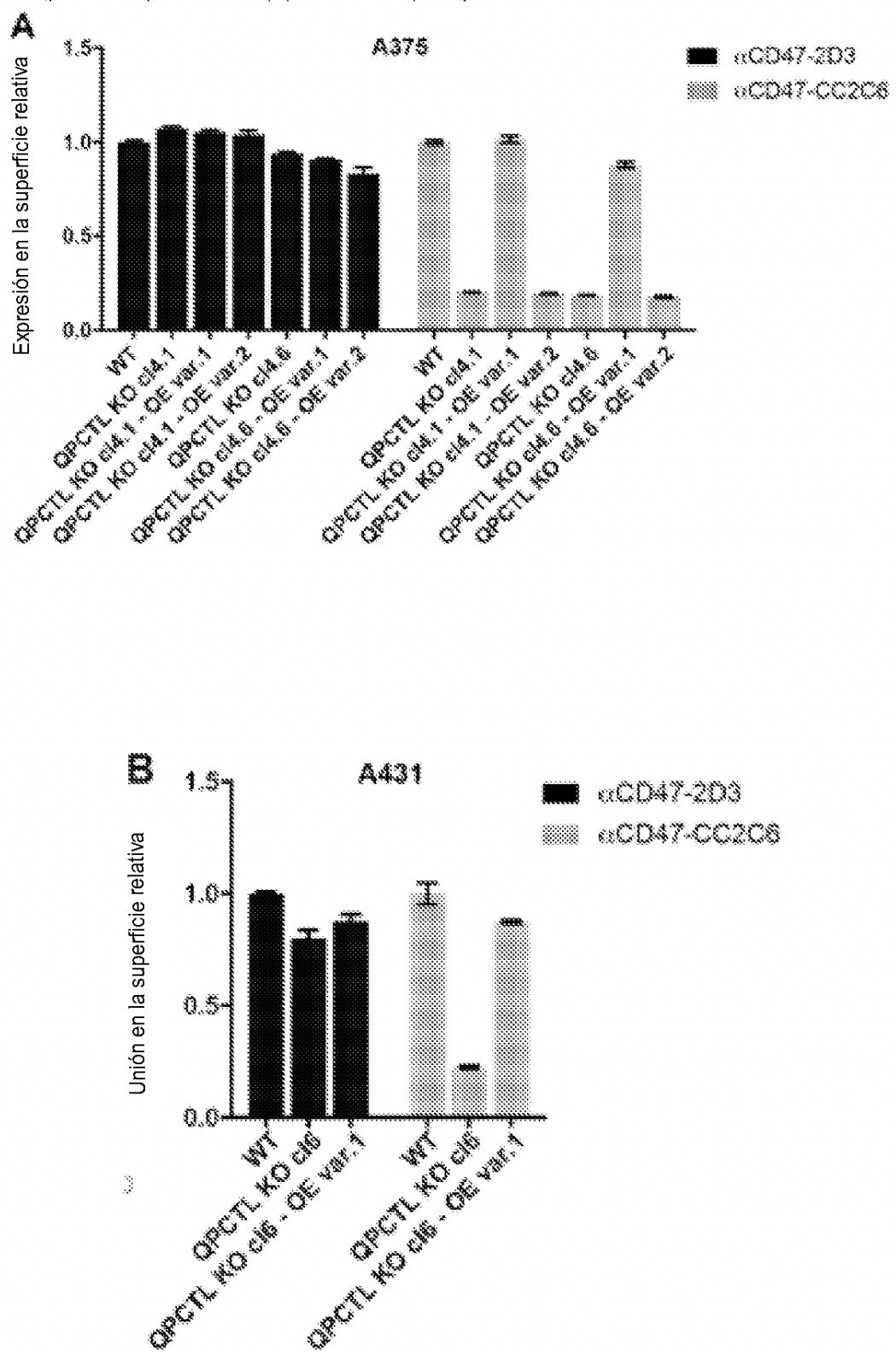
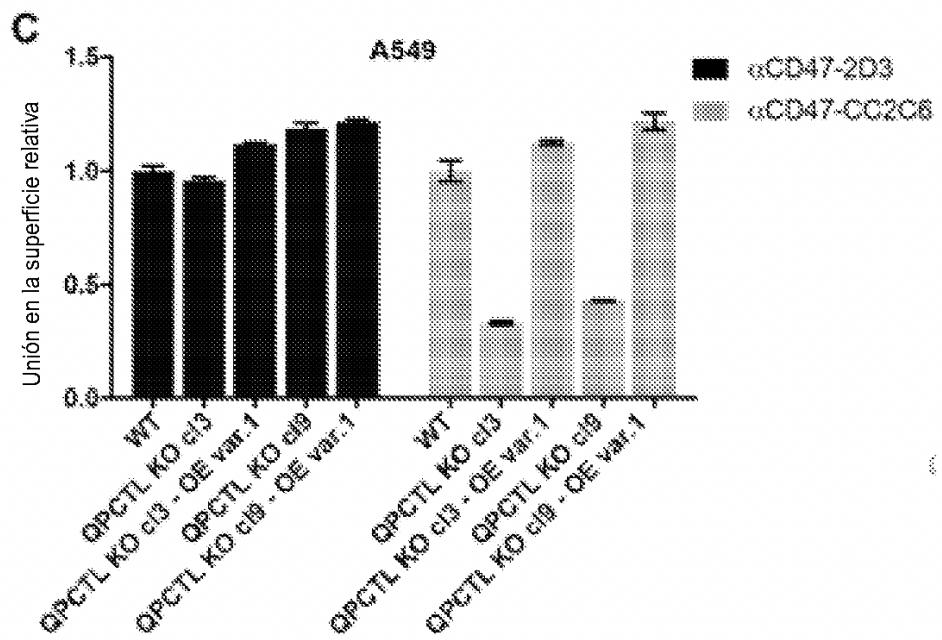


Fig. 15 C y D (cont)



en

D

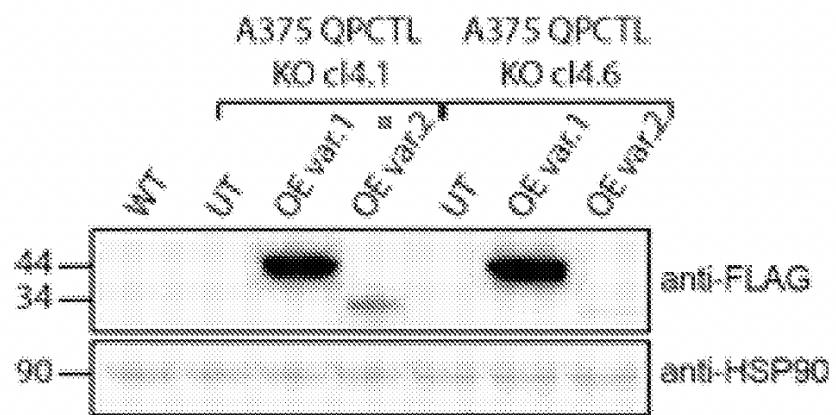


Fig. 15 E y F (cont)

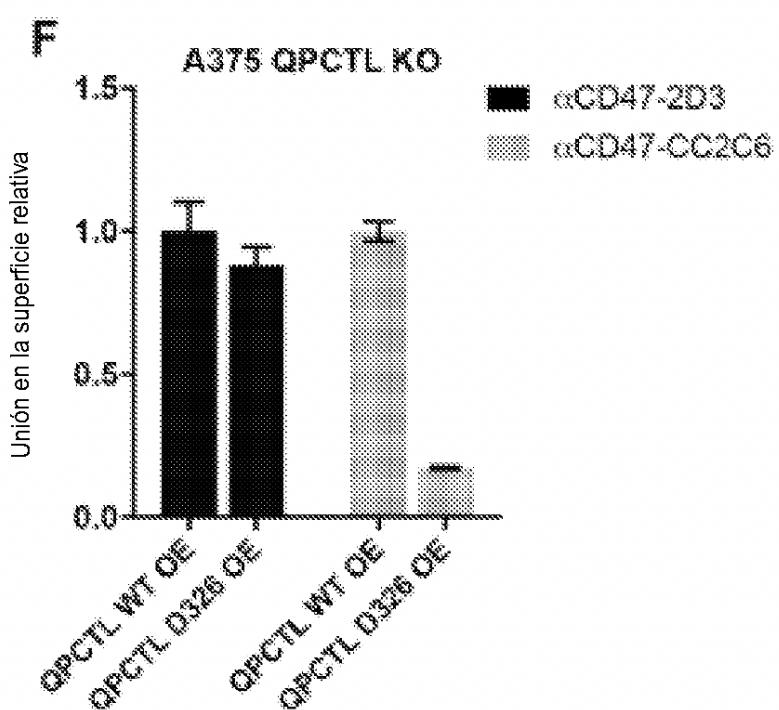
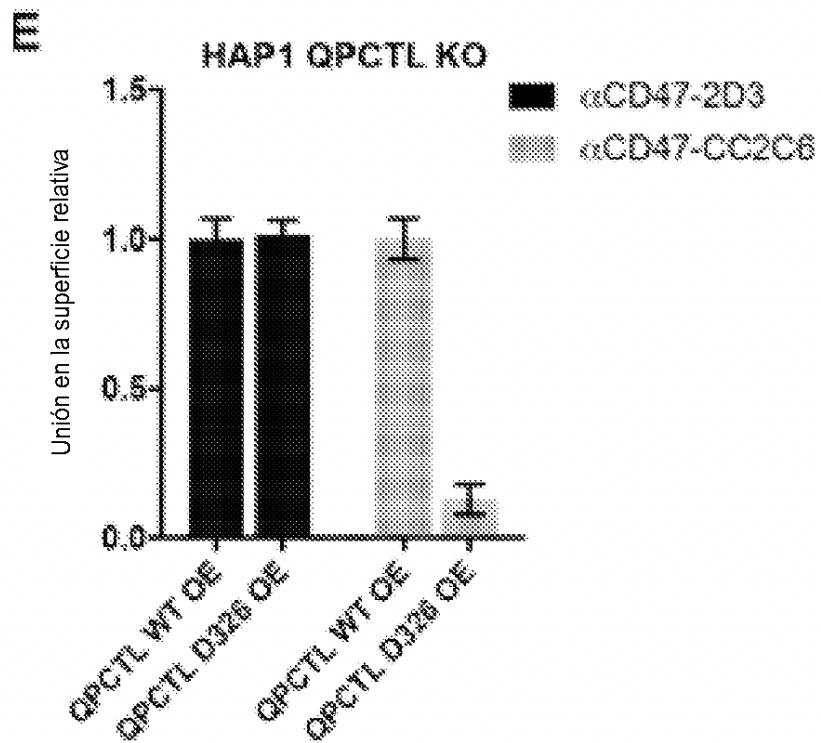


