

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 978 707**

51 Int. Cl.:

**A61P 3/10** (2006.01)  
**A61P 29/00** (2006.01)  
**A61P 31/00** (2006.01)  
**A61P 37/02** (2006.01)  
**C07D 401/04** (2006.01)  
**C07D 401/14** (2006.01)  
**A61K 31/496** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.12.2020 PCT/US2020/066063**  
 87 Fecha y número de publicación internacional: **24.06.2021 WO21127472**  
 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.12.2020 E 20842804 (5)**  
 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.02.2024 EP 3927427**

54 Título: **Ligandos de la proteína 2 tipo lantionina C, células preparadas con ellos y terapias que las usan**

30 Prioridad:

**20.12.2019 US 201962951906 P**  
**29.05.2020 US 202063031938 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**18.09.2024**

73 Titular/es:

**NIMMUNE BIOPHARMA, INC. (100.0%)**  
**1013 McBryde Lane**  
**Blacksburg, VA 24060, US**

72 Inventor/es:

**BASSAGANYA-RIERA, JOSEP;**  
**LEBER, ANDREW y**  
**HONTECILLAS, RAQUEL**

74 Agente/Representante:

**CALLE LÓPEZ, Alejandro**

ES 2 978 707 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

Ligandos de la proteína 2 tipo lantionina C, células preparadas con ellos y terapias que las usan

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere al campo de los tratamientos médicos de enfermedades y trastornos. De manera más específica, la presente invención se refiere a clases de compuestos biológicamente activos que tratan y previenen enfermedades inflamatorias y de origen inmunitario tales como enfermedad inflamatoria intestinal, diabetes de tipo 1, lupus, síndrome de Sjögren, artritis reumatoide, psoriasis y esclerosis múltiple, así como enfermedades y trastornos inflamatorios crónicos tales como la resistencia a la insulina, tolerancia deteriorada a la glucosa, prediabetes, diabetes de tipo 2 e inflamación relacionada con la obesidad, entre otros.

15 **Antecedentes**

La proteína 2 tipo lantionina C (LANCL2) (denominada también "proteína 2 tipo lantionina sintetasa C" o "proteína 2 tipo componente C de lantionina sintetasa") es un receptor de membrana expresado en células inmunitarias y epiteliales de diversas mucosas, incluyendo las respiratorias y gastrointestinales, así como tejidos reproductivos y neurales que se pueden controlar mediante la unión directa de ligandos. Se ha demostrado que la activación de la vía LANCL2 es beneficiosa en múltiples trastornos autoinmunitarios, inflamatorios y metabólicos que van desde el control glucémico y la sensibilidad a la insulina en la diabetes hasta la promoción de la supervivencia y los efectos reguladores en enfermedades infecciosas víricas y bacterianas y la supresión de la inflamación en la enfermedad inflamatoria intestinal.

Los trastornos autoinmunitarios tales como la enfermedad inflamatoria intestinal (EII), lupus eritematoso sistémico, artritis reumatoide, diabetes de tipo 1, psoriasis y esclerosis múltiple, tienen una incidencia creciente en todo el mundo. Mientras tanto, otras enfermedades crónicas de origen metabólico, que incluyen prediabetes, diabetes de tipo 2 y síndrome metabólico, se estima que afectan a casi la mitad de la población adulta de los Estados Unidos. A través de estos trastornos, los tratamientos actuales tienen una eficacia leve con el potencial de provocar efectos secundarios graves, tales como ataques cardíacos y accidentes cerebrovasculares (TZD para la diabetes de tipo 2) o mayores tasas de cáncer e infección (productos biológicos para enfermedades inflamatorias intestinales y otras enfermedades autoinmunitarias) y sin mucho aumento de la calidad de vida global. La diabetes de tipo 1 no tiene medicamentos aprobados que no sean la terapia con insulina de por vida. Otras enfermedades tales como la esclerosis múltiple y el lupus eritematoso sistémico tienen opciones muy limitadas para frenar la progresión de la enfermedad hacia afecciones físicas debilitantes que requieren trasplantes de órganos y cuidados de vida completos. La vía LANCL2 ofrece una solución innovadora a estas enfermedades al normalizar el metabolismo, restaurar la tolerancia inmunológica y suprimir la inflamación que contribuye a un peor pronóstico en muchas de estas enfermedades.

El ácido abscísico ("ABA") es uno de los compuestos naturales que se une a LANCL2. Existe una enorme cantidad de compuestos descritos en el campo de la química orgánica sintética. Se proporcionan diversos compuestos en las siguientes referencias: WO1997/036866 de Diana *et al.*, WO 2006/053109 de Martin *et al.*, WO 2006/080821 de Kim *et al.*, WO 2007/019417 de Nunes *et al.*, WO 2009/067600 y WO 2009/067621 de Singh *et al.*, WO 2008/079277 de Adams *et al.*, JP 2008/056615 de Urasoe *et al.*, WO 2011/066898 de Stoessel *et al.*, US 2013/0142825 de Bassaganya-Riera *et al.* y la patente de Estados Unidos n.º 7.741.367 de Bassaganya-Riera *et al.* Se sabe que algunos de los compuestos descritos en estas referencias activan la vía LANCL2 y otros no.

Los compuestos dirigidos a LANCL2 anteriores, tales como BT-11, están altamente restringidos al tracto gastrointestinal con exposición sistémica limitada. Si bien esta localización puede resultar ventajosa para el tratamiento de trastornos e infecciones gastrointestinales, se necesitan otras clases de agentes terapéuticos basados en LANCL2 para el tratamiento de enfermedades sistémicas y trastornos no gastrointestinales con diferentes propiedades farmacocinéticas y potencia. El BT-11 y sus usos terapéuticos se describen en la patente US 9.556.146 de Bassaganya-Riera. *et al.*; patente US 9.839.635 de Bassaganya-Riera *et al.*; patente US 10.028.950 de Bassaganya-Riera *et al.*; patente US 10.201.538 de Bassaganya-Riera *et al.*; patente US 10.493.072 de Bassaganya-Riera *et al.*; patente US 10.682.349 de Bassaganya-Riera *et al.*; US 2019/0160100 A1 de Bassaganya-Riera *et al.*; Bissel *et al.* 2016 (Bissel P, BoesK, Hinckley J, Jortner BS, Magnin-Bissel G, Werre SR, Ehrich M, Carbo A, Philipson C, Hontecillas R, Philipson N, Gandour RD, Bassaganya-Riera J. "Exploratory Studies With BT-11: A Proposed Orally Active Therapeutic for Crohn's Disease". *Int J Toxicol.* sep. 2016;35(5):521-9); y Carbo *et al.* 2016 (Carbo A, Gandour RD, Hontecillas R, Philipson N, Uren A, Bassaganya-Riera J. "An N,N-Bis(benzimidazolylpicolinoyl)piperazine (BT-11): A Novel Lanthionine Synthetase C-Like 2-Based Therapeutic for Inflammatory Bowel Disease". *J Med Chem.* 23 de noviembre de 2016;59(22):10113-10126); Leber *et al.* 2018 (Leber A, Hontecillas R, Zoccoli-Rodriguez V, Bassaganya-Riera J. "Activation of LANCL2 by BT-11 Ameliorates IBD by Supporting Regulatory T Cell Stability Through Immunometabolic Mechanisms". *Inflamm Bowel Dis.* 16 de agosto de 2018; 24(9):1978-1991); Leber *et al.* 2019 *Int J Toxicol.* (Leber A, Hontecillas R, Zoccoli-Rodriguez V, Ehrich M, Davis J, Chauhan J, Bassaganya-Riera "J. Nonclinical Toxicology and Toxicokinetic Profile of an Oral Lanthionine Synthetase C-Like 2 (LANCL2) Agonist, BT-11". *Int J Toxicol.* marzo-abril de 2019;38(2):96-109); Leber *et al.* 2019 *J Immunol.* (Leber A, Hontecillas R, Zoccoli-Rodriguez V, Chauhan J, Bassaganya-Riera J. "Oral Treatment with BT-11 Ameliorates Inflammatory Bowel Disease by

Enhancing Regulatory T Cell Responses in the Gut". *J Immunol.* 1 de abril de 2019;202(7):2095-2104); y Leber *et al.* 2020 (Leber A, Hontecillas R, Zoccoli-Rodriguez V, Colombel JF, Chauhan J, Ehrich M, Farinola N, Bassaganya-Riera J. "The Safety, Tolerability, and Pharmacokinetics Profile of BT-11, an Oral, Gut-Restricted Lanthionine Synthetase C-Like 2 Agonist Investigational New Drug for Inflammatory Bowel Disease: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Phase I Clinical Trial". *Inflamm Bowel Dis.* 4 de marzo de 2020; 26(4):643-652).

El documento WO 2018/141854 A1 enseña derivados de piperazina que exhiben una alta afinidad por la región del tallo (parte proximal de la membrana del virus) de la hemaglutinina del virus de la gripe y una alta actividad de neutralización del virus, al tiempo que tienen una baja citotoxicidad.

La invención proporciona compuestos que se han desarrollado mediante nuevos enfoques de química médica y se han seleccionado utilizando técnicas informáticas, *in vitro*, e *in vivo*, para equilibrar la capacidad de unirse selectivamente a la proteína LANCL2 con biodisponibilidad y potencia sistémicas. Estos compuestos pueden influir en una respuesta beneficiosa en diversas afecciones, incluyendo pero sin limitación, enfermedades autoinmunitarias, inflamatorias crónicas, inflamatorias, metabólicas e infecciosas.

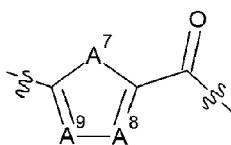
**Sumario de la invención**

Cualquier referencia a métodos de tratamiento o al uso de los compuestos como fármacos o para tratamiento en los párrafos siguientes de esta descripción debe interpretarse como una referencia a los compuestos, las composiciones farmacéuticas y los medicamentos de la presente invención para su uso en un método para el tratamiento del cuerpo humano (o animal) mediante terapia.

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

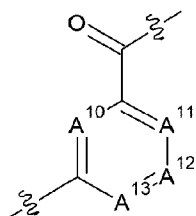
En algunas versiones, A<sup>1</sup> es C(R<sup>3</sup>). En algunas versiones, A<sup>1</sup> es N. En algunas versiones, A<sup>2</sup> es C(R<sup>3</sup>). En algunas versiones, A<sup>2</sup> es N. En algunas versiones, A<sup>3</sup> es C(R<sup>3</sup>). En algunas versiones, A<sup>3</sup> es N. En algunas versiones, A<sup>4</sup> es C(R<sup>3</sup>). En algunas versiones, A<sup>4</sup> es N. En algunas versiones, A<sup>5</sup> es N(R<sup>3</sup>). En algunas versiones, A<sup>5</sup> es O. En algunas versiones, A<sup>6</sup> es C(R<sup>3</sup>). En algunas versiones, A<sup>6</sup> es N. En algunas versiones, A<sup>1</sup>, A<sup>2</sup> y A<sup>3</sup> son C(R<sup>3</sup>); A<sup>5</sup> es N(R<sup>3</sup>); y A<sup>6</sup> es N. En algunas versiones, A<sup>1</sup>, A<sup>2</sup>, A<sup>3</sup> y A<sup>4</sup> son C(R<sup>3</sup>); A<sup>5</sup> es N(R<sup>3</sup>); y A<sup>6</sup> es N.

En algunas versiones, Y es:



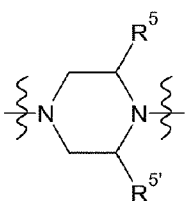
En algunas versiones, A<sup>7</sup> es N(R<sup>3</sup>). En algunas versiones, A<sup>7</sup> es N(R<sup>3</sup>), en donde el R<sup>3</sup> en el N(R<sup>3</sup>) es hidrógeno o halógeno. En algunas versiones, A<sup>7</sup> es O. En algunas versiones, A<sup>8</sup> es C(R<sup>3</sup>). En algunas versiones, A<sup>8</sup> es N. En algunas versiones, A<sup>9</sup> es C(R<sup>3</sup>). En algunas versiones, A<sup>9</sup> es N.

En algunas versiones, Y es:



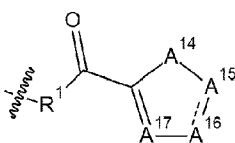
En algunas versiones, A<sup>10</sup> es C(R<sup>3</sup>). En algunas versiones, A<sup>10</sup> es N. En algunas versiones, A<sup>11</sup> es C(R<sup>3</sup>). En algunas versiones, A<sup>11</sup> es N. En algunas versiones, A<sup>12</sup> es C(R<sup>3</sup>). En algunas versiones, A<sup>12</sup> es N. En algunas versiones, A<sup>13</sup> es C(R<sup>3</sup>). En algunas versiones, A<sup>13</sup> es N. En algunas versiones, A<sup>11</sup>, A<sup>12</sup> y A<sup>13</sup> son C(R<sup>3</sup>). En algunas versiones, A<sup>10</sup> es N y A<sup>11</sup>, A<sup>12</sup> y A<sup>13</sup> son C(R<sup>3</sup>).

En algunas versiones, Q es piperazin-1,4-diilo o piperazin-1,4-diilo sustituido. En algunas versiones, Q es piperazin-1,4-diilo. En algunas versiones, Q es piperazin-1,4-diilo sustituido. En algunas versiones, el piperazin-1,4-diilo sustituido es:



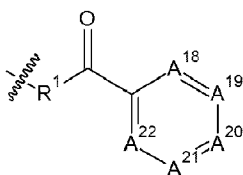
En algunas versiones uno o ambos de R<sup>5</sup> y R<sup>5'</sup> son independientemente alquilo opcionalmente sustituido en de una a tres posiciones con un sustituyente seleccionado independientemente entre un átomo de halógeno y alquilo; oxo; cicloalquilo; alqueno; alquino; hidroxilo; alquilo opcionalmente sustituido en de una a tres posiciones con un sustituyente seleccionado independientemente entre un átomo de halógeno y fenilo opcionalmente sustituido con de uno a tres sustituyentes seleccionados independientemente entre un átomo de halógeno, alquilo, alquilo, ciano, y nitro; arilo opcionalmente sustituido en de una a tres posiciones con un sustituyente seleccionado independientemente entre un átomo de halógeno, alquilo, alquilo, ciano, y nitro; mercapto; alquilo; un átomo de halógeno; nitro; ciano; carboxi; alquilo; alquilo; acilo; alquilo; amino opcionalmente sustituido; carbamilo opcionalmente sustituido; arilo opcionalmente sustituido con de uno a tres sustituyentes seleccionados independientemente entre un átomo de halógeno, alquilo, alquilo, ciano, y nitro; heteroarilo opcionalmente sustituido en de una a tres posiciones con un sustituyente seleccionado independientemente entre un átomo de halógeno y alquilo; y un grupo heterocíclico no aromático opcionalmente sustituido en de una a tres posiciones con un sustituyente seleccionado independientemente entre un átomo de halógeno y alquilo. En algunas versiones, uno o ambos de R<sup>5</sup> y R<sup>5'</sup> son independientemente oxo, hidroxilo, o alquilo opcionalmente sustituido. En algunas versiones, uno o ambos de entre R<sup>5</sup> y R<sup>5'</sup> son oxo. En algunas versiones, R<sup>5</sup> y R<sup>5'</sup> son cada uno oxo.