Fig. 16 A y B

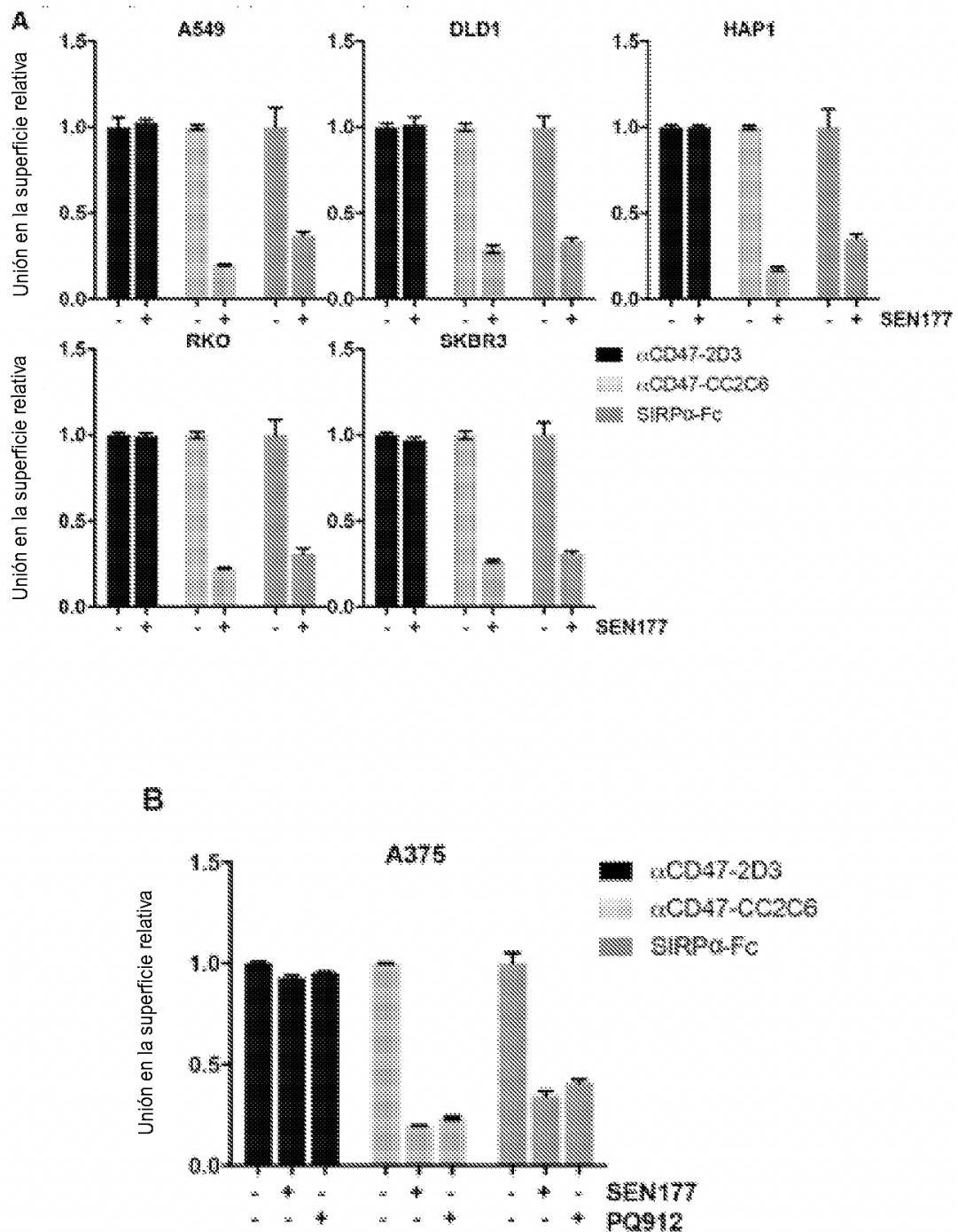
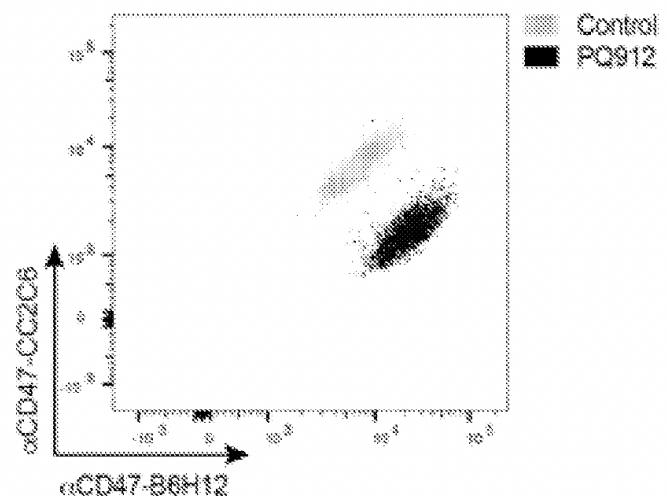


Fig 16 C. y D (cont)

C



D

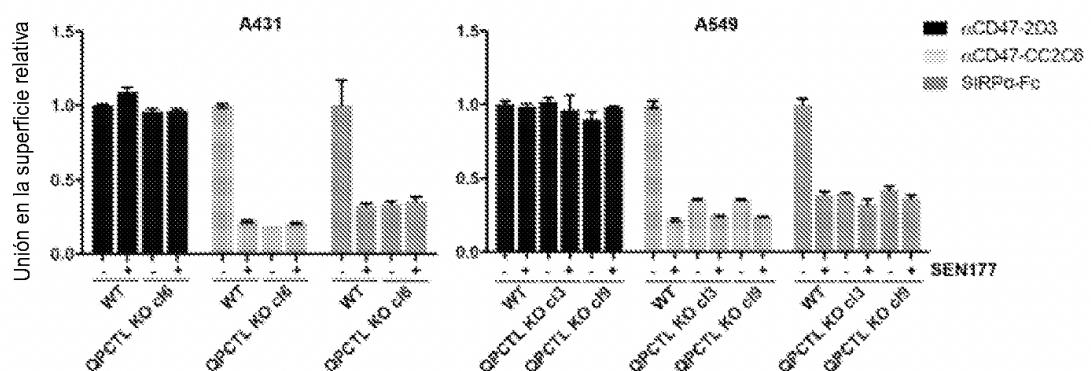
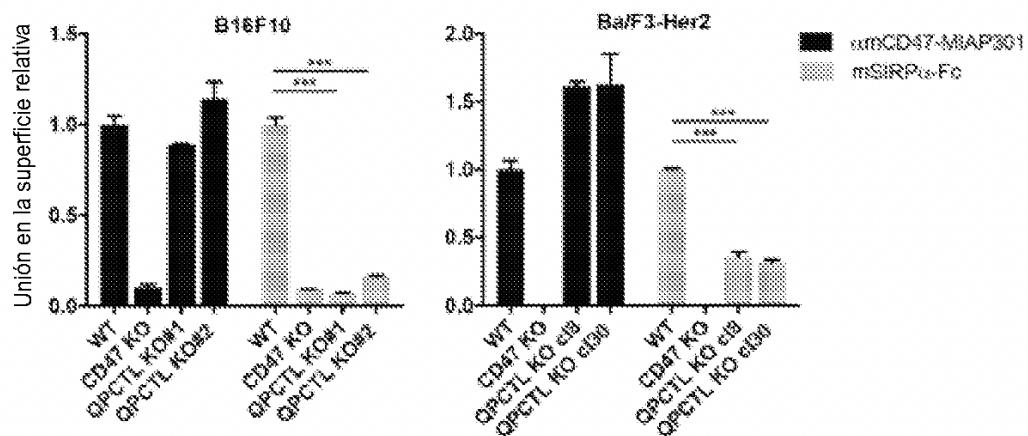


Fig. 17 A y B

A



B

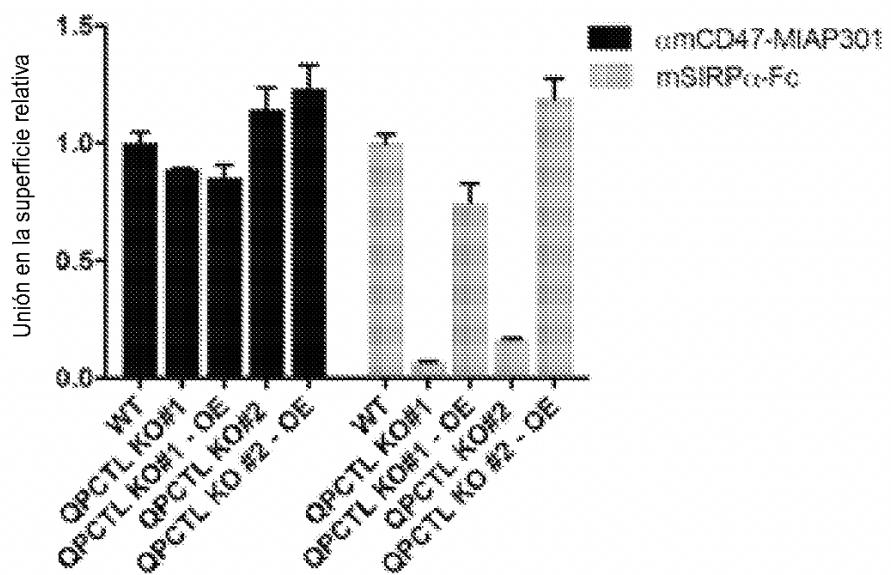


Fig. 17 C y D (cont)