En algunas versiones, Y' es:



En algunas versiones, A<sup>14</sup> es N(R<sup>3</sup>). En algunas versiones, A<sup>14</sup> es N(R<sup>3</sup>), en donde el R<sup>3</sup> en el N(R<sup>3</sup>) es hidrógeno o halógeno. En algunas versiones, A<sup>14</sup> es O. En algunas versiones, — es un enlace, y A<sup>15</sup> es C(R<sup>3</sup>). En algunas versiones, — es un enlace, y A<sup>15</sup> es N. En algunas versiones, — es un enlace, y A<sup>16</sup> es C(R<sup>3</sup>). En algunas versiones, — es un enlace, y A<sup>16</sup> es N. En algunas versiones, — está ausente y A<sup>15</sup> es C(R<sup>3</sup>)<sub>2</sub>. En algunas versiones, — está ausente y A<sup>15</sup> es N(R<sup>3</sup>). En algunas versiones, — está ausente y A<sup>16</sup> es C(R<sup>3</sup>)<sub>2</sub>. En algunas versiones, — está ausente y A<sup>16</sup> es -C(H)(alquil C1-C3)-. En algunas versiones, está ausente, y A<sup>16</sup> es N(R<sup>3</sup>). En algunas versiones, A<sup>17</sup> es C(R<sup>3</sup>). En algunas versiones, A<sup>17</sup> es N.

En algunas versiones, Y' es:



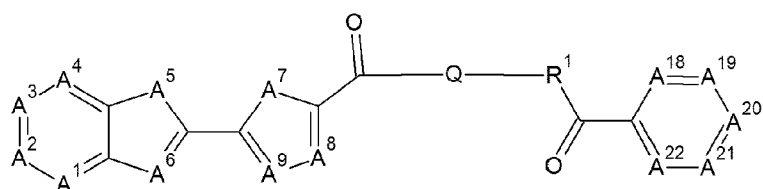
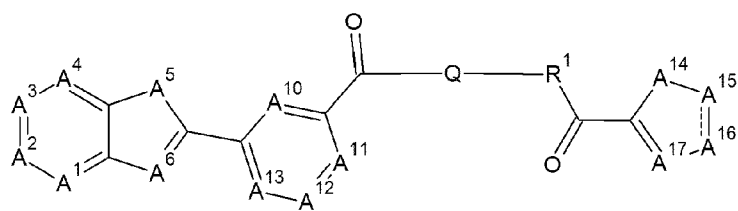
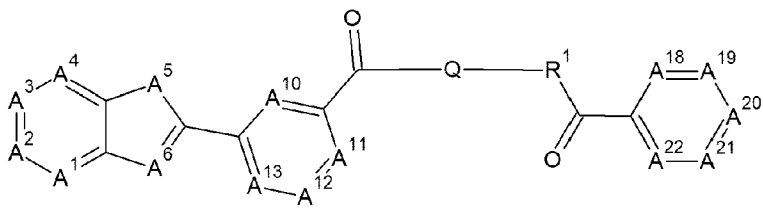
En algunas versiones, A<sup>18</sup> es C(R<sup>3</sup>). En algunas versiones, A<sup>18</sup> es N. En algunas versiones, A<sup>19</sup> es C(R<sup>3</sup>). En algunas versiones, A<sup>19</sup> es N. En algunas versiones, A<sup>20</sup> es C(R<sup>3</sup>). En algunas versiones, A<sup>20</sup> es N. En algunas versiones, A<sup>21</sup> es C(R<sup>3</sup>). En algunas versiones, A<sup>21</sup> es N. En algunas versiones, A<sup>22</sup> es C(R<sup>3</sup>). En algunas versiones, A<sup>22</sup> es N. En algunas versiones, A<sup>18</sup>, A<sup>20</sup> y A<sup>22</sup> son C(R<sup>3</sup>). En algunas versiones, A<sup>18</sup>, A<sup>19</sup>, A<sup>20</sup>, A<sup>21</sup> y A<sup>22</sup> son C(R<sup>3</sup>). En algunas versiones, A<sup>19</sup> es N. En algunas versiones, A<sup>21</sup> es N. En algunas versiones, A<sup>19</sup> y A<sup>21</sup> son ambos N. En algunas versiones, A<sup>18</sup>, A<sup>20</sup> y A<sup>22</sup> son C(R<sup>3</sup>), y uno o ambos de A<sup>19</sup> y A<sup>21</sup> es N. En algunas versiones, A<sup>18</sup>, A<sup>20</sup> y A<sup>22</sup> son C(R<sup>3</sup>), y ambos de A<sup>19</sup> y A<sup>21</sup> son N. En algunas versiones, A<sup>20</sup> es C(R<sup>3</sup>), y el R<sup>3</sup> en el C(R<sup>3</sup>) de A<sup>20</sup> es cualquier sustituyente descrito en el presente documento para R<sup>3</sup> excepto hidrógeno. En algunas versiones, A<sup>20</sup> es C(R<sup>3</sup>), y el R<sup>3</sup> en el C(R<sup>3</sup>) de A<sup>20</sup> es cualquier sustituyente descrito en el presente documento para R<sup>3</sup> excepto hidrógeno y halógeno. En algunas versiones, A<sup>20</sup> es C(R<sup>3</sup>), y el R<sup>3</sup> en el C(R<sup>3</sup>) de A<sup>20</sup> es ciano. En algunas versiones, A<sup>18</sup>, A<sup>19</sup>, A<sup>21</sup>, A<sup>22</sup> son cada uno CH, A<sup>20</sup> es C(R<sup>3</sup>), y el R<sup>3</sup> en el C(R<sup>3</sup>) de A<sup>20</sup> es ciano.

En algunas versiones, R<sup>1</sup> es alquilo opcionalmente sustituido que contiene opcionalmente uno o dos heteroátomos. En algunas versiones, R<sup>1</sup> es alquilo opcionalmente sustituido. En algunas versiones, R<sup>1</sup> es alquilo, opcionalmente sustituido, C1, C2 o C3. En algunas versiones, R<sup>1</sup> es alquilo, no sustituido, C1, C2 o C3. En algunas versiones, R<sup>1</sup> es alquilo C1 no sustituido. En algunas versiones, R<sup>1</sup> es alquilo C1, C2 o C3 sustituido con uno o más grupos

alquilo. En algunas versiones, R<sup>1</sup> es alquileo C1 sustituido con uno o dos grupos alquilo. En algunas versiones, R<sup>1</sup> es alquileo C1 sustituido con dos grupos alquilo.

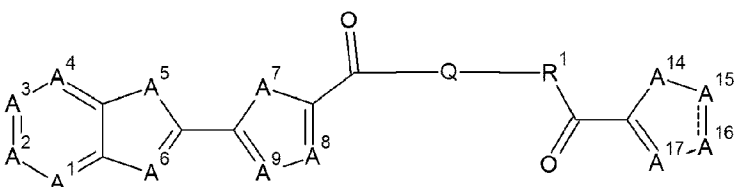
En algunas versiones, Z-Y-Q-Y' es:

5



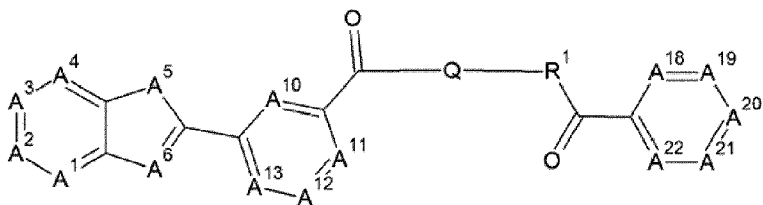
10

o



15

En algunas versiones, Z-Y-Q-Y' es:

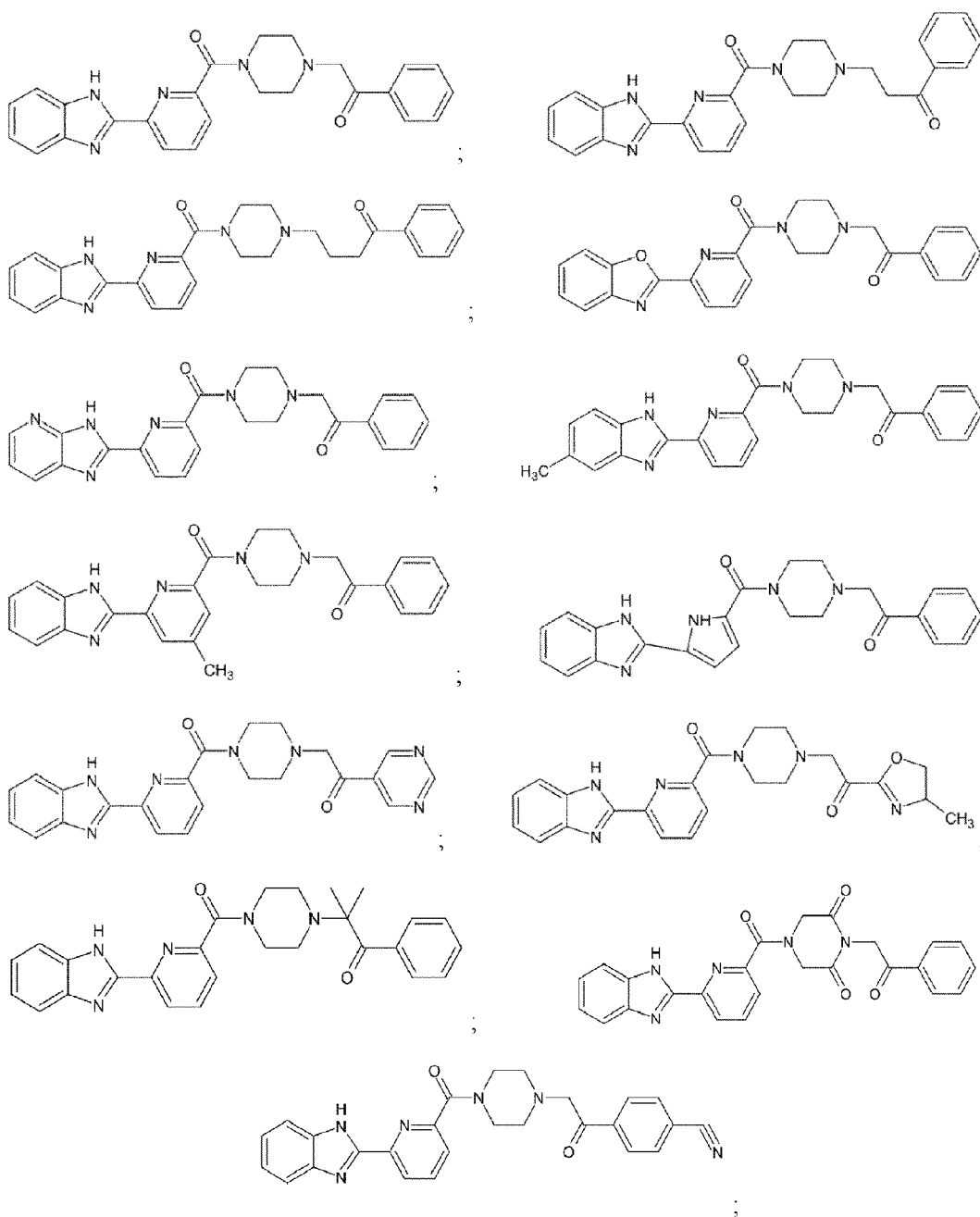


20 Q es piperazin-1,4-diilo o piperazin-1,4-diilo sustituido; A<sup>1</sup>, A<sup>2</sup>, A<sup>3</sup>, A<sup>4</sup>, A<sup>11</sup>, A<sup>12</sup>, A<sup>13</sup>, A<sup>18</sup>, A<sup>20</sup> y A<sup>22</sup> son C(R<sup>3</sup>); A<sup>5</sup> es N(R<sup>3</sup>); A<sup>6</sup> y A<sup>10</sup> son N; y R<sup>1</sup> es alquileo opcionalmente sustituido.

En algunas versiones, R<sup>3</sup> en cada caso, a menos que se indique lo contrario, es independientemente un átomo de hidrógeno, un átomo de halógeno, alquilo C1-C6, hidroxilo, metoxi, carboxilo, acetilo, trifluorometilo, amino, cicloalquilo, un grupo heterocíclico no aromático, arilo o heteroarilo.

25

En algunas versiones el compuesto se selecciona entre:



15 o una sal o éster de cualquiera de los anteriores.

Cualquier versión descrita anteriormente o en otro lugar del presente documento se puede combinar con una o más versiones no mutuamente excluyentes descritas anteriormente o en otro lugar del presente documento.

20 De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se proporciona un compuesto tal como se describe anteriormente para su uso en un método para tratar una afección en un animal, en donde la afección comprende una enfermedad autoinmunitaria. En algunas versiones, la afección comprende al menos una de una enfermedad autoinmunitaria, una enfermedad inflamatoria, una enfermedad inflamatoria crónica, diabetes y una enfermedad infecciosa.

25 En algunas versiones, la afección comprende enfermedad inflamatoria intestinal, tal como colitis ulcerosa y/o enfermedad de Crohn. En algunas versiones, la afección comprende lupus, tal como lupus eritematoso sistémico. En algunas versiones, la afección comprende el síndrome de Sjögren. En algunas versiones, la afección comprende artritis reumatoide. En algunas versiones, la afección comprende diabetes de tipo 1. En algunas versiones, la afección comprende una enfermedad vírica tal como gripe, infección por el virus Zika e infección por coronavirus. En algunas

30 versiones, la afección comprende esteatohepatitis no alcohólica.