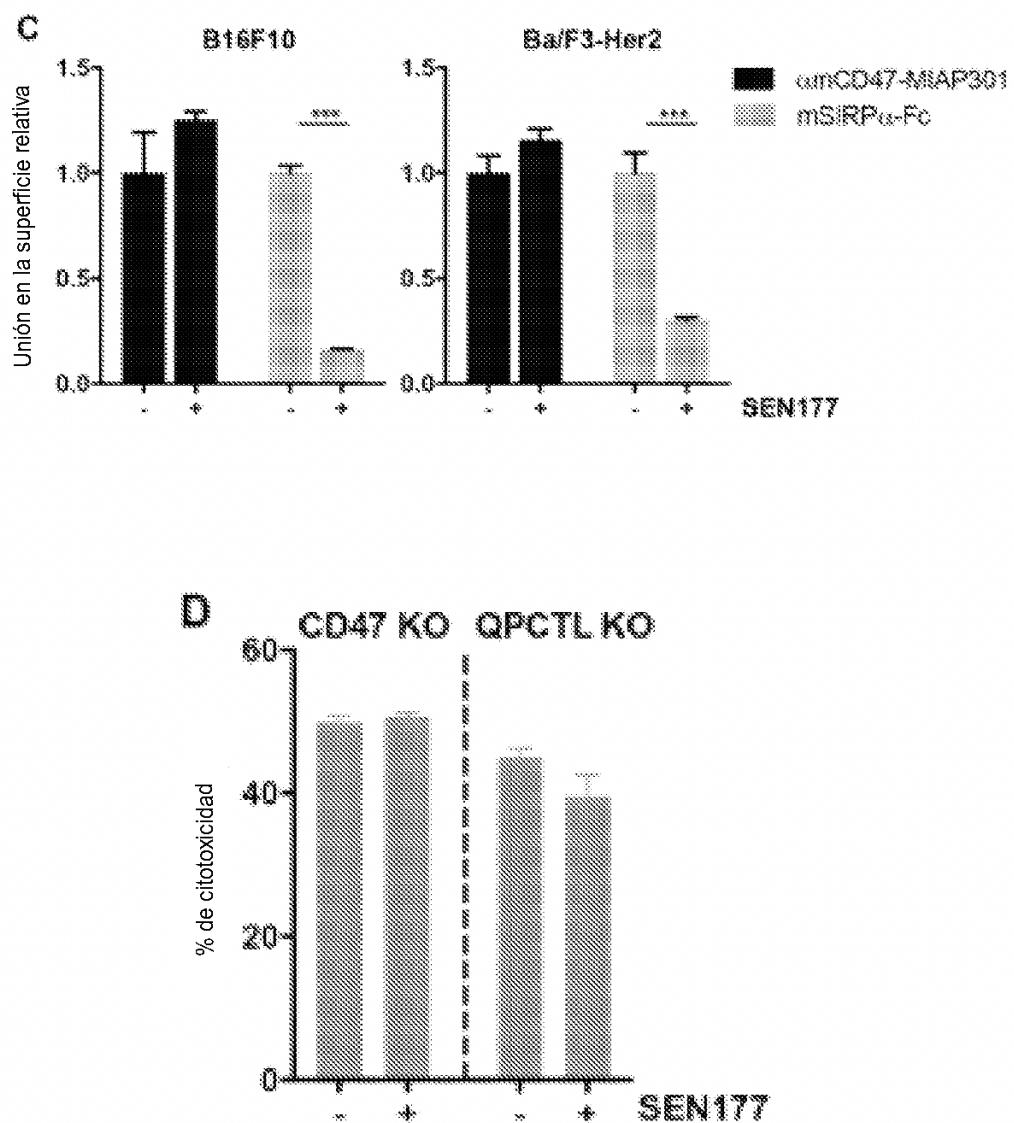


Fig. 17 E y F (cont)

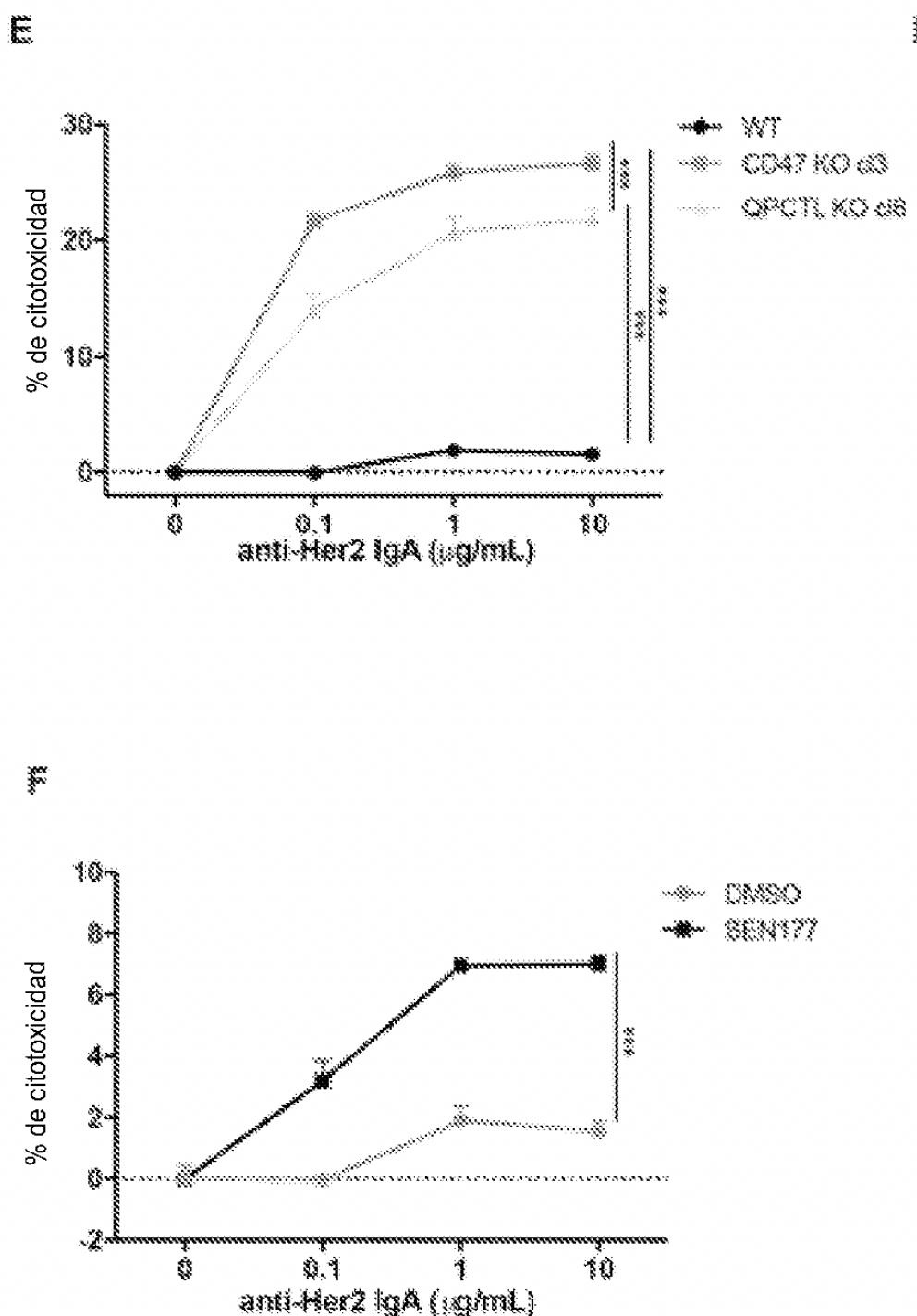
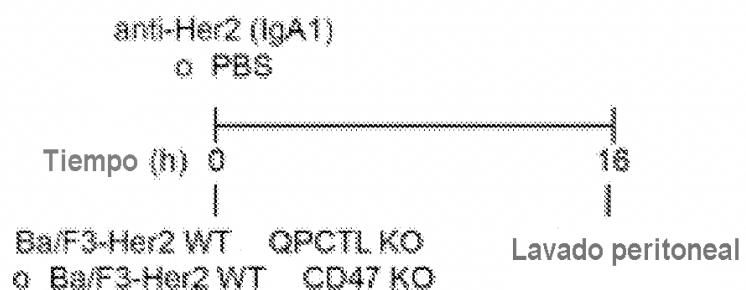


Fig. 18 A y B

A



B

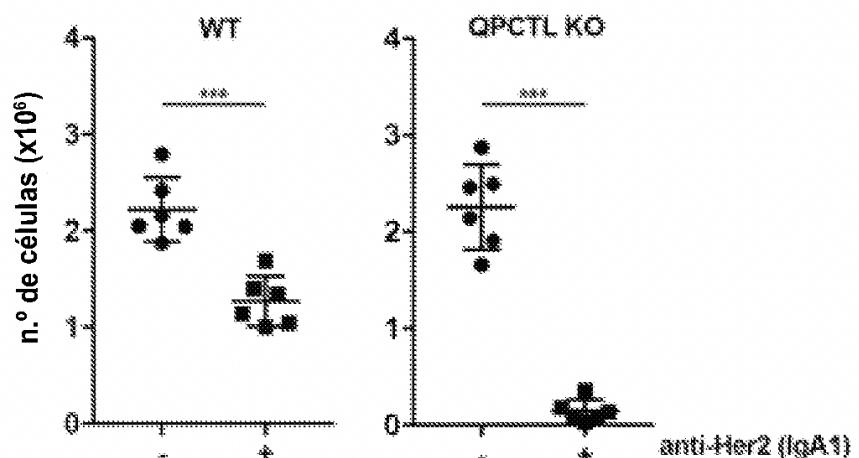
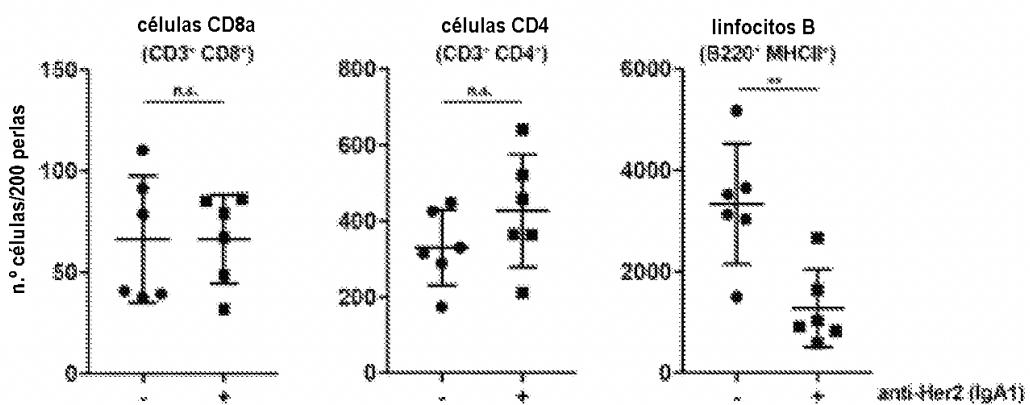


Fig. 18 C y D (cont)

C



D

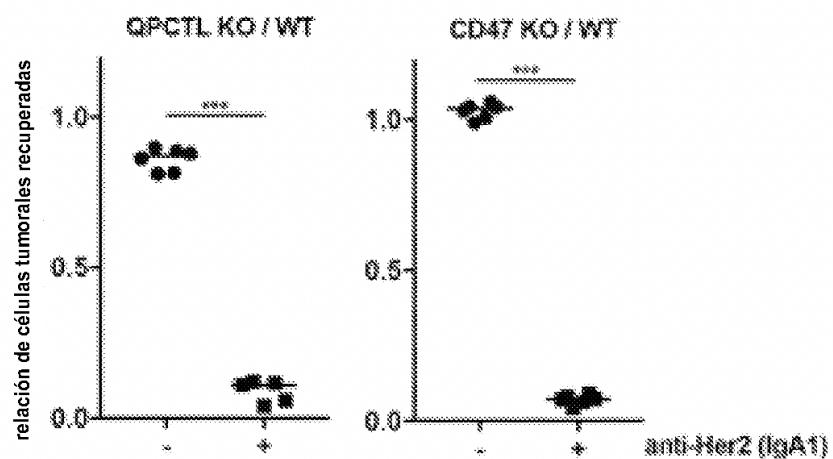
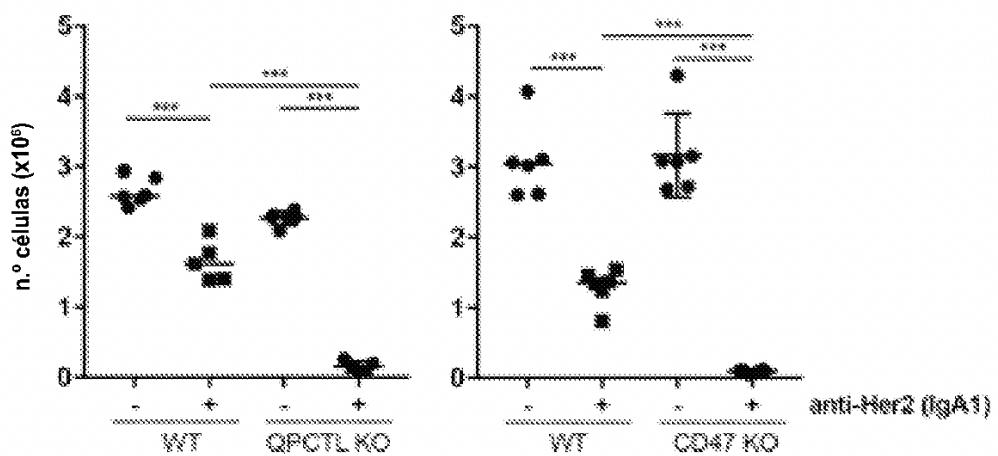


Fig. 18 E y F (cont)