En algunas versiones, la afección comprende un trastorno hiperproliferativo, una metabopatía congénita, una enfermedad inmunometabólica crónica, rechazo de trasplante de órganos y/o dolor crónico. En algunas versiones, el trastorno hiperproliferativo comprende el cáncer. En algunas versiones, el cáncer comprende un cáncer del tracto gastrointestinal. En algunas versiones, el cáncer del tracto gastrointestinal comprende el cáncer colorrectal. En algunas versiones, el trastorno hiperproliferativo comprende la poliposis adenomatosa familiar. En algunas versiones, la metabopatía congénita comprende una glucogenosis. En algunas versiones, la glucogenosis comprende la enfermedad de Andersen. En algunas versiones, la enfermedad inmunometabólica crónica comprende una enfermedad cardiovascular. En algunas versiones, la enfermedad cardiovascular comprende la aterosclerosis. En algunas versiones, la enfermedad inmunometabólica crónica comprende la hipertensión. En algunas versiones, la enfermedad autoinmunitaria comprende una enfermedad autoinmunitaria inducida por inmunoterapia contra el cáncer. En algunas versiones, la enfermedad autoinmunitaria inducida por inmunoterapia contra el cáncer comprende una enfermedad reumática inducida por inmunoterapia contra el cáncer. En algunas versiones, el trastorno inflamatorio comprende diverticulitis colónica aguda. En algunas versiones, el trastorno inflamatorio comprende inflamación del tracto gastrointestinal inducida por radiación. En algunas versiones, la inflamación del tracto gastrointestinal inducida por radiación comprende al menos uno de proctitis por radiación, enteritis por radiación y proctosigmoiditis por radiación. En algunas versiones, el dolor crónico comprende la fibromialgia.

También se divulgan métodos para generar una célula preparada a partir de una célula precursora con los compuestos descritos en el presente documento. Los métodos pueden comprender poner en contacto la célula precursora, *in vitro*, con uno o más de los compuestos descritos en el presente documento para generar la célula preparada. La célula precursora se puede poner en contacto con el compuesto en una cantidad y durante un tiempo eficaz para inducir una diferencia dependiente del compuesto en las células preparadas con respecto a las células precursoras. En algunas versiones, el contacto comprende poner en contacto las células precursoras con el compuesto y un agente que comprende uno o más de ácido todo-trans-retinoico, TGF- $\beta$ , acetato miristato de forbol, ionomicina, rapamicina e IL-2. En algunas versiones, las células precursoras comprenden células inmunitarias. En algunas versiones, las células precursoras comprenden glóbulos blancos. En algunas versiones, las células precursoras comprenden células seleccionadas entre el grupo que consiste en células mononucleares de sangre periférica y células mononucleares de la lámina propia. En algunas versiones, las células precursoras comprenden linfocitos T. En algunas versiones, las células precursoras comprenden linfocitos T CD4+ vírgenes. En algunas versiones, las células preparadas comprenden linfocitos Treg. En algunas versiones, la célula preparada se diferencia de la célula precursora. En algunas versiones, la diferencia dependiente del compuesto comprende una diferencia de la expresión génica en las células preparadas con respecto a las células precursoras. En algunas versiones, la diferencia dependiente del compuesto comprende al menos uno de un aumento de la expresión de IL-10 o uno de sus ortólogos, un aumento de la expresión de FOXP3 o uno de sus ortólogos, una disminución de la expresión de TNF $\alpha$  o uno de sus ortólogos, una disminución de la expresión de IFN $\gamma$  o uno de sus ortólogos, una disminución de la expresión de Tbet o uno de sus ortólogos, un aumento de la expresión de *Lag3* o uno de sus ortólogos, un aumento de la expresión de *Socs2* o uno de sus ortólogos, un aumento de la expresión de *Irf7* o uno de sus ortólogos, un aumento de la expresión de *P2rx7* o uno de sus ortólogos, un aumento de la expresión de *Capn3* o uno de sus ortólogos, un aumento de la expresión de *Ikzf2* o uno de sus ortólogos, un aumento de la expresión de *Stat5a* o uno de sus ortólogos, un aumento de la expresión de *Pten* o uno de sus ortólogos, un aumento de la expresión de *Foxo1* o uno de sus ortólogos, un aumento de la expresión de *Phlpp1* o uno de sus ortólogos, un aumento de la fosforilación de STAT5a o uno de sus ortólogos, un aumento de la fosforilación de FOXO1 o uno de sus ortólogos, y un aumento de la actividad de piruvato cinasa.

También se divulgan células aisladas generadas poniendo en contacto una célula precursora, *in vitro*, con uno o más de los compuestos descritos en el presente documento para generar una célula preparada.

También se divulgan métodos para tratar una afección en un animal con una célula preparada tal como se describe en el presente documento. Los métodos comprenden administrar la célula preparada al animal en una cantidad suficiente para tratar la afección. La afección puede comprender cualquier afección descrita anteriormente o en cualquier otro lugar del presente documento.

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

### Breve descripción de los dibujos

Figuras 1A-1C. Predicción computacional de la unión de compuestos seleccionados a LANCL2 en kcal/mol.  
 Figura 2. Farmacocinética del BT-63 después de una dosis oral de 10 y 40 mg/kg.  
 Figura 3. Validación inmunológica de la actividad del BT-63 en esplenocitos CD4+. Los porcentajes de linfocitos T CD4+ IFN $\gamma$ +, TNF $\alpha$ + e IL10+ FOXP3+ se midieron mediante citometría de flujo después del tratamiento *in vitro* de células con BT-63 a concentraciones de 0,1, 1 y 10  $\mu$ M en células de tipo salvaje (WT o *wild type*) y deficientes en LANCL2. La significancia estadística ( $p < 0,05$ ) está marcada con asteriscos.  
 Figuras 4A y 4B. Actividad de los compuestos en esplenocitos CD4+. Los porcentajes de linfocitos T CD4+ IFN $\gamma$ + y FOXP3+ se midieron mediante citometría de flujo después del tratamiento *in vitro* de células con BT-63 y BT-62 a concentraciones de 0,1, 1 y 10 micromolar (figura 4A). Los porcentajes de linfocitos T CD4+ IFN $\gamma$  + y TNF+se

midieron mediante citometría de flujo después del tratamiento *in vitro* de células con BT-104-A, BT-104-B y BT-104-C a concentraciones de 0,1 micromolar (figura 4B). La significancia estadística ( $p < 0,05$ ) está marcada con asteriscos.

Figura 5. Eficacia del BT-63 en un modelo NOD de DT1. Control semanal de glucosa en sangre y porcentaje de hiperglucemia de ratones NOD tratados con vehículo o con 10 o 20 mg/kg de BT-63 al día.

Figura 6. Efectos inmunitarios del BT-63 *in vivo* en un modelo NOD de diabetes de tipo 1 (DT1). Relación entre células productoras de IL10 esplénicas y células productoras de IFN $\gamma$ , linfocitos T auxiliares CD4+ BCL6+ IL21+esplénicos y linfocitos T CD4+ PD1+ a las 21 semanas de edad con tratamiento oral de vehículo o con 10 o 20 mg/kg de BT-63 al día.

Figura 7. Evaluación de biomarcadores plasmáticos del BT-63 en un modelo NOD de DT1. Concentraciones plasmáticas de péptido C, HbA1c, MCP-1 y TNF a las 21 semanas de edad con tratamiento oral de vehículo o con 10 o 20 mg/kg de BT-63 al día.

Figura 8. Eficacia del BT-63 en un modelo de LES inducido por TLR7/9. Anticuerpos plasmáticos contra ADN bicatenario, niveles de albúmina en orina, células de bazo CD45+ CD8+ IFN $\gamma$ + e IL6+ después de dos semanas de tratamiento oral con vehículo o 20 mg/kg de BT-63.

Figura 9. Eficacia del BT-63 en un modelo MDR1a-/- de EII. Los Th1, Th17, Treg CD4+ CD25+ FOXP3+ y neutrófilos de la lámina propia del colon después de cuatro semanas de tratamiento oral con vehículo o 20 mg/kg de BT-63.

Figura 10. Reducción de la inflamación sistémica en ratones Mdr1a-/- tratados con BT-63. Los Th1 y Treg CD25+ esplénicos después de cuatro semanas de tratamiento oral con vehículo o 20 mg/kg de BT-63.

Figura 11. Eficacia del BT-63 en un modelo murino de infección por el virus de la gripe A. Supervivencia e índice de actividad de la enfermedad durante los 12 días posteriores a la infección por el virus de la gripe A (H1N1) con tratamiento oral diario con vehículo o 20 mg/kg de BT-63.

Figura 12. Modulación por el BT-63 de las respuestas inmunitarias pulmonares a la infección por el virus de la gripe A. Los linfocitos T IL10+ CD8+ de pulmón, macrófagos alveolares, linfocitos T CD4 +TNF+ y neutrófilos el día 12 después de la infección con tratamiento oral diario con vehículo o 20 mg / kg de BT-63.

Figura 13. Eficacia del BT-63 en un modelo NZB/W F1 de LES. Variaciones del peso corporal con respecto al valor inicial durante 12 semanas de tratamiento con vehículo o 20 mg/kg de BT-63. Puntuación de proteínas en orina, anticuerpos anti-ADNbc en plasma y concentración plasmática de IFN- $\alpha$  después de 12 semanas de tratamiento oral con vehículo o BT-63 (20 mg/kg).

Figura 14. Respuestas inmunológicas al BT-63 en un modelo NZB/W F1. Linfocitos B foliculares esplénicos CD19+ IgD+ IgM<sup>lo</sup>, células plasmáticas CD138<sup>hi</sup> CD19<sup>lo</sup> MHCII<sup>lo</sup>, células plasmáticas CXCR3+, células mieloides IL6+ CD11b+ CD11c+, Treg CD4+CD25+FOXP3+, linfocitos T foliculares auxiliares CD4+ IL21+ BCL6+ después de 12 semanas de tratamiento oral con vehículo o BT-63 (20 mg/kg).

Figura 15. Compuestos ilustrativos adicionales de la invención (BT-104-A, BT-104-B, BT-104-C) que se unen a LANCL2 y que se pueden usar en cualquier método descrito en el presente documento. La conversión de la piperazina del BT-63 en piperazin-2,6-diona, como está presente en el BT-104-B, o la adición de los grupos gem-dimetilo o nitrilo al BT-63, como está presente en el BT-104-A o BT-104-C, respectivamente, sirven para mejorar la semivida sistémica del compuesto objetivo mediante la mejora de la resistencia del grupo metileno en el BT-63 al metabolismo enzimático.

Figuras 16A y 16B. Validación *in vivo* de la eficacia del BT-104-B en un modelo de CCl<sub>4</sub> de esteatohepatitis no alcohólica. Peso del hígado (figura 16A) y puntuación de fibrosis (figura 16B) después de 4 semanas de inyecciones quincenales de tetracloruro de carbono en ratones tratados con vehículo y BT-104-B (20 mg/kg). La significancia estadística ( $P < 0,05$ ) está marcada con asteriscos.

Figuras 17A-17C. Validación *in vivo* de la eficacia del BT-104-B en un modelo de artritis inducida por colágeno. Porcentajes de linfocitos T CD4+ IL17+ (figura 17A), CD4+ IFN $\gamma$ + (figura 17B) y células mieloides CD11b+ CD11c+ TNF+ (figura 17C) en los bazo de ratones con artritis inducida por colágeno después de 4 semanas de tratamiento oral diario con vehículo o BT-104-B (20 mg/kg). La significancia estadística ( $P < 0,05$ ) está marcada con asteriscos.

Figuras 18A-18C. Validación *in vivo* de la eficacia del BT-104-B en un modelo NZB/W F1 de LES. Porcentajes de linfocitos T CD4+ IL17+ (figura 18A), IL21+ (figura 18B) y CD25+ FOXP3+ (figura 18C) en los bazo de ratones NZB/W F1 después de 12 semanas de tratamiento oral diario con vehículo o BT-104-B (20 mg/kg). La significancia estadística ( $P < 0,05$ ) está marcada con asteriscos.

### Descripción detallada de la invención

Salvo que se especifique lo contrario, las siguientes definiciones se utilizan en toda la presente solicitud:

Análisis de Varianza (ANOVA): Proceso aritmético para dividir la variación general de conjuntos de datos en componentes específicos basados en fuentes de variación. Se ha utilizado para determinar si las diferencias numéricas entre los grupos de tratamiento son estadísticamente significativas.

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

Enantiómero: Isómero óptico; clasificación química de las moléculas según su capacidad para rotar el plano de polarización en el sentido de las agujas del reloj (+) o en el sentido contrario a las agujas del reloj (-).

Sustancialmente puro: Con una pureza de al menos el 90 % en peso, preferentemente al menos el 95 % en peso, tal

como al menos el 98 %, el 99 % o aproximadamente el 100 % en peso.

EII: La enfermedad inflamatoria intestinal (EII) implica una inflamación crónica de la totalidad o parte del tracto digestivo. La EII incluye principalmente la colitis ulcerosa y la enfermedad de Crohn. Ambas suelen implicar diarrea grave, dolor, fatiga y pérdida de peso. La EII puede ser debilitante y, en ocasiones, conduce a complicaciones potencialmente mortales.

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

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

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

FOXP3: La FOXP3 (caja de horquilla P3), también conocida como escurfina, es una proteína implicada en las respuestas del sistema inmunitario. Miembro de la familia de proteínas FOX, la FOXP3 parece funcionar como un regulador maestro (factor de transcripción) en el desarrollo y función de los linfocitos T reguladores.

TNF-alfa: El factor de necrosis tumoral (TNF, caquexina, o caquectina, y anteriormente conocida como factor de necrosis tumoral alfa o TNF $\alpha$ ) es una citocina involucrada en la inflamación sistémica y es miembro de un grupo de citocinas que estimulan la reacción de fase aguda.

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

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

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

Diabetes de tipo 1: Una enfermedad autoinmunitaria caracterizada como una afección crónica en la que el páncreas produce poca o ninguna insulina como resultado de la destrucción inmunitaria de las células beta productoras de insulina dentro de los islotes pancreáticos. La deficiencia de insulina conduce a una hiperglucemia crónica que puede causar daño a los órganos, acortar la esperanza de vida y reducir la calidad de vida. La enfermedad también se conoce como diabetes juvenil o diabetes insulino dependiente.

Lupus eritematoso sistémico: Una enfermedad autoinmunitaria en la que el sistema inmunitario reacciona a antígenos nucleares y forma complejos inmunitarios que pueden agregarse o causar daño a múltiples sistemas orgánicos, incluida la piel, las articulaciones, los riñones, el cerebro, el corazón y los sistemas cardiovasculares y otros órganos.

La expresión "átomo de halógeno" se refiere un átomo de flúor, un átomo de cloro, un átomo de bromo y un átomo de yodo. Un átomo de flúor, un átomo de cloro y un átomo de bromo son preferentes.

El término "heteroátomo" se refiere a un átomo de oxígeno, un átomo de azufre y un átomo de nitrógeno.

El término "alquilo" incluye un grupo hidrocarburo monovalente, lineal o ramificado, que tiene de uno a ocho átomos de carbono. Algunos ejemplos incluyen metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, isobutilo, sec-butilo, terc-butilo, n-pentilo, isopentilo, neo-pentilo, n-hexilo, isohexilo, n-heptilo, n-octilo y similares. Es preferente el alquilo C1-C6. Es preferente además el alquilo C1-C4 o el alquilo C1-C3. Cuando se especifica un número de átomos de carbono, significa un "alquilo" que tiene el número de átomos de carbono dentro del intervalo.

El término "alqueno" incluye un grupo hidrocarburo monovalente, lineal o ramificado, que tiene de dos a ocho átomos de carbono y uno o más enlaces dobles. Algunos ejemplos incluyen vinilo, alilo, 1-propenilo, 2-butenilo, 2-pentenilo, 2-hexenilo, 2-heptenilo, 2-octenilo y similares. Es preferente el alqueno C2-C6. Es preferente además el alqueno C2-C4.

El término "alquino" incluye un grupo hidrocarburo monovalente, lineal o ramificado, que tiene de dos a ocho átomos de carbono y uno o más enlaces triples. Algunos ejemplos incluyen etinilo, 1-propinilo, 2-propinilo, 2-butinilo, 2-pentinilo, 2-hexinilo, 2-heptinilo, 2-octinilo y similares. Es preferente el alquino C2-C6. Es preferente además el alquino C2-C4.

El término "cicloalquilo" incluye un cicloalquilo que tiene de tres a ocho átomos de carbono. Algunos ejemplos incluyen ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo, cicloheptilo, ciclooctilo y similares. Es preferente el cicloalquilo C3-C6.

- 5 El término "cicloalquenilo" incluye un cicloalquenilo que tiene de tres a ocho átomos de carbono. Algunos ejemplos incluyen ciclopropenilo, ciclobutenilo, ciclopentenilo, ciclohexenilo, cicloheptenilo, ciclooctenilo y similares. Es preferente el cicloalquenilo C3-C6.

10 El término "alquiloxi" incluye un grupo en donde un átomo de oxígeno está sustituido con un "alquilo" tal como se describe en el presente documento. Algunos ejemplos incluyen metoxi, etiloxi, n-propiloxi, isopropiloxi, n-butiloxi, isobutiloxi, *sec*-butiloxi, *terc*-butiloxi, n-pentiloxi, isopentiloxi, 2-pentiloxi, 3-pentiloxi, n-hexiloxi, isohexiloxi, 2-hexiloxi, 3-hexiloxi, n-heptiloxi, n-octiloxi y similares. Es preferente el alquiloxi C1-C6. Es preferente además el alquiloxi C1-C4 o el alquiloxi C1-C3. Cuando se especifica un número de átomos de carbono, significa un "alquiloxi" que tiene el número de átomos de carbono dentro del intervalo.

15 El término "alqueniloxi" incluye un grupo en donde un átomo de oxígeno está sustituido con un "alquenilo" tal como se describe en el presente documento. Algunos ejemplos incluyen viniloxi, aliloxi, 1-propeniloxi, 2-buteniloxi, 2-penteniloxi, 2-hexeniloxi, 2-hepteniloxi, 2-octeniloxi y similares. Es preferente el alqueniloxi C2-C6. Asimismo, es preferente además el alqueniloxi C2-C4. Cuando se especifica un número de átomos de carbono, significa un "alqueniloxi" que tiene el número de átomos de carbono dentro del intervalo.

20 El término "alquiniloxi" incluye un grupo en donde un átomo de oxígeno está sustituido con un "alquino" tal como se describe en el presente documento. Algunos ejemplos incluyen etiniloxi, 1-propiniloxi, 2-propiniloxi, 2-butiniloxi, 2-pentiniloxi, 2-hexiniloxi, 2-heptiniloxi, 2-octiniloxi y similares. Es preferente el alquiniloxi C2-C6. Es preferente además el alquiniloxi C2-C4. Cuando se especifica un número de átomos de carbono, significa un "alquiniloxi" que tiene el número de átomos de carbono dentro del intervalo.

25 El término "cicloalquiloxi" incluye un grupo en donde un átomo de oxígeno está sustituido con un "cicloalquilo" tal como se describe en el presente documento. Algunos ejemplos incluyen ciclopropiloxi, ciclobutiloxi, ciclopentiloxi, ciclohexiloxi, cicloheptiloxi y ciclooctiloxi. Es preferente el cicloalquiloxi C3-C6. Cuando se especifica un número de átomos de carbono, significa un "cicloalquiloxi" que tiene el número de átomos de carbono dentro del intervalo.

30 El término "cicloalqueniloxi" incluye un grupo en donde un átomo de oxígeno está sustituido con un "cicloalquenilo" tal como se describe en el presente documento. Algunos ejemplos incluyen ciclopropeniloxi, ciclobuteniloxi, ciclopenteniloxi, ciclohexeniloxi, ciclohepteniloxi y cicloocteniloxi. Es preferente el cicloalqueniloxi C3-C6. Cuando se especifica un número de átomos de carbono, significa un "cicloalqueniloxi" que tiene el número de átomos de carbono dentro del intervalo.

35 El término "alquiltio" incluye un grupo en donde un átomo de azufre está sustituido con un "alquilo" tal como se describe en el presente documento. Algunos ejemplos incluyen metiltio, etiltio, n-propiltio, isopropiltio, n-butiltio, isobutiltio, *sec*-butiltio, *terc*-butiltio, n-pentiltio, isopentiltio, 2-pentiltio, 3-pentiltio, n-hexiltio, isohexiltio, 2-hexiltio, 3-hexiltio, n-heptiltio, n-octiltio y similares. Es preferente el alquiltio C1-C6. Es preferente además el alquiltio C1-C4. Cuando se especifica un número de átomos de carbono, significa un "alquiltio" que tiene el número de átomos de carbono dentro del intervalo.

40 El término "alqueniltio" incluye un grupo en donde un átomo de azufre está sustituido con un "alquenilo" tal como se describe en el presente documento. Algunos ejemplos incluyen viniltio, aliltio, 1-propeniltio, 2-buteniltio, 2-penteniltio, 2-hexeniltio, 2-hepteniltio, 2-octeniltio y similares. Es preferente el alqueniltio C2-C6. Es preferente además el alquiltio C2-C4. Cuando se especifica un número de átomos de carbono, significa un "alqueniltio" que tiene el número de átomos de carbono dentro del intervalo.

45 El término "alquiniltio" incluye un grupo en donde un átomo de azufre está sustituido con un "alquino" tal como se describe en el presente documento. Algunos ejemplos incluyen etiniltio, 1-propiniltio, 2-propiniltio, 2-butiniltio, 2-pentiniltio, 2-hexiniltio, 2-heptiniltio, 2-octiniltio y similares. Es preferente el alquiniltio C2-C6. Es preferente además el alquiniltio C2-C4. Cuando se especifica un número de átomos de carbono, significa un "alquiniltio" que tiene el número de átomos de carbono dentro del intervalo.

50 El término "alquilsulfino" incluye un grupo en donde el sulfino está sustituido con un "alquilo" tal como se describe en el presente documento. Algunos ejemplos incluyen metilsulfino, etilsulfino, n-propilsulfino, isopropilsulfino, n-butilsulfino, isobutilsulfino, *sec*-butilsulfino, *terc*-butilsulfino, n-pentilsulfino, isopentilsulfino, 2-pentilsulfino, 3-pentilsulfino, n-hexilsulfino, isohexilsulfino, 2-hexilsulfino, 3-hexilsulfino, n-heptilsulfino, n-octilsulfino y similares. Es preferente el alquilsulfino C1-C6. Es preferente además el alquilsulfino C1-C4.

55 El término "alquilsulfonilo" incluye un grupo en donde el sulfonilo está sustituido con un "alquilo" tal como se describe en el presente documento. Algunos ejemplos incluyen metilsulfonilo, etilsulfonilo, n-propilsulfonilo, isopropilsulfonilo, n-butilsulfonilo, isobutilsulfonilo, *sec*-butilsulfonilo, *terc*-butilsulfonilo, n-pentilsulfonilo, isopentilsulfonilo, 2-

pentilsulfonilo, 3-pentilsulfonilo, n-hexilsulfonilo, isohexilsulfonilo, 2-hexilsulfonilo, 3-hexilsulfonilo, n-heptilsulfonilo, n-octilsulfonilo y similares. Es preferente el alquilsulfonilo C1-C6. Es preferente además el alquilsulfonilo C1-C4.

El término "alquilsulfonilo" incluye un grupo en donde un átomo de oxígeno está sustituido con un "alquilsulfonilo" tal como se describe en el presente documento. Algunos ejemplos incluyen metilsulfonilo, etilsulfonilo, n-propilsulfonilo, isopropilsulfonilo, n-butilsulfonilo, isobutilsulfonilo, *sec*-butilsulfonilo, *terc*-butilsulfonilo, n-pentilsulfonilo, isopentilsulfonilo, 2-pentilsulfonilo, 3-pentilsulfonilo, n-hexilsulfonilo, isohexilsulfonilo, 2-hexilsulfonilo, 3-hexilsulfonilo, n-heptilsulfonilo, n-octilsulfonilo y similares. Es preferente el alquilsulfonilo C1-C6. Es preferente además el alquilsulfonilo C1-C4.

El término "cicloalquilitio" incluye un grupo en donde un átomo de azufre está sustituido con un "cicloalquilo" tal como se describe en el presente documento. Algunos ejemplos incluyen ciclopropiltio, ciclobutiltio, ciclopentiltio, ciclohexiltio, cicloheptiltio, ciclooctiltio y similares. Es preferente el cicloalquilitio C3-C6. Cuando se especifica un número de átomos de carbono, significa un "cicloalquilitio" que tiene el número de átomos de carbono dentro del intervalo.

El término "cicloalquilsulfonilo" incluye un grupo en donde el sulfonilo está sustituido con un "cicloalquilo" tal como se describe en el presente documento. Algunos ejemplos que incluyen ciclopropilsulfonilo, ciclobutilsulfonilo, ciclopentilsulfonilo, ciclohexilsulfonilo, cicloheptilsulfonilo y ciclooctilsulfonilo se ilustran. Preferentemente cicloalquilsulfonilo C3-C6.

El término "cicloalquilsulfonilo" incluye un grupo en donde el sulfonilo está sustituido con un "cicloalquilo" tal como se describe en el presente documento. Algunos ejemplos incluyen ciclopropilsulfonilo, ciclobutilsulfonilo, ciclopentilsulfonilo, ciclohexilsulfonilo, cicloheptilsulfonilo y ciclooctilsulfonilo. Es preferente el cicloalquilsulfonilo C3-C6.

El término "cicloalquilsulfonilo" incluye un grupo en donde un átomo de oxígeno está sustituido con un "cicloalquilsulfonilo" tal como se describe en el presente documento. Algunos ejemplos incluyen ciclopropilsulfonilo, ciclobutilsulfonilo, ciclopentilsulfonilo, ciclohexilsulfonilo, cicloheptilsulfonilo y ciclooctilsulfonilo. Es preferente el cicloalquilsulfonilo C3-C6.

El término "cicloalquilenitio" incluye un grupo en donde un átomo de azufre está sustituido con un "cicloalqueno" tal como se describe en el presente documento. Algunos ejemplos incluyen ciclopropenitio, ciclobutenitio, ciclopentenitio, ciclohexenitio, cicloheptenitio y ciclooctenitio. Es preferente el cicloalquilenitio C3-C6. Cuando se especifica un número de átomos de carbono, significa un "cicloalquilenitio" que tiene el número de átomos de carbono dentro del intervalo.

El término "cicloalqueniilsulfonilo" incluye un grupo en donde el sulfonilo está sustituido con un "cicloalqueno" tal como se describe en el presente documento. Algunos ejemplos incluyen ciclopropeniilsulfonilo, ciclobuteniilsulfonilo, ciclopenteniilsulfonilo, ciclohexeniilsulfonilo, ciclohepteniilsulfonilo y cicloocteniilsulfonilo. Es preferente el cicloalqueniilsulfonilo C3-C6.

El término "cicloalqueniilsulfonilo" incluye un grupo en donde el sulfonilo está sustituido con un "cicloalqueno" tal como se describe en el presente documento. Algunos ejemplos incluyen ciclopropeniilsulfonilo, ciclobuteniilsulfonilo, ciclopenteniilsulfonilo, ciclohexeniilsulfonilo, ciclohepteniilsulfonilo y cicloocteniilsulfonilo. Preferentemente es preferente el cicloalqueniilsulfonilo C3-C6.

El término "cicloalqueniilsulfonilo" incluye un grupo en donde un átomo de oxígeno está sustituido con un "cicloalqueniilsulfonilo" descrito tal como se describe en el presente documento. Algunos ejemplos incluyen ciclopropeniilsulfonilo, ciclobuteniilsulfonilo, ciclopenteniilsulfonilo, ciclohexeniilsulfonilo, ciclohepteniilsulfonilo y cicloocteniilsulfonilo. Es preferente el cicloalqueniilsulfonilo C3-C6.

El término "alquilocarbonilo" incluye un grupo en donde el carbonilo está sustituido con un "alquilo" tal como se describe en el presente documento. Algunos ejemplos incluyen metiloxycarbonilo, etiloxycarbonilo, n-propiloxycarbonilo, isopropiloxycarbonilo, n-butiloxycarbonilo, *terc*-butiloxycarbonilo y n-pentiloxycarbonilo. Es preferente el alquilocarbonilo C1-C6 o C1-C4. Es preferente además el alquilocarbonilo C1-C2.

El término "alquilocarbonilo" incluye un grupo en donde el carbonilo está sustituido con un "alquilo" tal como se describe en el presente documento. Algunos ejemplos incluyen viniloxycarbonilo, aliloxycarbonilo, 1-propeniloxycarbonilo, 2-buteniloxycarbonilo y 2-penteniloxycarbonilo. Es preferente el alquilocarbonilo C2-C6 o C2-C4.