E



F

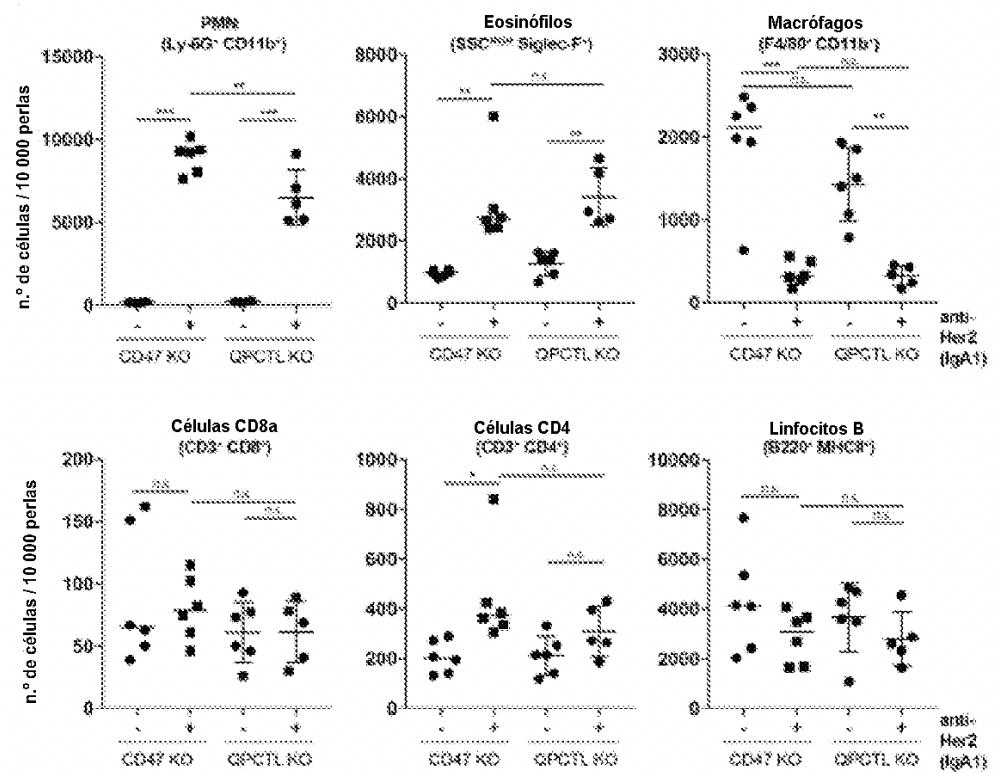


Fig. 19

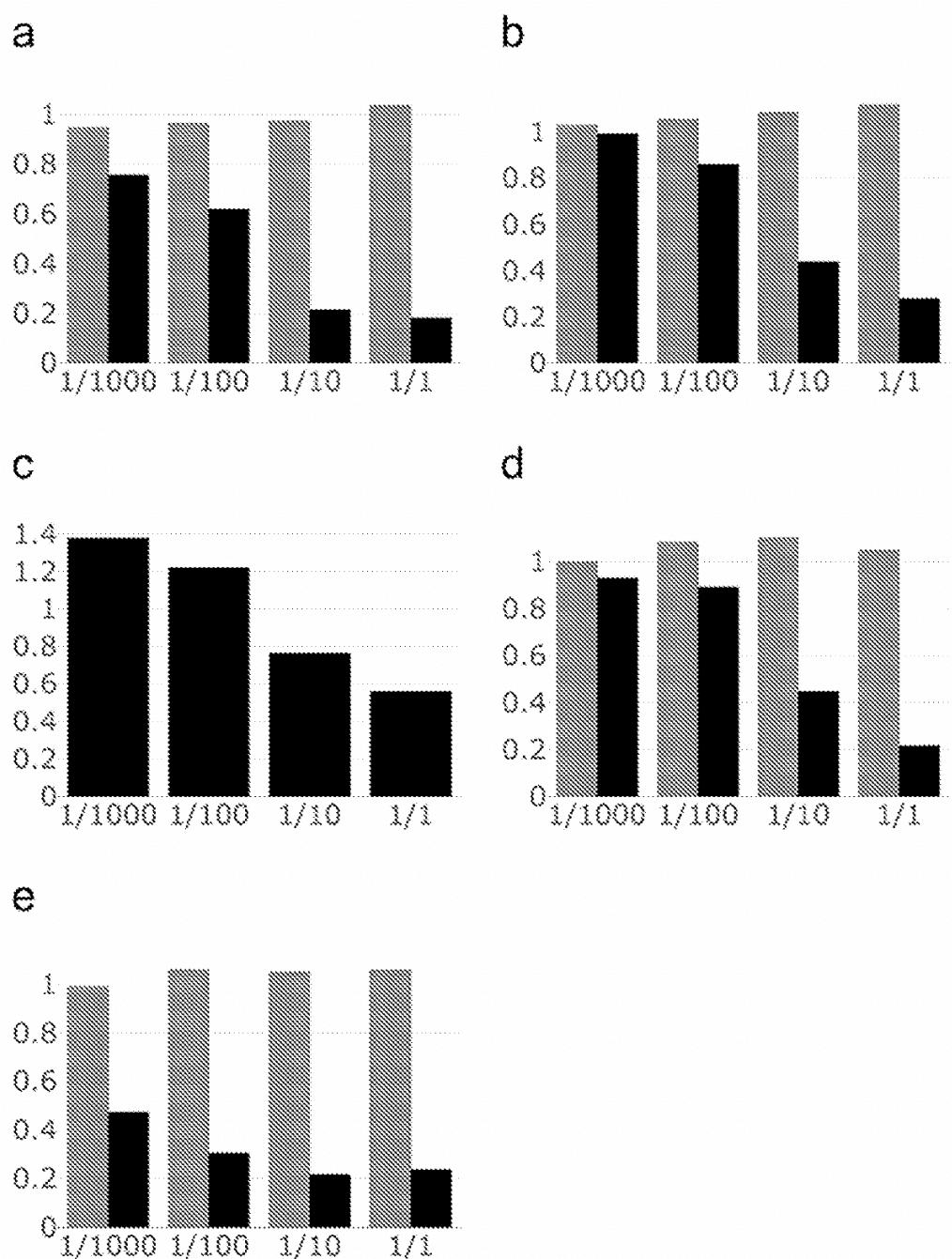


Fig. 20 a-h

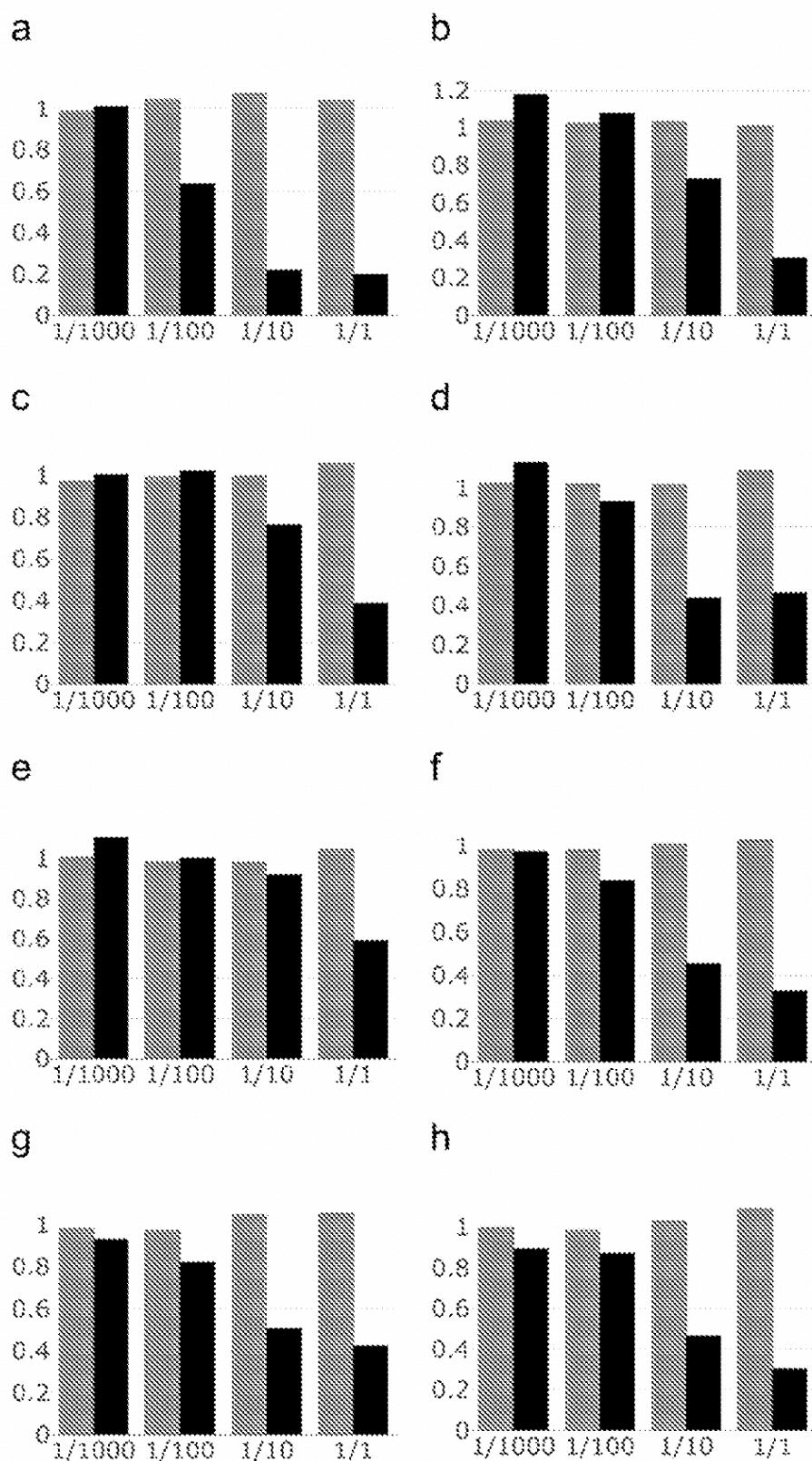


Fig. 20 i-n (cont)

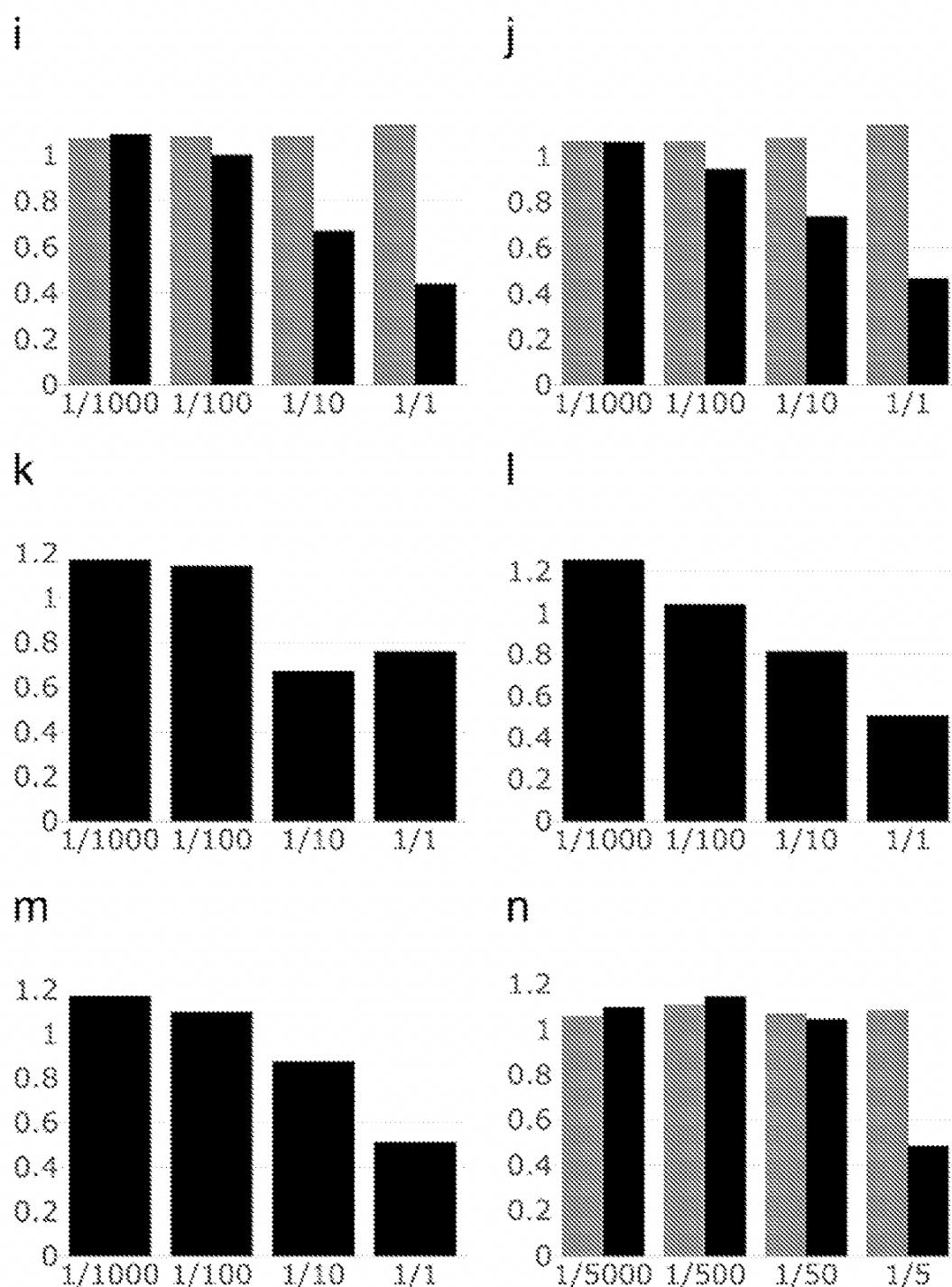


Fig. 21

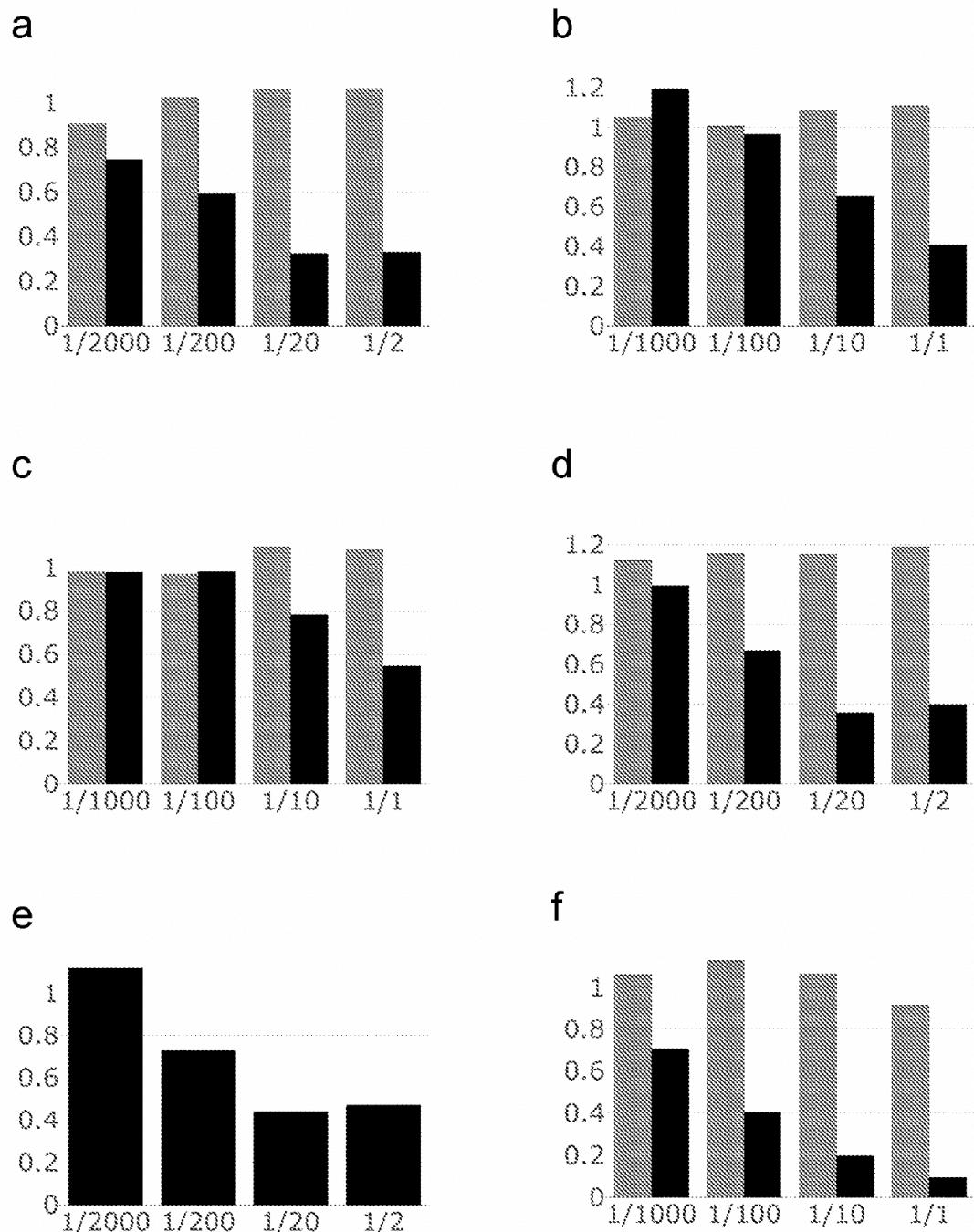


Fig. 22 a-h

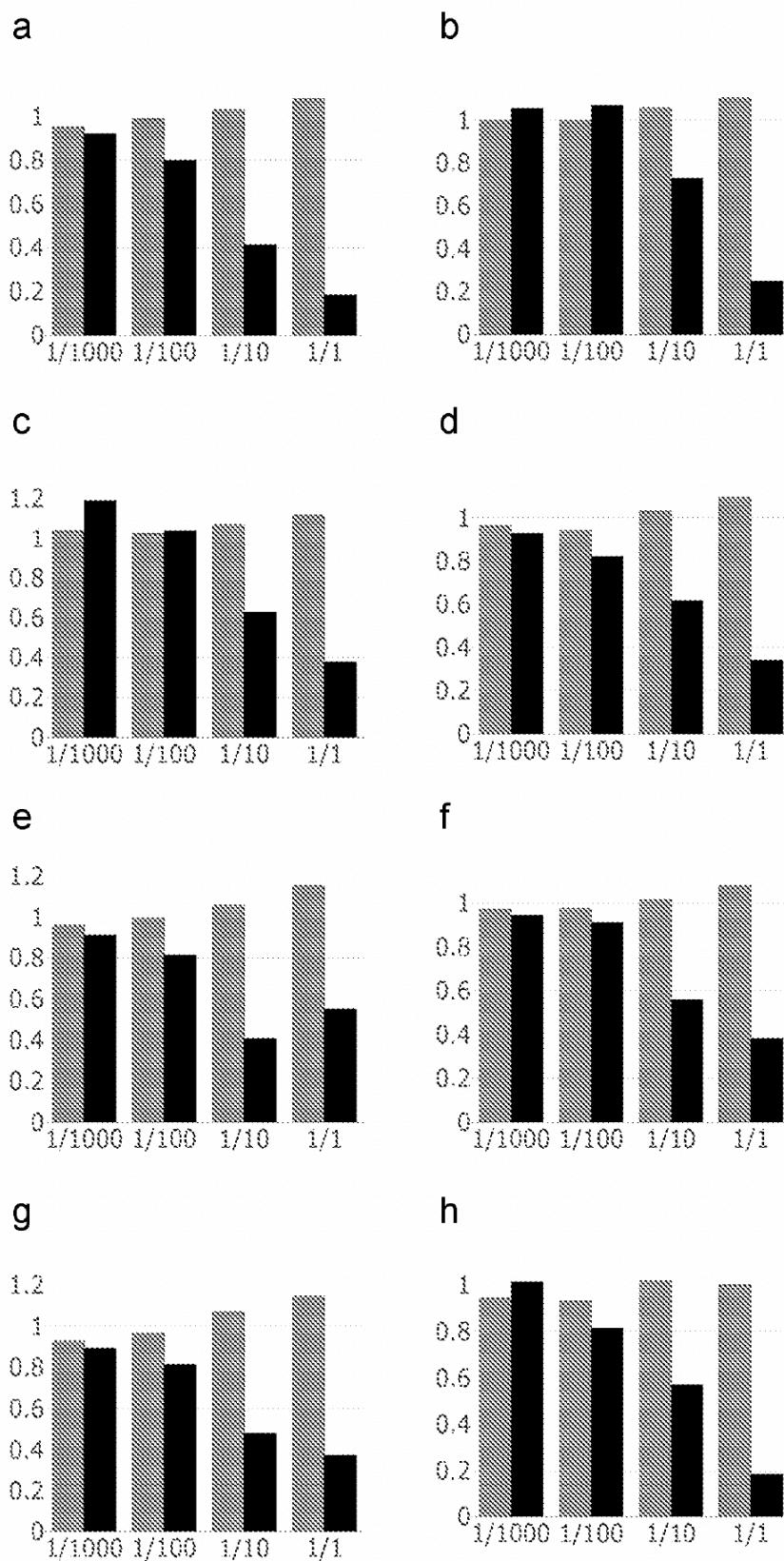


Fig. 22 i-p (cont)