El término "alquilocarbonilo" incluye un grupo en donde el carbonilo está sustituido con un "alquilo" tal como se describe en el presente documento. Algunos ejemplos incluyen etiniloxycarbonilo, 1-propiniloxycarbonilo, 2-propiniloxycarbonilo, 2-buteniloxycarbonilo y 2-pentiniloxycarbonilo. Es preferente el alquilocarbonilo C2-C6 o C2-C4.

El término "alquilo" incluye alquilocarbonilo en donde la parte de alquilo es un "alquilo" tal como se describe en el presente documento, alqueniilsulfonilo en donde la parte de alqueno es un "alqueno" tal como se describe en el presente

documento, alquilcarbonilo en donde la parte de alquilo es un "alquilo" tal como se describe en el presente documento, cicloalquilcarbonilo en donde la parte de cicloalquilo es un "cicloalquilo" tal como se describe en el presente documento, arilcarbonilo en donde la parte de arilo es un "arilo" tal como se describe en el presente documento, heteroarilcarbonilo en donde la parte del heteroarilo es un "heteroarilo" tal como se describe en el presente documento, y heterociclicarbonilo no aromático en donde la parte del grupo heterocíclico no aromático es un "grupo heterocíclico no aromático" tal como se describe en el presente documento. El "alquilo", "alquenilo", "alquinilo", "cicloalquilo", "arilo", "heteroarilo", y "grupo heterocíclico no aromático" pueden estar sustituidos respectivamente con grupos sustituyentes ilustrados en "alquilo opcionalmente sustituido", "alquenilo opcionalmente sustituido", "alquinilo opcionalmente sustituido", "cicloalquilo opcionalmente sustituido", "arilo opcionalmente sustituido", "heteroarilo opcionalmente sustituido", y "grupo heterocíclico no aromático opcionalmente sustituido" tal como se describe en el presente documento. Ejemplos del grupo acilo incluyen acetilo, propionilo, butirilo, ciclohexilcarbonilo, benzilo, piridincarbonilo y similares.

La expresión "amino opcionalmente sustituido" incluye un grupo amino que puede estar sustituido con uno o dos grupos de un "alquilo" tal como se describe en el presente documento, un "alquenilo" tal como se describe en el presente documento, un "alquinilo" tal como se describe en el presente documento, un "cicloalquilo" tal como se describe en el presente documento, un "cicloalquinilo" tal como se describe en el presente documento, un "arilo" tal como se describe en el presente documento, un "heteroarilo" tal como se describe en el presente documento, un "acilo" tal como se describe en el presente documento, un "alquiloilcarbonilo" tal como se describe en el presente documento, un "alqueniloilcarbonilo" tal como se describe en el presente documento, un "alquiniloilcarbonilo" tal como se describe en el presente documento, un "alquilsulfonilo", un "alqueniilsulfonilo", un "alquiniilsulfonilo", un "arilsulfonilo", y/o un "heteroarilsulfonilo" tal como se describe en el presente documento. Ejemplos del grupo amino opcionalmente sustituido incluyen amino, metilamino, dimetilamino, etilamino, dietilamino, etilmetilamino, bencilamino, acetilamino, benzoilamino, metiloxicarbonilamino y metanosulfonilamino. Amino, metilamino, dimetilamino, etilmetilamino, dietilamino, acetilamino y metanosulfonilamino son preferentes.

La expresión "carbamoilo opcionalmente sustituido" incluye un grupo aminocarbonilo en donde la parte de amino opcionalmente sustituido es un "amino opcionalmente sustituido" tal como se describe en el presente documento. Ejemplos del grupo carbamoilo opcionalmente sustituido incluyen carbamoilo, N-metilcarbamoilo, N,N-dimetilcarbamoilo, N-etil-N-metilcarbamoilo, N,N-dietilcarbamoilo, N-fenilcarbamoilo, N-bencilcarbamoilo, N-acetilcarbamoilo y N-metilsulfonilcarbamoilo, etc. Carbamoilo, N-metilcarbamoilo, N,N-dimetilcarbamoilo y N-metilsulfonilcarbamoilo, etc., son preferentes.

La expresión "sulfamoilo opcionalmente sustituido" incluye un grupo aminosulfonilo en donde la parte de amino opcionalmente sustituido es un "amino opcionalmente sustituido" tal como se describe en el presente documento. Ejemplos del grupo sulfamoilo opcionalmente sustituido incluyen sulfamoilo, N-metilsulfamoilo, N,N-dimetilsulfamoilo, N-etil-N-metilsulfamoilo, N,N-dietilsulfamoilo, N-fenilsulfamoilo, N-bencilsulfamoilo, N-acetilsulfamoilo y N-metilsulfonilsulfamoilo, etc. Sulfamoilo, N-metilsulfamoilo, N,N-dimetilsulfamoilo y N-metilsulfonilsulfamoilo, etc., son preferentes.

El término "alquilenilo" significa un grupo alquilenilo, lineal o ramificado, que tiene de uno a ocho átomos de carbono. Algunos ejemplos incluyen metileno, etileno, 1-metiletileno, trimetileno, 1-metiltrimetileno, pentametileno, hexametileno y similares. Son preferentes los alquilenilos C1-C4 o C1-3. Es preferente además el alquilenilo C1-C2.

El término "arilo" incluye hidrocarburos cíclicos aromáticos monocíclicos o aromáticos condensados. Puede estar condensado con un "cicloalquilo" tal como se describe en el presente documento, un "cicloalquenilo" tal como se describe en el presente documento o un "grupo heterocíclico no aromático" tal como se describe en el presente documento en cualquier posición posible. Tanto el anillo monocíclico como el anillo condensado pueden estar sustituidos en cualquier posición. Algunos ejemplos incluyen fenilo, 1-naftilo, 2-naftilo, antrilo, tetrahidronaftilo, 1,3-benzodioxolilo, 1,4-benzodioxanilo, etc. Fenilo, 1-naftilo y 2-naftilo son preferentes. Es preferente además el fenilo.

El término "grupo heterocíclico no aromático" incluye un anillo heterocíclico no aromático de 5 a 7 miembros que contiene uno o más heteroátomos seleccionados independientemente entre átomos de oxígeno, azufre y nitrógeno o un anillo multicíclico formado condensando los dos o más anillos de este. Algunos ejemplos incluyen pirrolidinilo (por ejemplo, 1-pirrolidinilo, 2-pirrolidinilo), pirrolinilo (por ejemplo, 3-pirrolinilo), imidazolidinilo (por ejemplo, 2-imidazolidinilo), imidazolinilo (por ejemplo, imidazolinilo), pirazolidinilo (por ejemplo, 1-pirazolidinilo, 2-pirazolidinilo), pirazolinilo (por ejemplo, pirazolinilo), piperidilo (por ejemplo, piperidino, 2-piperidilo), piperazinilo (por ejemplo, 1-piperazinilo), indolinilo (por ejemplo, 1-indolinilo), isoindolinilo (por ejemplo, isoindolinilo), morfolinilo (por ejemplo, morfolino, 3-morfolinilo), etc.

El término "heteroarilo" incluye un anillo aromático de 5 a 6 miembros que contiene uno o más heteroátomos seleccionados independientemente entre átomos de oxígeno, de azufre y nitrógeno. Puede estar condensado con un "cicloalquilo" tal como se describe en el presente documento, un "arilo" tal como se describe en el presente documento, un "grupo heterocíclico no aromático" tal como se describe en el presente documento, u otro heteroarilo en cualquier posición posible. El grupo heteroarilo puede estar sustituido en cualquier posición siempre que sea un anillo monocíclico o un anillo condensado. Algunos ejemplos incluyen pirrolilo (por ejemplo, 1-pirrolilo, 2-pirrolilo, 3-pirrolilo),

furilo (por ejemplo, 2-furilo, 3-furilo), tienilo (por ejemplo, 2-tienilo, 3-tienilo), imidazolilo (por ejemplo, 2-imidazolilo, 4-imidazolilo), pirazolilo (por ejemplo, 1-pirazolilo, 3-pirazolilo), isotiazolilo (por ejemplo, 3-isotiazolilo), isoxazolilo (por ejemplo, 3-isoxazolilo), oxazolilo (por ejemplo, 2-oxazolilo), tiazolilo (por ejemplo, 2-tiazolilo), piridilo (por ejemplo, 2-piridilo, 3-piridilo, 4-piridilo), pirazinilo (por ejemplo, 2-pirazinilo), pirimidinilo (por ejemplo, 2-pirimidinilo, 4-pirimidinilo), 5 piridazinilo (por ejemplo, 3-piridazinilo), tetrazolilo (por ejemplo, 1H-tetrazolilo), oxadiazolilo (por ejemplo, 1,3,4-oxadiazolilo), tiadiazolilo (por ejemplo, 1,3,4-tiadiazolilo), indolidinilo (por ejemplo, 2-indolidinilo, 6-indolidinilo), isoindolinilo (por ejemplo, 2-isoindolinilo), indolilo (por ejemplo, 1-indolilo, 2-indolilo, 3-indolilo), indazolilo (por ejemplo, 3-indazolilo), purinilo (por ejemplo, 8-purinilo), quinolidinilo (por ejemplo, 2-quinolidinilo), isoquinolilo (por ejemplo, 3-isoquinolilo), quinolilo (por ejemplo, 2-quinolilo, 5-quinolilo), ftarazinilo (por ejemplo, 1-ftarazinilo), naftilidinilo (por ejemplo, 2-naftilidinilo), 10 quinolanilo (por ejemplo, 2-quinolanilo), quinazolinilo (por ejemplo, 2-quinazolinilo), cinnolinilo (por ejemplo, 3-cinnolinilo), pteridinilo (por ejemplo, 2-pteridinilo), carbazolilo (por ejemplo, 2-carbazolilo, 4-carbazolilo), fenantridinilo (por ejemplo, 2-fenantridinilo, 3-fenantridinilo), acridinilo (por ejemplo, 1-acridinilo, 2-acridinilo), dibenzofuranilo (por ejemplo, 1-dibenzofuranilo, 2-dibenzofuranilo), benzoimidazolilo (por ejemplo, 2-benzoimidazolilo), benzoisoxazolilo (por ejemplo, 3-benzoisoxazolilo), benzooxazolilo (por ejemplo, 2-benzooxazolilo), 15 benzooxadiazolilo (por ejemplo, 4-benzooxadiazolilo), benzoisotiazolilo (por ejemplo, 3-benzoisotiazolilo), benzotiazolilo (por ejemplo, 2-benzotiazolilo), benzofurilo (por ejemplo, 3-benzofurilo), benzotienilo (por ejemplo, 2-benzotienilo), dibenzotienilo (por ejemplo, 2-dibenzotienilo) y benzodioxolilo (por ejemplo, 1,3-benzodioxolilo), etc.

El término "ariloxi" incluye un grupo en donde un átomo de oxígeno está sustituido con un "arilo" tal como se describe en el presente documento. Algunos ejemplos incluyen feniloxi y naftiloxi, etc.

El término "arilitio" incluye un grupo en donde un átomo de azufre está sustituido con un "arilo" tal como se describe en el presente documento. Algunos ejemplos incluyen fenilitio y naftilitio, etc.

El término "arilsulfínilo" incluye un grupo en donde el sulfínilo está sustituido con un "arilo" tal como se describe en el presente documento. Algunos ejemplos incluyen fenilsulfínilo y naftilsulfínilo, etc.

El término "arilsulfonilo" incluye un grupo en donde el sulfonilo está sustituido con un "arilo" tal como se describe en el presente documento. Algunos ejemplos incluyen fenilsulfonilo y naftilsulfonilo, etc.

Ejemplos de "arilsulfoniloxi" incluyen fenilsulfoniloxi y naftilsulfoniloxi, etc.

El término "ariloxicarbonilo" incluye un grupo en donde el carbonilo está sustituido con un "ariloxi" tal como se describe en el presente documento. Algunos ejemplos incluyen feniloxicarbonilo, 1-naftiloxicarbonilo y 2-naftiloxicarbonilo, etc.

El término "heteroariloxi" incluye un grupo en donde un átomo de oxígeno está sustituido con un "heteroarilo" tal como se describe en el presente documento. Algunos ejemplos incluyen pirroliloxi, furiloxi, tieniloxi, imidazoliloxi, pirazoliloxi, isotiazoliloxi, isoxazoliloxi, oxazoliloxi, tiazoliloxi, piridiloxi, piraziniloxi, pirimidiniloxi, piridaziniloxi, tetrazoliloxi, oxadiazoliloxi, tiadiazoliloxi, indolidiniloxi, isoindoliniloxi, indoliloxi, indazoliloxi, puriniloxi, quinolidiniloxi, isoquinoliloxi, 40 quinoliloxi, ftaraziniloxi, naftilidiniloxi, quinolaniloxi, quinazoliniloxi, cinnoliniloxi, pteridiniloxi, carbazoliloxi, fenantridiniloxi, acridiniloxi, dibenzofuraniloxi, benzoimidazoliloxi, benzoisoxazoliloxi, benzooxazoliloxi, benzooxadiazoliloxi, benzoisotiazoliloxi, benzotiazoliloxi, benzofuriloxi, benzotieniloxi, dibenzotieniloxi y benzodioxoliloxi se ilustran. Preferentemente furiloxi, tieniloxi, imidazoliloxi, pirazoliloxi, isotiazoliloxi, isoxazoliloxi, oxazoliloxi, tiazoliloxi, piridiloxi, piraziniloxi, pirimidiniloxi y piridaziniloxi, etc.

El término "heteroarilitio" incluye un grupo en donde un átomo de azufre está sustituido con un "heteroarilo" tal como se describe en el presente documento. Algunos ejemplos incluyen pirrolilitio, furilitio, tienilitio, imidazolilitio, pirazolilitio, isotiazolilitio, isoxazolilitio, oxazolilitio, tiazolilitio, piridilitio, pirazinilitio, pirimidinilitio, piridazinilitio, tetrazolilitio, oxadiazolilitio, tiadiazolilitio, indolidinilitio, isoindolinilitio, indolilitio, indazolilitio, purinilitio, quinolidinilitio, isoquinolilitio, quinolilitio, ftarazinilitio, naftilidinilitio, quinolanilitio, quinazolinilitio, cinnolinilitio, pteridinilitio, fenantridinilitio, acridinilitio, dibenzofuranilitio, benzoimidazolilitio, benzoisoxazolilitio, benzooxazolilitio, benzooxadiazolilitio, benzoisotiazolilitio, benzotiazolilitio, benzofurilitio, benzotienilitio, dibenzotienilitio y benzodioxolilitio, etc., se ilustran. Preferentemente furilitio, tienilitio, imidazolilitio, pirazolilitio, isotiazolilitio, isoxazolilitio, oxazolilitio, tiazolilitio, piridilitio, pirazinilitio, pirimidinilitio y 55 piridazinilitio, etc.