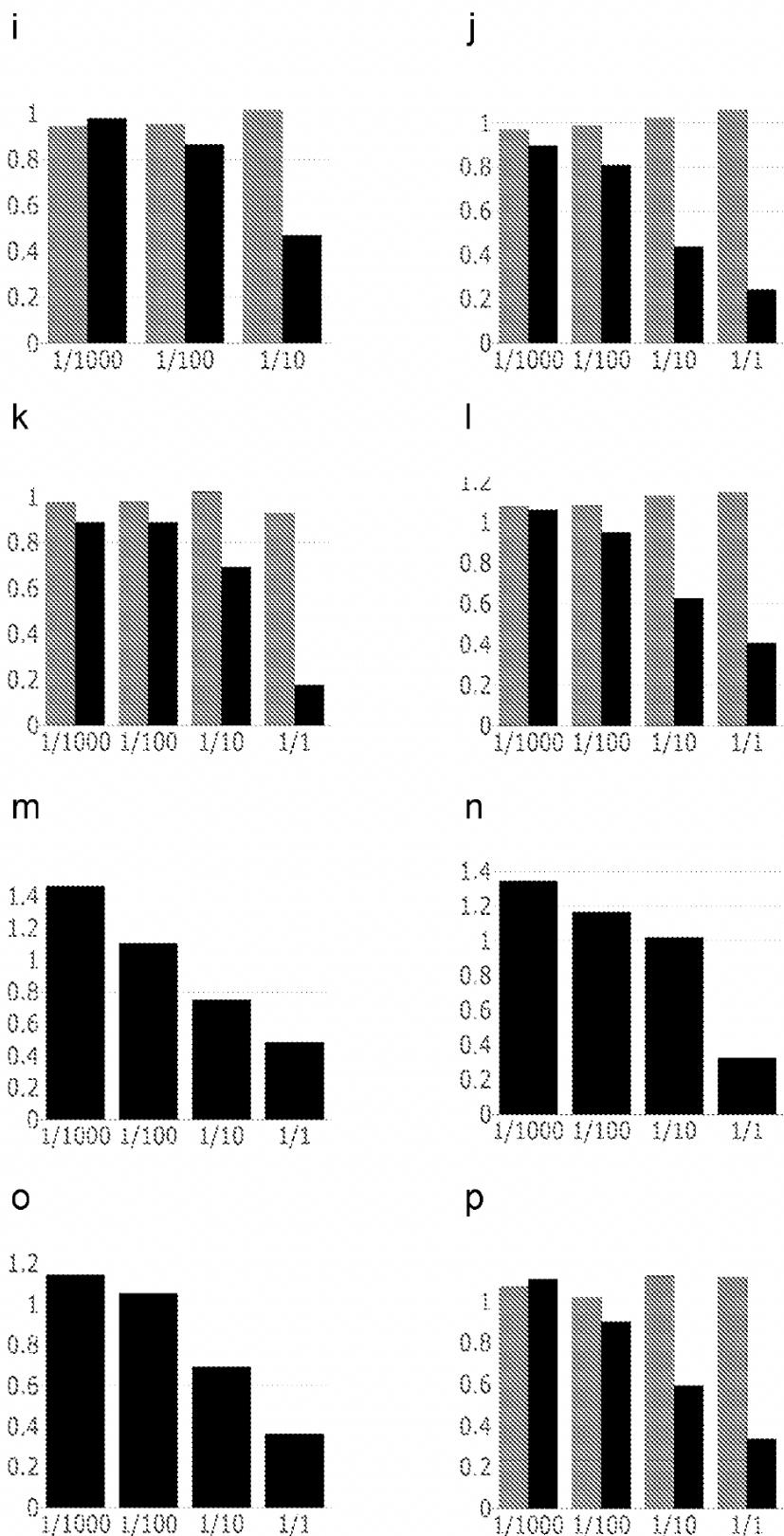


Fig. 23 a-h

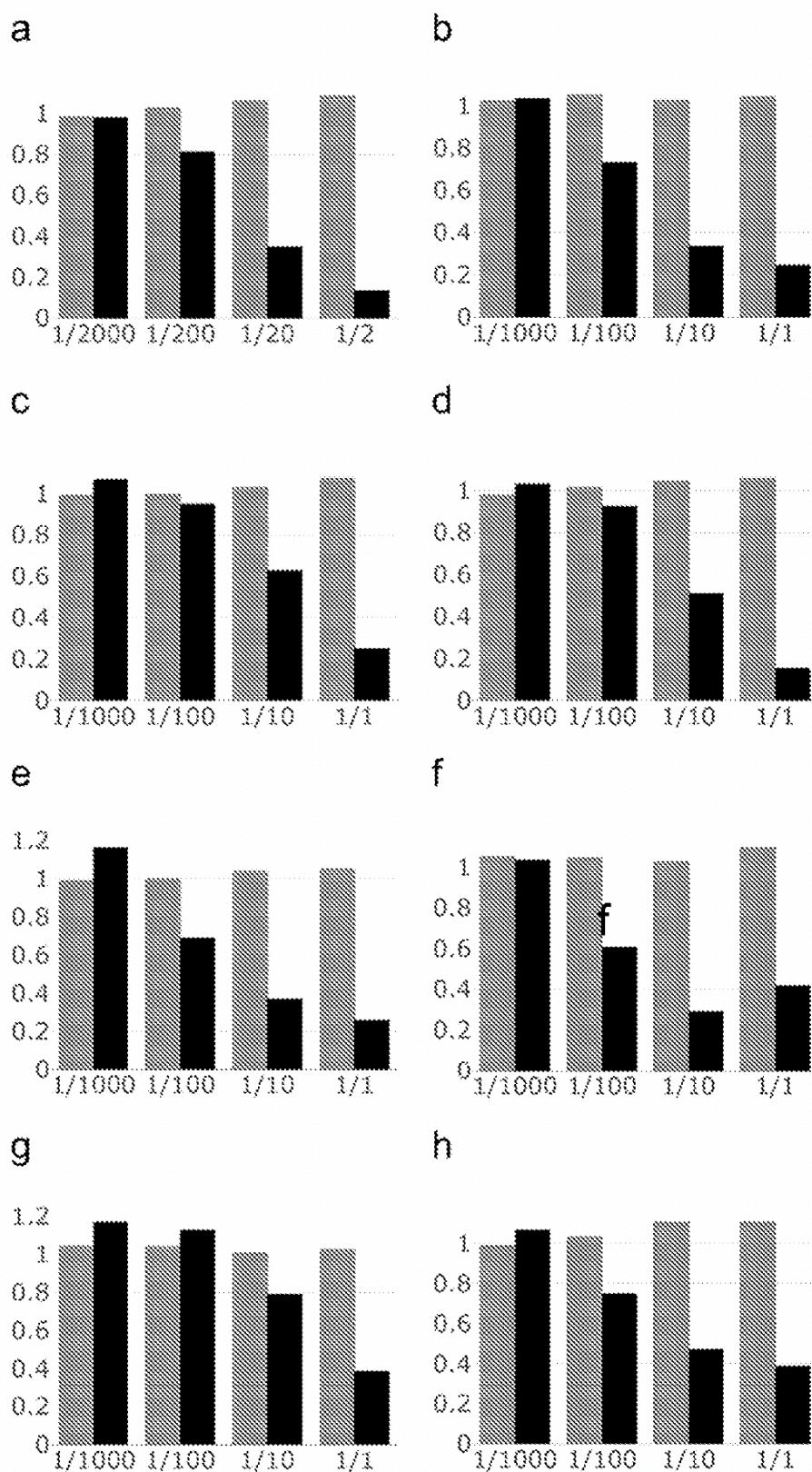


Fig. 23 i-p (cont)