El término "heteroarilsulfínilo" incluye un grupo en donde el sulfínilo está sustituido con un "heteroarilo" tal como se describe en el presente documento. Algunos ejemplos incluyen pirrolilsulfínilo, furilsulfínilo, tienilsulfínilo, imidazolilsulfínilo, pirazolilsulfínilo, isotiazolilsulfínilo, isoxazolilsulfínilo, oxazolilsulfínilo, tiazolilsulfínilo, piridilsulfínilo, pirazinilsulfínilo, pirimidinilsulfínilo, piridazinilsulfínilo, tetrazolilsulfínilo, oxadiazolilsulfínilo, tiadiazolilsulfínilo, indolidinilsulfínilo, isoindolilsulfínilo, indolilsulfínilo, indazolilsulfínilo, purinilsulfínilo, quinolidinilsulfínilo, isoquinolilsulfínilo, quinolilsulfínilo, ftarazinilsulfínilo, naftilidinilsulfínilo, quinolanilsulfínilo, quinazolinilsulfínilo, cinnolinilsulfínilo, pteridinilsulfínilo, carbazolilsulfínilo, fenantridinilsulfínilo, acridinilsulfínilo, dibenzofuranilsulfínilo, benzoimidazolilsulfínilo, benzoisoxazolilsulfínilo, benzooxazolilsulfínilo, benzooxadiazolilsulfínilo, benzoisotiazolilsulfínilo, benzotiazolilsulfínilo, benzofurilsulfínilo, benzotienilsulfínilo, dibenzotienilsulfínilo y benzodioxolilsulfínilo, etc., se ilustran. Preferentemente furilsulfínilo, tienilsulfínilo, imidazolilsulfínilo, pirazolilsulfínilo, isotiazolilsulfínilo, isoxazolilsulfínilo, oxazolilsulfínilo, tiazolilsulfínilo, piridilsulfínilo, pirazinilsulfínilo, pirimidinilsulfínilo y 65 isotiazolilsulfínilo, etc.

piridazinilsulfonilo, etc.

El término "heteroarilsulfonilo" incluye un grupo en donde el sulfonilo está sustituido con un "heteroarilo" tal como se describe en el presente documento. Algunos ejemplos incluyen pirrolilsulfonilo, furilsulfonilo, tienilsulfonilo, imidazolilsulfonilo, pirazolilsulfonilo, isotiazolilsulfonilo, isoxazolilsulfonilo, oxazolilsulfonilo, tiazolilsulfonilo, piridilsulfonilo, pirazinilsulfonilo, pirimidinilsulfonilo, piridazinilsulfonilo, tetrazolilsulfonilo, oxadiazolilsulfonilo, tiadiazolilsulfonilo, indolizínilsulfonilo, isoindolilsulfonilo, indolilsulfonilo, indazolilsulfonilo, purínilsulfonilo, quinolínidínilsulfonilo, isoquinolilsulfonilo, quinolilsulfonilo, ftarazinilsulfonilo, naftilidínilsulfonilo, quinolanilsulfonilo, quinazolinilsulfonilo, cinnolinilsulfonilo, pteridinilsulfonilo, carbazolilsulfonilo, fenantridinilsulfonilo, acridinilsulfonilo, dibenzofuranilsulfonilo, benzoimidazolilsulfonilo, benzoisoxazolilsulfonilo, benzooxazolilsulfonilo, benzooxadiazolilsulfonilo, benzoisotiazolilsulfonilo, benzotiazolilsulfonilo, benzofurilsulfonilo, benzotienilsulfonilo, dibenzotienilsulfonilo y benzodioxolilsulfonilo, etc. Furilsulfonilo, tienilsulfonilo, imidazolilsulfonilo, pirazolilsulfonilo, isotiazolilsulfonilo, isoxazolilsulfonilo, oxazolilsulfonilo, tiazolilsulfonilo, piridilsulfonilo, pirazinilsulfonilo, pirimidinilsulfonilo y piridazinilsulfonilo son preferentes.

El término "heteroarilsulfonilo" incluye un grupo en donde un átomo de oxígeno está sustituido con un "heteroarilsulfonilo" tal como se describe en el presente documento. Algunos ejemplos incluyen pirrolilsulfonilo, furilsulfonilo, tienilsulfonilo, imidazolilsulfonilo, pirazolilsulfonilo, isotiazolilsulfonilo, isoxazolilsulfonilo, oxazolilsulfonilo, tiazolilsulfonilo, piridilsulfonilo, pirazinilsulfonilo, pirimidinilsulfonilo, piridazinilsulfonilo, tetrazolilsulfonilo, oxadiazolilsulfonilo, tiadiazolilsulfonilo, indolizínilsulfonilo, isoindolilsulfonilo, indolilsulfonilo, indazolilsulfonilo, purínilsulfonilo, quinolínidínilsulfonilo, isoquinolilsulfonilo, quinolilsulfonilo, ftarazinilsulfonilo, naftilidínilsulfonilo, quinolanilsulfonilo, quinazolinilsulfonilo, cinnolinilsulfonilo, pteridinilsulfonilo, carbazolilsulfonilo, fenantridinilsulfonilo, acridinilsulfonilo, dibenzofuranilsulfonilo, benzoimidazolilsulfonilo, benzoisoxazolilsulfonilo, benzooxazolilsulfonilo, benzooxadiazolilsulfonilo, benzoisotiazolilsulfonilo, benzotiazolilsulfonilo, benzofurilsulfonilo, benzotienilsulfonilo, dibenzotienilsulfonilo y benzodioxolilsulfonilo, etc., se ilustran. Preferentemente, furilsulfonilo, tienilsulfonilo, imidazolilsulfonilo, pirazolilsulfonilo, isotiazolilsulfonilo, isoxazolilsulfonilo, oxazolilsulfonilo, tiazolilsulfonilo, piridilsulfonilo, pirazinilsulfonilo, pirimidinilsulfonilo y piridazinilsulfonilo, etc.

La expresión "anillo carbocíclico aromático" incluye un anillo carbocíclico aromático monocíclico o aromático condensado. Algunos ejemplos incluyen un anillo de benceno, un anillo de naftaleno y un anillo de antraceno. Es preferente un anillo de benceno.

La expresión "anillo heterocíclico aromático" incluye un anillo heterocíclico aromático monocíclico o aromático condensado. Algunos ejemplos incluyen un anillo de pirrol, un anillo de furano, un anillo de tiofeno, un anillo de pirazol, un anillo de imidazol, un anillo de isotiazol, un anillo de isoxazol, un anillo de oxazol, un anillo de tiazol, un anillo de pirazina, un anillo de pirimidina, un anillo de piridazina, un anillo de tetrazol, un anillo de oxadiazol, un anillo de tiadiazol, un anillo de indolizina, un anillo de isoindol, un anillo de indol, un anillo de indazol, un anillo de purina, un anillo de quinolidina, un anillo de isoquinolina, un anillo de quinolina, un anillo de ftarazina, un anillo de naftiridina, un anillo de quinolano, un anillo de quinazolina, un anillo de cinnolina, un anillo de pteridina, un anillo de carbazol, un anillo de fenantridina, un anillo de acridina, un anillo de dibenzofurano, un anillo de benzoimidazol, un anillo de benzoisoxazol, un anillo de benzooxazol, un anillo de benzooxadiazol, un anillo de benzoisotiazol, un anillo de benzotiazol, un anillo de benzofurano, un anillo de benzotiofeno, un anillo de dibenzotiofeno y un anillo de benzodioxolano. Un anillo de piridina, un anillo de furano y un anillo de tiofeno son preferentes.

La expresión "alquileo C1-C6" incluye un grupo alquileo, lineal o ramificado, que tiene de uno a seis átomos de carbono. Algunos ejemplos incluyen  $-CH_2-$ ,  $-CH(CH_3)-$ ,  $-C(CH_3)_2-$ ,  $-CH_2CH_2-$ ,  $-CH(CH_3)CH_2-$ ,  $-C(CH_3)_2CH_2-$ ,  $-CH_2CH_2CH_2-$ ,  $-CH_2CH_2CH_2CH_2-$ ,  $-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-$ , y  $-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-$ . Son preferentes el  $-CH_2-$ ,  $-CH_2CH_2-$ ,  $-CH_2CH_2CH_2-$ , y  $-CH_2CH_2CH_2CH_2-$ .

La expresión "alquileo que contiene opcionalmente uno o dos heteroátomos" de "alquileo opcionalmente sustituido que contiene opcionalmente uno o dos heteroátomos" incluye un grupo alquileo, lineal o ramificado, que tiene de uno a seis átomos de carbono, que contiene opcionalmente uno o dos heteroátomos que pueden estar sustituidos con un "alquilo" tal como se describe en el presente documento. Algunos ejemplos incluyen  $-CH_2-$ ,  $-CH(CH_3)-$ ,  $-C(CH_3)_2-$ ,  $-CH_2CH_2-$ ,  $-CH_2CH_2CH_2-$ ,  $-CH_2CH_2CH_2CH_2-$ ,  $-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-$ ,  $-CH_2O-$ ,  $-OCH_2-$ ,  $-CH_2CH_2O-$ ,  $-OCH_2CH_2-$ ,  $-CH_2S-$ ,  $-SCH_2-$ ,  $-CH_2CH_2S-$ ,  $-SCH_2CH_2-$ ,  $-CH_2CH_2OCH_2CH_2-$ ,  $-OCH_2CH_2O-$ ,  $-OCH_2O-$ ,  $-NHCH_2-$ ,  $-N(CH_3)CH_2-$ ,  $-N^+(CH_3)_2CH_2-$ ,  $-NHCH_2CH_2CH_2-$ , y  $-N(CH_3)CH_2CH_2CH_2-$ , etc. Son preferentes el  $-CH_2-$ ,  $-CH_2CH_2-$ ,  $-CH_2CH_2CH_2-$ ,  $-CH_2CH_2CH_2CH_2-$ ,  $-OCH_2CH_2O-$ ,  $-OCH_2O-$ , y  $-N(CH_3)CH_2CH_2CH_2-$ .

La expresión "alquilenilo que contiene opcionalmente uno o dos heteroátomos" de "alquilenilo opcionalmente sustituido que contiene opcionalmente uno o dos heteroátomos" incluye un grupo alquilenilo, lineal o ramificado, que tiene de dos a seis átomos de carbono, que contiene opcionalmente uno o dos heteroátomos que pueden estar sustituidos con un "alquilo" tal como se describe en el presente documento. Algunos ejemplos incluyen  $-CH=CH=CH-$ ,  $-CH=CHO-$ ,  $-OCH=CH-$ ,  $-CH=CHS-$ ,  $-SCH=CH-$ ,  $-CH=CHNH-$ ,  $-NHCH=CH-$ ,  $-CH=CH-CH=N-$ , y  $-N=CH-CH=CH-$ . Son preferentes,  $-CH=CHCH=CH-$ ,  $-CH=CHCH=N-$ , y  $-N=CHCH=CH-$ .



5 sustituido", "arilsulfinilo opcionalmente sustituido", "arilsulfonilo opcionalmente sustituido", "arilsulfoniloxi  
 opcionalmente sustituido", "heteroarilo opcionalmente sustituido", "heteroariloxi opcionalmente sustituido",  
 "heteroarilitio opcionalmente sustituido", "heteroarilsulfinilo opcionalmente sustituido", "heteroarilsulfinilo  
 10 opcionalmente sustituido", "heteroarilsulfoniloxi opcionalmente sustituido", "grupo heterocíclico no aromático  
 opcionalmente sustituido", "piperazin-1,4-diilo opcionalmente sustituido", "piperazin-1,4-diilo sustituido", "areno C6-  
 1,4-diamin-N<sup>1</sup>,N<sup>4</sup>-diilo opcionalmente sustituido", y "areno C6-1,4-diamina-N<sup>1</sup>,N<sup>4</sup>-diilo sustituido", incluyen alquilo  
 opcionalmente sustituido con un grupo sustituyente D en de una a tres posiciones, oxo, cicloalquilo, alquenilo, alquinilo,  
 hidroxilo, alquiloxi opcionalmente sustituido con un grupo sustituyente A en de una a tres posiciones, ariloxi (por ejemplo,  
 fenoxi) opcionalmente sustituido con un grupo sustituyente B en de una a tres posiciones, mercapto, alquiltio, un átomo  
 15 de halógeno, nitro, ciano, carboxi, alquiloxicarbonilo, acilo, alquilsulfinilo, amino opcionalmente sustituido, carbamoilo  
 opcionalmente sustituido, arilo (por ejemplo, fenilo) opcionalmente sustituido con un grupo sustituyente B en de una a  
 tres posiciones, heteroarilo (por ejemplo, piridilo, furilo, tienilo, imidazolilo, oxazolilo, tiazolilo, pirazolilo) opcionalmente  
 sustituido con un grupo sustituyente C en de una a tres posiciones, un grupo heterocíclico no aromático (por ejemplo,  
 morfolinilo, pirrolidinilo, piperazinilo) opcionalmente sustituido con un grupo sustituyente C en de una a tres posiciones,  
 20 y similares. Los restos "opcionalmente sustituidos" mencionados anteriormente pueden estar sustituidos con uno o  
 más de los sustituyentes mencionados anteriormente en cualquier posición posible.

20 El grupo sustituyente A está compuesto por un átomo de halógeno y fenilo opcionalmente sustituido con de uno a tres  
 sustituyentes seleccionados entre el grupo sustituyente B.

El grupo sustituyente B está compuesto por un átomo de halógeno, alquilo, alquiloxi, ciano, y nitro.

El grupo sustituyente C está compuesto por un átomo de halógeno y alquilo.

25 El grupo sustituyente D está compuesto por un átomo de halógeno y alquiloxi.

En compuestos en los que R<sup>2</sup> es un par de electrones, el oxígeno tiene carga negativa y puede formar una sal con un  
 catión.

30 En algunos compuestos, el R<sup>3</sup> en al menos 1, al menos 2, al menos 3 de A<sup>1</sup>, A<sup>2</sup>, A<sup>3</sup>, A<sup>4</sup> y A<sup>5</sup> es un átomo de hidrógeno  
 o alquilo C1-C6.

35 En el curso de los métodos de la presente invención, se puede administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de  
 los compuestos de la invención a un animal, incluidos mamíferos y seres humanos, de muchas formas. Aunque en la  
 realización preferente, los compuestos de la invención se administran por vía oral, vía parenteral o vía tópica, también  
 se contemplan otras formas de administración tales como a través de compuestos médicos o aerosoles.

40 Para administración oral, la cantidad eficaz de compuestos se puede administrar en, por ejemplo, un estado sólido,  
 semisólido, líquido o gaseoso. Ejemplos específicos incluyen un comprimido, cápsula, polvo, gránulo, solución,  
 suspensión, jarabe y agentes elixires. Sin embargo, los compuestos no se limitan a estas formas.

45 Para formular los compuestos de la invención en comprimidos, cápsulas, polvos, gránulos, soluciones o suspensiones,  
 el compuesto se mezcla preferentemente con un aglutinante, un agente disgregante y/o un lubricante. Si es necesario,  
 la composición resultante se puede mezclar con un diluyente, un tampón, un agente infiltrante, un conservante y/o un  
 estabilizante, usando métodos conocidos. Ejemplos del aglutinante incluyen celulosa cristalina, derivados de celulosa,  
 almidón de maíz, ciclodextrinas y gelatina. Ejemplos del agente disgregante incluyen almidón de maíz, almidón de  
 patata y carboximetilcelulosa sódica. Ejemplos del lubricante incluyen talco y estearato de magnesio. Por otra parte,  
 aditivos, que se han usado convencionalmente, tales como lactosa y manitol, también pueden usarse.

50 Para administración parenteral, los compuestos de la invención se pueden administrar por vía rectal o mediante  
 inyección. Para administración rectal, se puede usar un supositorio. El supositorio se puede preparar mezclando los  
 compuestos de la presente invención con un excipiente farmacéuticamente adecuado que se funde a la temperatura  
 corporal pero que permanece sólido a temperatura ambiente. Algunos ejemplos incluyen, pero sin limitación, manteca  
 de cacao, cera de carbón y polietilenglicol. La composición resultante se puede moldear en cualquier forma deseada  
 55 usando métodos conocidos en el campo.

60 Para administración mediante inyección, los compuestos de la presente invención se pueden inyectar por vía  
 hipodérmica, por vía intracutánea, vía intravenosa o vía intramuscular. Los medicamentos para dicha inyección se  
 pueden preparar disolviendo, suspendiendo o emulsionando los compuestos de la invención en un disolvente acuoso  
 o no acuoso tal como aceite vegetal, glicérido de ácido de resina sintética, éster de ácido graso superior, o  
 propilenglicol mediante un método conocido. Si se desea, aditivos tales como un agente solubilizante, un agente  
 osmorregulador, un emulsionante, un estabilizante o un conservante, que se ha usado convencionalmente, también  
 se pueden añadir. Aunque no es necesario, es preferente que la composición sea estéril o esterilizada.

65 Para formular los compuestos de la invención en suspensiones, jarabes o elixires, se puede usar un disolvente  
 farmacéuticamente adecuado. Entre estos se incluye el ejemplo no limitante del agua.

- 5 Para administración tópica, las formulaciones tópicas pueden estar en forma de gel, crema, loción, líquido, emulsión, pomada, pulverización, solución, suspensión y parches. Ingredientes inactivos en las formulaciones tópicas incluyen, por ejemplo, pero sin limitación, lactato de Laurilo (emoliente/potenciador de la permeación), monoetiléter de dietilenglicol (emoliente/potenciador de la permeación), DMSO (potenciador de la solubilidad), elastómero de silicona (modificador de reología/textura), triglicérido caprílico/cáprico, (emoliente), octisalato, (emoliente/filtro de UV), fluido de silicona (emoliente/diluyente), escualeno (emoliente), aceite de girasol (emoliente) y dióxido de silicona (agente espesante).
- 10 Los compuestos de la invención también se pueden usar junto con un compuesto adicional que tenga otra actividad farmacéuticamente adecuada para preparar un fármaco. Un fármaco, que contiene un compuesto de la invención como un compuesto independiente o como parte de una composición, puede usarse en el tratamiento de sujetos que lo necesiten.
- 15 Los compuestos de la invención también se pueden administrar en forma de aerosol o inhalante preparado cargando los compuestos en forma de líquido o polvo fino, junto con un agente de pulverización gaseoso o líquido y, si es necesario, un agente auxiliar conocido tal como un agente de inflado, en un recipiente no presurizado tal como un recipiente de aerosol o un nebulizador. Un gas presurizado de, por ejemplo, diclorofluorometano, propano o nitrógeno se puede usar como agente de pulverización.
- 20 Los compuestos de la invención se pueden administrar a un animal, incluidos mamíferos y seres humanos, que los necesiten como una composición farmacéutica, tal como comprimidos, cápsulas, soluciones o emulsiones. La administración de otras formas de los compuestos descritos en esta invención, que incluyen, pero sin limitación, ésteres de estos, sales farmacéuticamente adecuadas de estos, metabolitos de estos, compuestos estructuralmente relacionados de estos, análogos de estos y combinaciones de estos, en una sola dosis o en dosis múltiples, también
- 25 están contemplados por la presente invención.
- Los compuestos de la invención también se pueden administrar a un animal que los necesite como aditivo nutricional, ya sea como alimento o como suplemento nutracéutico.
- 30 Las expresiones "que previene", "que trata", o "que mejora", y expresiones similares usadas en el presente documento, incluyen la profilaxis y el tratamiento total o parcial. Las expresiones también pueden incluir la reducción de los síntomas, la mejora de los síntomas, la reducción de la gravedad de los síntomas, la reducción de la incidencia de la enfermedad, o cualquier otro cambio en el estado del paciente, lo que mejora el resultado terapéutico.
- 35 Los compuestos descritos en esta invención se usan y/o administran preferentemente en forma de una composición. Las composiciones adecuadas son, preferentemente, una composición farmacéutica, un alimento o un suplemento alimenticio. Estas composiciones proporcionan una forma conveniente de administrar los compuestos. Las composiciones de la invención pueden comprender un antioxidante en una cantidad eficaz para aumentar la estabilidad de los compuestos con respecto a la oxidación o la solubilidad.
- 40 La cantidad de compuesto que se administra en el método de la invención o que es para administrar en el uso de la invención es cualquier cantidad adecuada. Preferentemente es de 1 ng/kg de peso corporal a 20 g/kg de peso corporal, más preferentemente en el intervalo de 1 µg/kg de peso corporal a 1 g/kg de peso corporal, tal como de 1 mg/kg de peso corporal a 100 mg/kg de peso corporal del compuesto al día. De acuerdo con esto, se pueden formular
- 45 composiciones adecuadas. Los expertos en la técnica de la dosificación de agentes biológicamente activos podrán desarrollar pautas posológicas particulares para diversos sujetos basándose en parámetros conocidos y bien comprendidos.
- 50 Una composición preferente de acuerdo con la invención es una composición farmacéutica, tal como en forma de comprimidos, píldoras, cápsulas, comprimidos oblongos, multiparticulados (incluidos gránulos, perlas, pellets y partículas microencapsuladas), polvos, elixires, jarabes, suspensiones y soluciones. Las composiciones farmacéuticas normalmente comprenderán un diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable. Las composiciones farmacéuticas preferentemente están adaptadas para la administración por vía parenteral u oral. Las composiciones administrables por vía oral pueden estar en forma sólida o líquida y pueden estar en forma de comprimidos, polvos, suspensiones y jarabes, entre otras cosas. Opcionalmente, las composiciones comprenden uno o más agentes saborizantes y/o
- 55 colorantes. En general, las composiciones terapéuticas y nutricionales pueden comprender cualquier sustancia que no interfiera significativamente con la acción de los compuestos en el sujeto.
- 60 Los vehículos farmacéuticamente aceptables adecuados para su uso en tales composiciones son bien conocidos en la técnica farmacéutica. Las composiciones de la invención pueden contener un 0,01-99 % en peso de los compuestos de la invención. Las composiciones de la invención se preparan generalmente en una forma farmacéutica unitaria. Preferentemente, la dosis unitaria de los compuestos descritos en la presente invención es de 0,1 mg a 2000 mg, más preferentemente de 50 mg a 1000 mg. Los excipientes utilizados en la preparación de estas composiciones son los excipientes conocidos en la técnica.
- 65 Otros ejemplos de formas de productos para la composición son los suplementos alimenticios, tal como en forma de

un gel blando o una cápsula dura que comprende un material encapsulante seleccionado entre el grupo que consiste en gelatina, almidón, almidón modificado, derivados del almidón tales como glucosa, sacarosa, lactosa y fructosa. El material encapsulante puede contener opcionalmente agentes reticulantes o polimerizantes, estabilizantes, antioxidantes, agentes absorbentes de luz para proteger rellenos sensibles a la luz, conservantes, y similares.

5 Preferentemente, la dosis unitaria de los compuestos descritos en la presente invención es de 0,1 mg a 2000 mg, más preferentemente de 50 mg a 1000 mg.

En general, el término "vehículo" se puede usar a lo largo de esta solicitud para representar una composición con la que se pueden mezclar los compuestos descritos, ya sea un vehículo farmacéutico, producto alimenticio, suplemento nutricional o auxiliar dietético. Los materiales descritos anteriormente pueden considerarse vehículos para los fines de la invención. En determinadas realizaciones de la invención, el vehículo tiene poca o ninguna actividad biológica sobre los compuestos de la invención.

10

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

15

Por ejemplo, una cantidad de un compuesto eficaz para tratar o prevenir la diabetes de tipo 1, lupus, colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn, inflamación gastrointestinal o cualquier otra afección descrita en el presente documento en un animal puede variar de 1 ng/kg/día a 20 g/kg/día. Una cantidad eficaz preferente de compuesto es de 50 µg/kg/día a 5 g/kg/día, siendo una dosis más preferente de 1 a 100 mg/kg/día. La cantidad eficaz de compuesto es más eficaz para tratar o prevenir la diabetes de tipo 1, lupus, colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn, inflamación gastrointestinal, o cualquier otra afección descrita en el presente documento de un animal cuando se administra a un animal durante periodos que varían de aproximadamente 1 a 1000 días, con un periodo preferente de 7 a 300 días, y un periodo más preferente de 30 a 90 días, por lo que "más eficaz" se define como la identificación de la inducción de respuestas beneficiosas. La cantidad eficaz de compuesto puede continuarse más allá de estos periodos para el mantenimiento de respuestas beneficiosas en enfermedades crónicas.

20

25

La cantidad de compuesto más eficaz para prevenir la sobreactivación del sistema inmunitario puede variar de 1 ng/kg/día a 20 g/kg/día, con una dosis preferente de 1 a 100 mg/kg/día.

30

Cuando la cantidad eficaz del compuesto de la presente invención se administra en una composición nutricional, terapéutica, médica o veterinaria, la dosis preferente varía de aproximadamente el 0,01 al 2,0 % p/p del alimento o producto nutracéutico.

35

En determinadas realizaciones diferentes, la presente invención proporciona el uso de los compuestos descritos en el presente documento en el tratamiento y la prevención de la diabetes de tipo 1, lupus, EII e inflamación del tracto gastrointestinal.

40

Adicionalmente, en general, la presente invención se refiere a la inhibición o la activación de la inflamación de forma sistémica, en donde los componentes relevantes incluyen el páncreas, el bazo, el pulmón, el corazón, el sistema nervioso central, las articulaciones, el hígado, los riñones o en el tracto gastrointestinal, en donde los componentes relevantes incluyen el esófago, el estómago, el intestino delgado, el intestino ciego, el intestino grueso y el recto. El efecto resulta de la exposición del compuesto a varios tipos de células del cuerpo que induce un efecto biológico. Las células pueden incluir aquellas de tejidos del tracto gastrointestinal, células inmunitarias (es decir, macrófagos, monocitos, linfocitos), células de los islotes pancreáticos, células endoteliales, neuronas o células epiteliales. En determinadas realizaciones, la invención proporciona el tratamiento de sujetos con un compuesto de la invención, por ejemplo como suplemento dietético, para reducir o prevenir la inflamación relacionada con la diabetes de tipo 1, lupus o enfermedad inflamatoria intestinal, ya sea enfermedad de Crohn o colitis ulcerosa.

45

50

Cuando se ponen en práctica, los métodos de la invención pueden ser mediante la administración de los compuestos a un sujeto por cualquier vía de administración aceptable usando cualquier forma aceptable, tal como se describe anteriormente, y permitir que el cuerpo del sujeto distribuya los compuestos a la célula diana a través de procesos naturales. Tal como se ha descrito anteriormente, la administración también puede ser mediante inyección directa en un sitio (por ejemplo, órgano, tejido) que contiene una célula diana (es decir, una célula que se va a tratar).

55

Además, la administración puede seguir cualquier número de pautas terapéuticas. Por lo tanto, puede comprender una única dosis o dosificación del compuesto experimental, o múltiples dosis o dosificaciones durante un periodo de tiempo. De acuerdo con esto, el tratamiento puede comprender repetir la etapa de administración una o más veces hasta conseguir el resultado deseado. En determinadas realizaciones, el tratamiento puede continuar durante periodos prolongados de tiempo, tales como semanas, meses o años. Las pautas posológicas pueden implicar preferentemente la administración del compuesto entre 6 veces al día y una vez por semana, con una pauta más preferente de entre tres veces al día y una vez al día. Los expertos en la técnica son totalmente capaces de desarrollar fácilmente pautas posológicas adecuadas para individuos basándose en parámetros conocidos en la técnica. Las cantidades de dosificación para los compuestos de la invención se pueden usar en los métodos de estas realizaciones de la

60

65

invención. Para el tratamiento de la diabetes de tipo 1, lupus o EII, es preferente que los compuestos se administren en cantidades de aproximadamente 10 ng/día a 10 g/día.