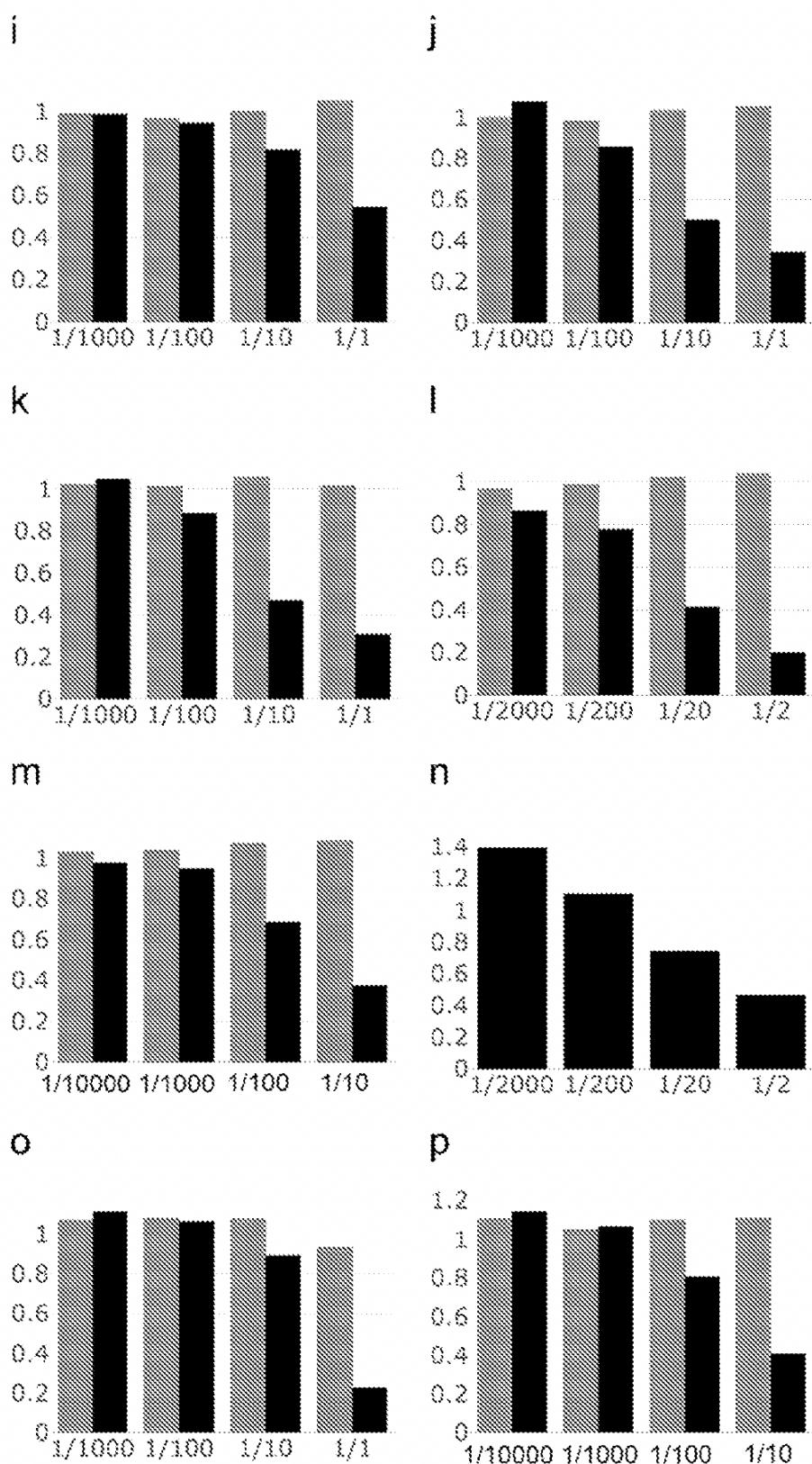


Fig. 24

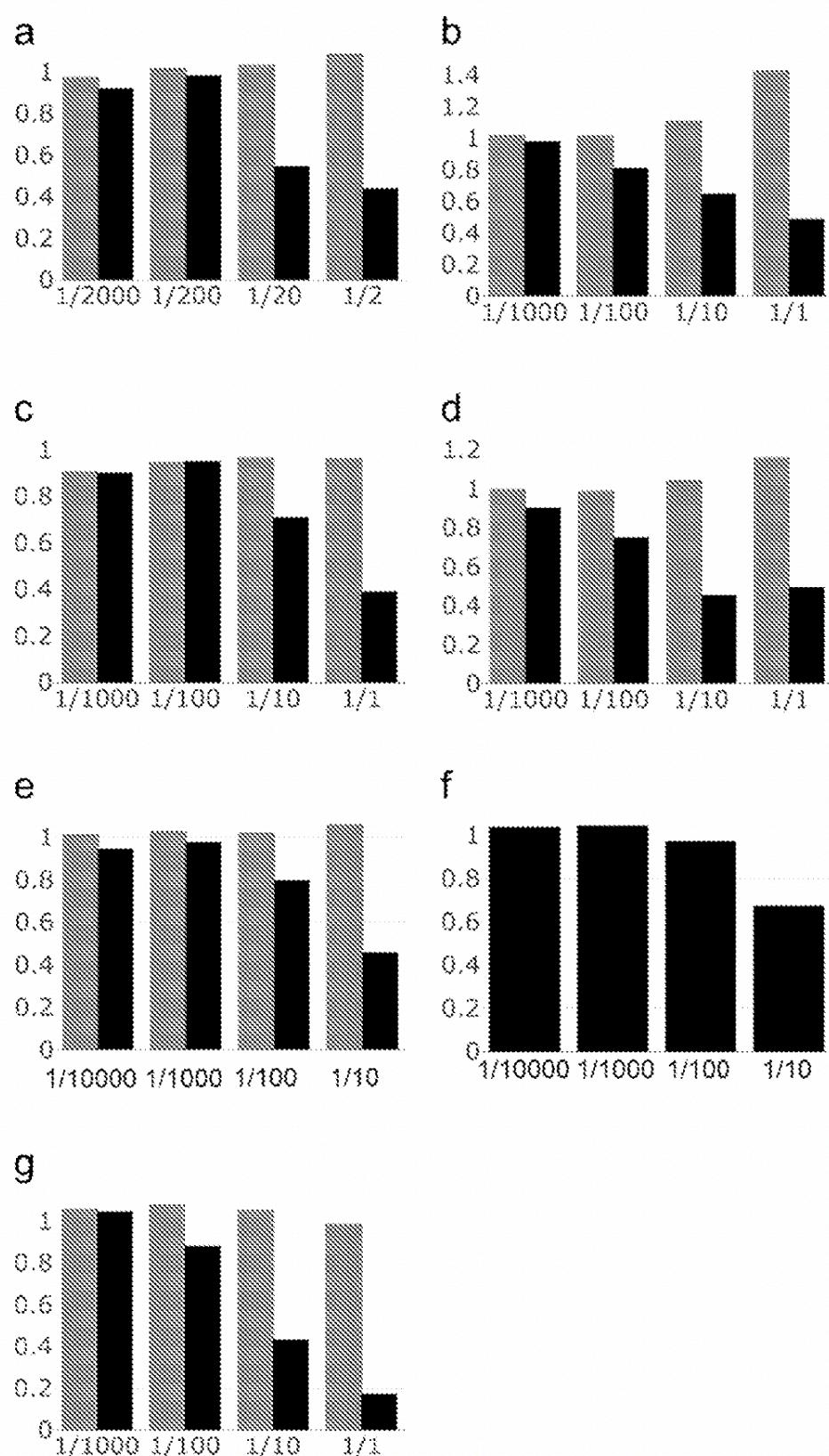


Fig. 25

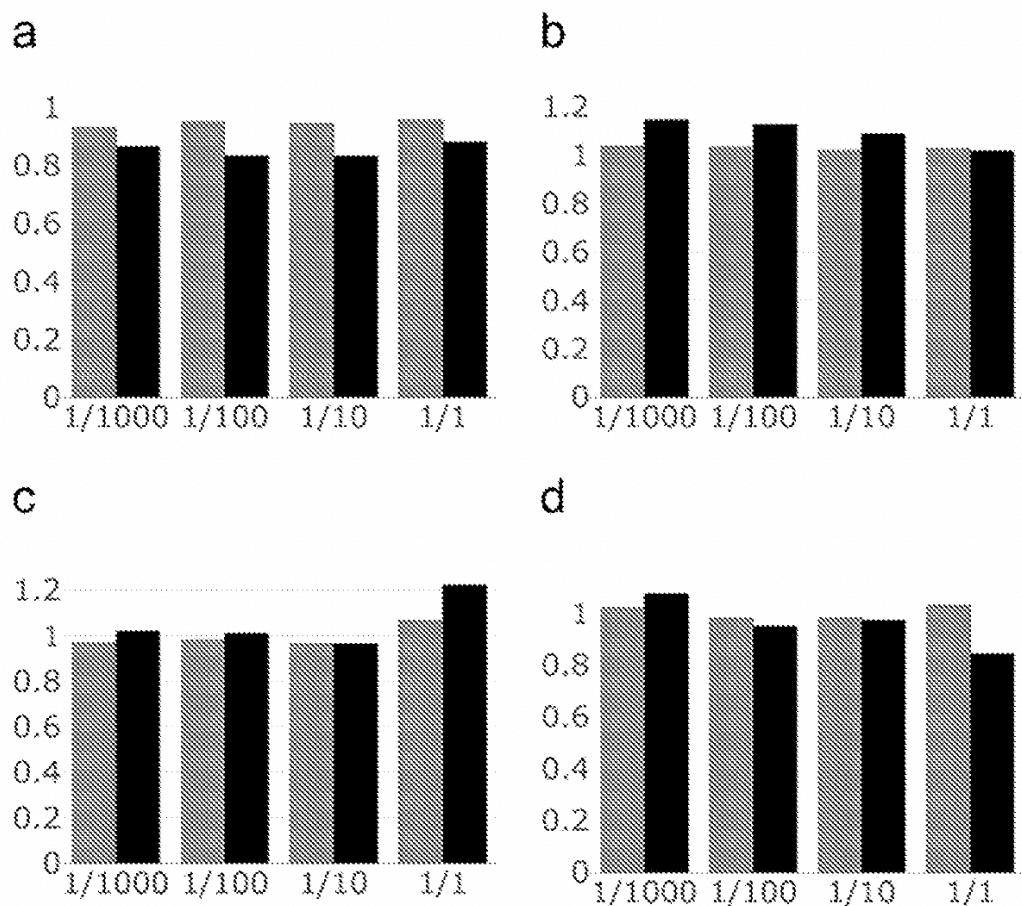


Fig. 26

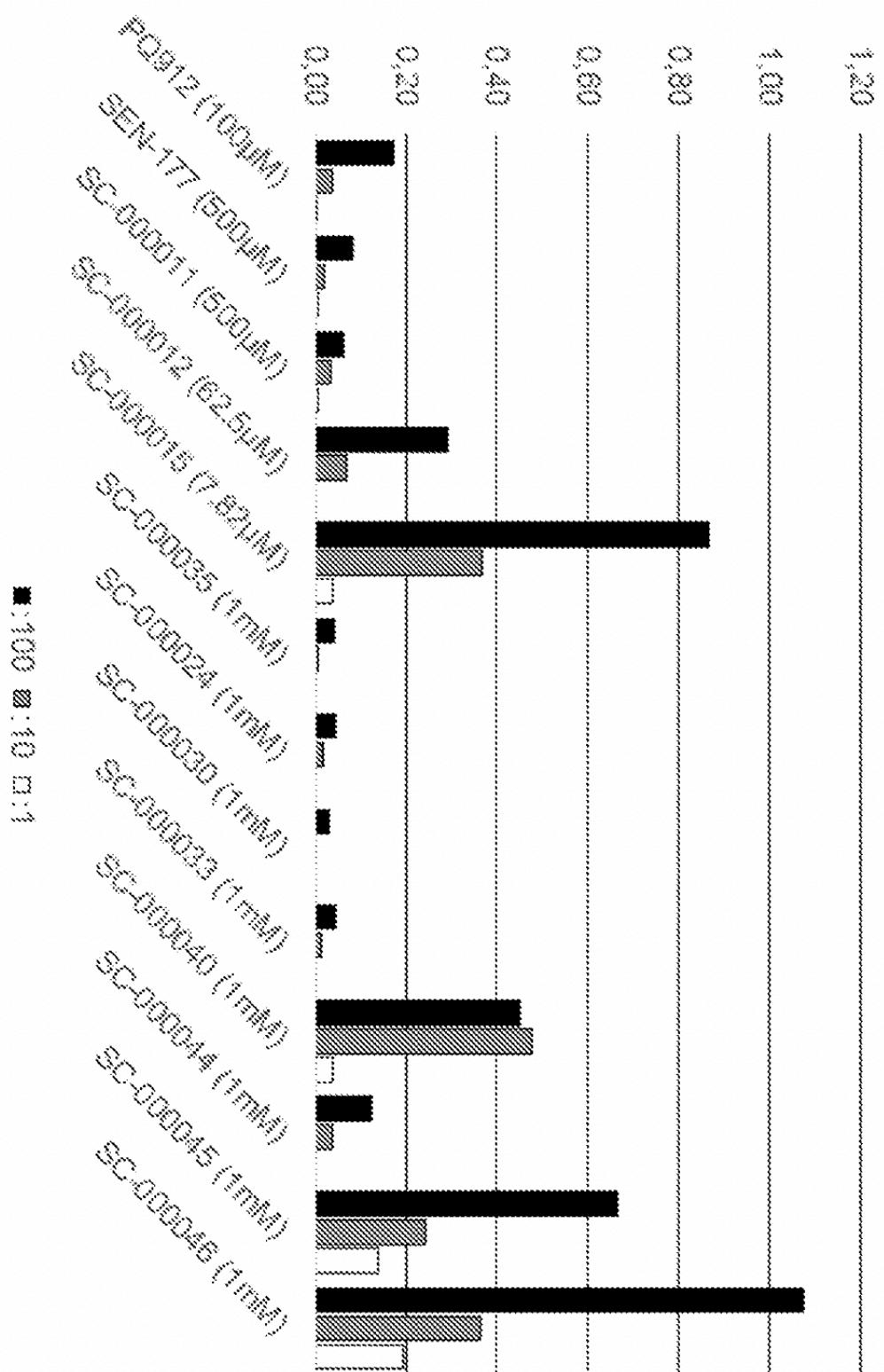


Fig. 27

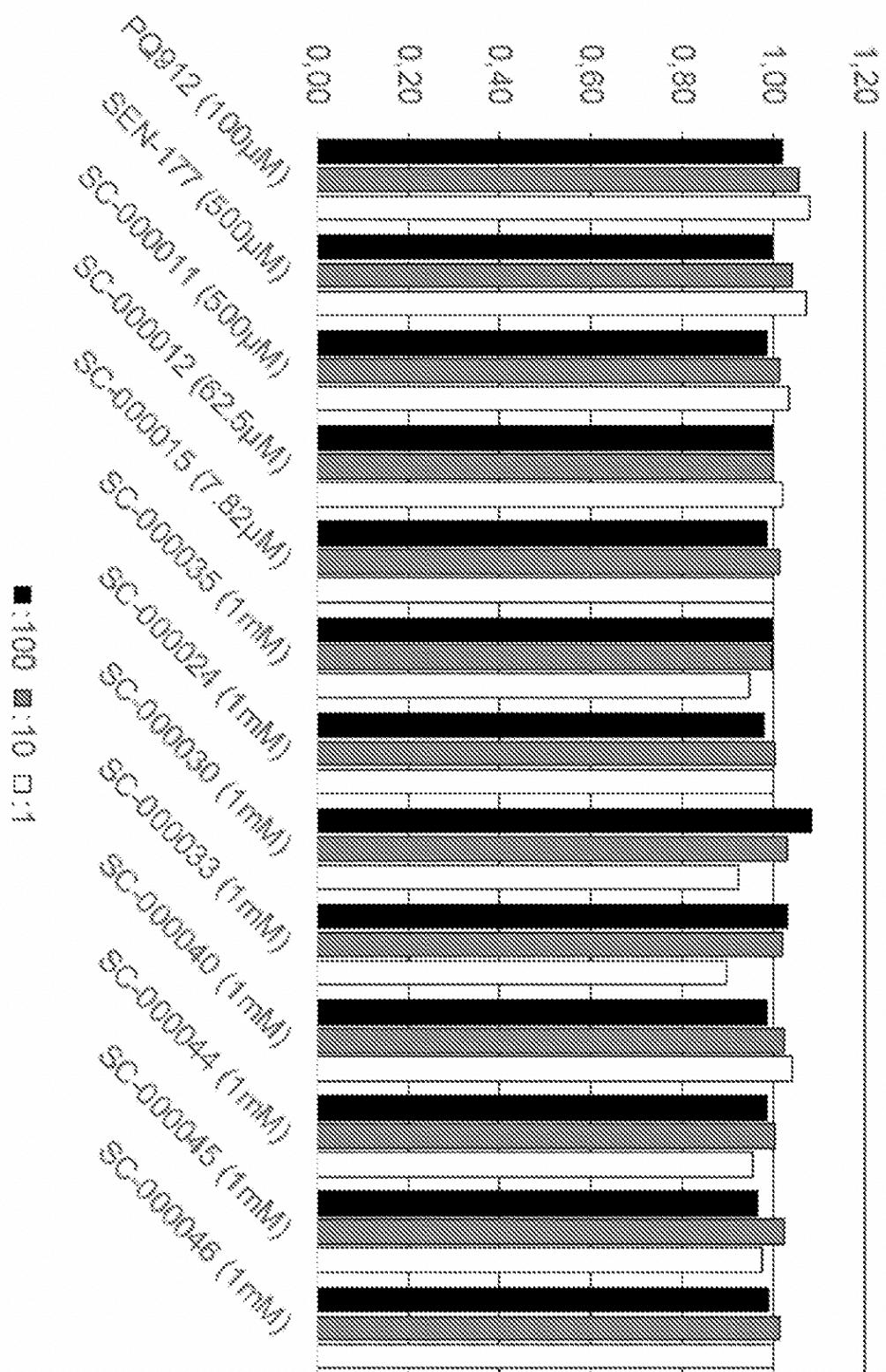


Fig. 28