- 5 La cantidad que se va a administrar variará dependiendo del sujeto, estadio de la enfermedad o trastorno, edad del sujeto, salud general del sujeto, y varios otros parámetros conocidos y tomados en consideración de manera rutinaria por aquellos con experiencia en las técnicas médicas. Como cuestión general, se administrará una cantidad suficiente de compuesto para realizar un cambio detectable en la cantidad de inflamación en el páncreas, tracto gastrointestinal o sistémicamente. La reducción de la inflamación puede estar relacionada con la cantidad de dolor que experimenta el sujeto, la insulina, los anticuerpos contra el antígeno nuclear, los niveles de TNF $\alpha$  o proteína C reactiva en la sangre, el porcentaje de linfocitos T reguladores en la sangre o la concentración de calprotectina en las heces. En el presente documento se divulgan cantidades adecuadas, y los expertos en la técnica pueden identificar cantidades adecuadas adicionales sin experimentación indebida o excesiva, basándose en las cantidades divulgadas en el presente documento.
- 10
- 15 Debería ser evidente que la presente invención proporciona una terapia con compuestos de unión a LANCL2 para su uso en células en contacto, tal como en el tratamiento de células de un sujeto. El análisis anterior se centra en el uso de los compuestos de la presente invención como parte de una composición para uso en lo que generalmente podría considerarse un entorno farmacéutico o médico.
- 20 Los compuestos descritos en esta invención para el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias que incluyen la diabetes de tipo 1, lupus eritematoso sistémico, EII, síndrome de Sjögren y otras afecciones descritas en el presente documento, pueden formularse como una composición farmacéutica, composición nutricional, composición alimentaria funcional o auxiliar dietético, tal como se ha descrito anteriormente con mayor detalle.
- 25 Como alternativa o además de los métodos de tratamiento de afecciones mediante la administración directa de los compuestos, las condiciones se pueden tratar con células preparadas generadas a partir de células precursoras con los compuestos.
- 30 La expresión "célula precursora" se usa en el presente documento para referirse en general a cualquier célula que sirva como célula de partida que se trata para generar una célula preparada. La célula puede ser una célula corriente arriba en un linaje de diferenciación que lleva a la célula preparada, tal como una célula madre, una célula progenitora, o una "célula precursora" (como se usa el término en la técnica para referirse a un intermedio entre una célula madre y una célula diferenciada) con, por ejemplo, propiedades totipotentes, multipotentes o unipotentes, aunque no necesariamente tiene que ser así. De acuerdo con esto, en algunas versiones, la generación de la célula preparada a partir de la célula precursora implica diferenciar la célula precursora en la célula preparada. En otras versiones, la generación de la célula preparada a partir de la célula precursora implica simplemente inducir cambios tales como cambios en la expresión génica.
- 35
- 40 Las células preparadas se pueden generar a partir de células precursoras poniendo en contacto las células precursoras *in vitro* con uno o más de los compuestos de la invención para generar de este modo las células preparadas. Las expresiones "*in vitro*" y "*ex-vivo*" se utilizan indistintamente en este documento en contraste con "*in vivo*" y se refieren a un estado de estar fuera de un organismo vivo.
- 45 Las células precursoras y/o preparadas de la invención pueden comprender células inmunitarias. Células inmunitarias ilustrativas incluyen granulocitos, mastocitos, monocitos, macrófagos, neutrófilos, células dendríticas, linfocitos citolíticos naturales, linfocitos T y linfocitos B, entre otros. Granulocitos ilustrativos incluyen basófilos, eosinófilos y neutrófilos.
- 50 Las células precursoras y/o preparadas de la invención pueden comprender glóbulos blancos (leucocitos). Glóbulos blancos ilustrativos incluyen neutrófilos, eosinófilos (acidófilos), basófilos, linfocitos y monocitos.
- 55 Las células precursoras y/o preparadas de la invención pueden comprender células mononucleares de sangre periférica (PBMC) o células mononucleares de la lámina propia (LPMC). PBMC y LPMC ilustrativas incluyen linfocitos (linfocitos T, linfocitos B, células NK) y monocitos.
- 60 Los linfocitos T se dividen en dos extensas categorías: linfocitos T CD8+ o linfocitos T CD4+, según qué proteína esté presente en la superficie de la célula. Los linfocitos T llevan a cabo múltiples funciones, que incluyen destruir células infectadas y activar o reclutar otras células inmunitarias. Los linfocitos T CD8+ se denominan también linfocitos T citotóxicos o linfocitos T citotóxicos (CTL). Son cruciales para reconocer y eliminar células infectadas por virus y células cancerosas. Los principales subconjuntos de linfocitos T CD4+ son linfocitos T CD4+ vírgenes, linfocitos TH1, linfocitos TH2, linfocitos TH17 y linfocitos Treg, en donde "TH" se refiere a "linfocito T auxiliar". Los linfocitos T CD4+ vírgenes son linfocitos T que no se diferencian en ninguno de los linfocitos TH1, linfocitos TH2, linfocitos TH17 y linfocitos Treg. Los linfocitos T reguladores (Treg) controlan e inhiben la actividad de otros linfocitos T. Previenen la activación inmunitaria adversa y mantienen la tolerancia, o la prevención de respuestas inmunitarias contra las propias células y antígenos del cuerpo.
- 65 En algunas versiones, las células precursoras comprenden linfocitos T CD4+ vírgenes y las células preparadas

comprenden linfocitos Treg.

Generar las células preparadas a partir de las células precursoras puede comprender poner en contacto una cantidad de uno o más compuestos de la invención durante un tiempo eficaz para inducir una diferencia dependiente del compuesto en las células preparadas con respecto a las células precursoras. Tal como se usa en el presente documento, "diferencia dependiente del compuesto" se refiere a una diferencia en la célula preparada con respecto a la célula precursora que surge del contacto de la célula precursora con uno o más compuestos de la invención. Las diferencias dependientes de los compuestos se pueden determinar poniendo en contacto las células con medios en presencia o ausencia de uno o más compuestos de la invención, en donde las diferencias dependientes del compuesto son características que aparecen sólo con las células en contacto con el medio en presencia del uno o más compuestos de la invención. Las diferencias dependientes de los compuestos pueden ser diferencias no sólo de tipo sino también de grado.

La diferencia dependiente del compuesto en las células preparadas puede incluir una diferencia en la expresión génica. A menos que se indique específicamente lo contrario, "expresión génica" se utiliza ampliamente en el presente documento para referirse a cualquiera o la totalidad de la transcripción o traducción. Así, una diferencia en la expresión génica puede ser una diferencia en la producción de ARNm, una diferencia en la producción de proteínas, o ambas. A menos que se indique específicamente lo contrario, el gen que tiene expresión diferencial puede identificarse en el presente documento haciendo referencia a la proteína producida a partir del gen (por ejemplo, FOXP3) o haciendo referencia al propio gen (por ejemplo, *Lag3*). En varias versiones de la invención, las diferencias dependientes del compuesto en la expresión génica pueden comprender uno o más de un aumento de la expresión de IL-10 o uno de sus ortólogos, un aumento de la expresión de FOXP3 o uno de sus ortólogos, una disminución de la expresión de TNF $\alpha$  o uno de sus ortólogos, una disminución de la expresión de IFN $\gamma$  o uno de sus ortólogos, una disminución de la expresión de Tbet o uno de sus ortólogos, un aumento de la expresión de *Lag3* o uno de sus ortólogos, un aumento de la expresión de *Socs2* o uno de sus ortólogos, un aumento de la expresión de *Irf7* o uno de sus ortólogos, un aumento de la expresión de *P2rx7* o uno de sus ortólogos, un aumento de la expresión de *Capn3* o uno de sus ortólogos, un aumento de la expresión de *Ikzf2* o uno de sus ortólogos, un aumento de la expresión de *Stat5a* o uno de sus ortólogos, un aumento de la expresión de *Pten* o uno de sus ortólogos, un aumento de la expresión de *Foxo1* o uno de sus ortólogos, y/o un aumento de la expresión de *Phlpp1* o uno de sus ortólogos. Los ortólogos pueden incluir ortólogos en especies animales. Los ortólogos pueden incluir ortólogos en especies de mamíferos. Los ortólogos (tales como los genes de ratón mencionados anteriormente) pueden incluir ortólogos en primates. Los ortólogos (tales como los genes de ratón mencionados anteriormente) pueden incluir ortólogos en humanos.

La diferencia dependiente del compuesto en las células preparadas puede incluir otras diferencias detectables, tal como un aumento de la fosforilación de STAT5a o uno de sus ortólogos, un aumento de la fosforilación de FOXO1 o uno de sus ortólogos, y/o un aumento de la actividad de piruvato cinasa.

En la generación de células preparadas, las células precursoras pueden ponerse en contacto con cantidades del compuesto de aproximadamente 100 nM, aproximadamente 10 nM, aproximadamente 1 nM o inferior a aproximadamente 1  $\mu$ M, aproximadamente 10  $\mu$ M, aproximadamente 100  $\mu$ M, aproximadamente 1 mM o superior. Las células precursoras pueden ponerse en contacto con el compuesto durante un tiempo de aproximadamente 12 horas, 6 horas, 1 hora, aproximadamente 30 minutos, o menos de aproximadamente 24 horas, aproximadamente 48 horas, aproximadamente 72 horas o más.

En algunas versiones, las PBMC o LPMC en general se ponen en contacto con el compuesto de la invención. Las PBMC o LPMC se pueden aislar de un animal. En algunas versiones, subtipos de las PBMC o LPMC, tales como linfocitos T, se pueden aislar de las PBMC o LPMC y ponerlas en contacto después con el compuesto de la invención. En algunas versiones, las PBMC o LPMC se ponen en contacto con el compuesto de la invención, y después subtipos de células, tales como linfocitos T o un tipo particular de linfocitos T, se aíslan a partir de ellas. Los métodos para aislar las PBMC, las LPMC y sus subtipos son conocidos en la técnica. Véanse, por ejemplo, Majowicz *et al.* 2012 (Majowicz A, van der Marel S, te Velde AA, Meijer SL, Petry H, van Deventer SJ, Ferreira V. "Murine CD4+CD25-cells activated *in vitro* with PMA/ionomycin and anti-CD3 acquire regulatory function and ameliorate experimental colitis *in vivo*". *BMC Gastroenterol.* 3 de diciembre de 2012; 12: 172) y Canavan *et al.* 2016 (Canavan JB, Scottà C, Vossenkämper A, Goldberg R, Elder MJ, Shoval I, Marks E, Stolarczyk E, Lo JW, Powell N, Fazekasova H, Irving PM, Sanderson JD, Howard JK, Yagel S, Afzali B, MacDonald TT, Hernandez-Fuentes MP, Shpigel NY, Lombardi G, Lord GM. "Developing *in vitro* expanded CD45RA+ regulatory T cells as an adoptive cell therapy for Crohn's disease". *Gut.* abril de 2016; 65 (4): 584-94). Subconjuntos de PMBC, por ejemplo, se pueden aislar con anticuerpos anti-CD3 y anticuerpos anti-CD28. Los anticuerpos anti-CD3 y los anticuerpos anti-CD28 se pueden proporcionar en forma de perlas anti-CD3/anti-CD28, tales como el activador T humano CD3/CD28 DYNABEADS<sup>®</sup> de ThermoFisher Scientific (Waltham, MA).

La generación de las células preparadas puede comprender diferenciar las células preparadas a partir de las células precursoras. Por ejemplo, células preparadas tales como linfocitos Treg se pueden diferenciar de células precursoras tales como linfocitos T CD4+vírgenes. Tal diferenciación puede comprender poner en contacto las células precursoras con factores de diferenciación además de uno o más de los compuestos de la invención. Varios factores diferenciadores pueden incluir ácido todo-trans-retinoico, TGF- $\beta$ , acetato miristato de forbol, ionomicina, rapamicina y/o IL-2. En algunas versiones, la diferenciación puede comprender expandir la proporción de linfocitos Treg en las

células preparadas con respecto a la porción en las células precursoras.

Las células precursoras y preparadas de la invención pueden ser células aisladas. El término "aislado" o "purificado" significa un material que se retira de su entorno original, por ejemplo, el entorno natural. Se dice que un material está "purificado" cuando está presente en una composición particular en una concentración mayor o menor que la concentración que existe antes de la etapa o etapas de purificación.

El tratamiento de la afección con las células preparadas de la invención puede comprender administrar las células al animal en una cantidad suficiente para tratar la afección. Las células preparadas se pueden administrar usando cualquier vía o método descrito anteriormente para los compuestos, que incluyen la vía parenteral o enteral. Formas no limitantes de administración parenteral incluyen inyección o infusión. Las células preparadas se pueden inyectar o infundir directamente en el torrente sanguíneo u otras partes del cuerpo. Formas no limitantes de administración enteral incluyen administración oral y rectal, de modo que las células preparadas entren en el tracto gastrointestinal. Las células preparadas pueden ser autólogas con respecto al animal tratado (es decir, generadas a partir de una célula tomada del mismo animal en el que se usará la célula preparada para su tratamiento) o heterólogas con respecto al animal tratado (es decir, generadas a partir de un animal diferente del animal en el que se usará la célula preparada para su tratamiento). Una célula preparada tal como se describe anteriormente se puede usar en un método para tratar cualquiera de las afecciones descritas en el presente documento. Afecciones ilustrativas incluyen la inflamación intestinal. Tipos ilustrativos de inflamación intestinal incluyen la enfermedad inflamatoria intestinal. Tipos ilustrativos de enfermedad inflamatoria intestinal incluyen la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa.

En una realización de la invención, el método para tratar enfermedades inmunometabólicas comprende el tratamiento sin causar efectos secundarios discernibles, tales como un aumento significativo de peso, inmunodepresión sistémica, aspecto cushingoide, osteopenia/osteoporosis, toxicidad celular o pancreatitis que es común en los tratamientos actualmente disponibles (es decir, estatinas, antibióticos, corticoesteroides, doxorubicina, metotrexato). Esto es, se ha descubierto que el método de tratamiento de acuerdo con la presente invención, que proporciona el efecto del tratamiento, al menos en parte, al afectar la expresión y/o activación de LANCL2 y/u otras vías inmunometabólicas en algunas células, proporciona el efecto beneficioso sin provocar un aumento significativo de peso, por ejemplo por retención de líquidos, en el sujeto que se está tratando, en comparación con otros sujetos similares que no recibieron el tratamiento.

Como tales, los métodos inmunometabólicos de la presente invención pueden proporcionar tratamientos para reducir la inflamación al afectar el metabolismo de las células inmunitarias. Los métodos pueden reducir la inflamación de forma sistémica (es decir, en todo el cuerpo del sujeto) o localmente (por ejemplo, en el sitio de administración o en el sitio de las células inflamatorias, incluidos, pero sin limitación, linfocitos T y macrófagos). En el tratamiento o prevención de la inflamación mediante el inmunometabolismo, un efecto que se puede observar es un cambio en el metabolismo de la glucosa. En particular, el cambio puede deberse a la producción de lactato a partir de piruvato hacia la entrada en el ciclo del ácido tricarbóxico que está relacionado con acciones inmunoinflamatorias. De manera más específica, este cambio en el metabolismo puede asociarse a un aumento en la proporción de CD4+ CD25+ FOXP3+ u otros linfocitos T CD4+ reguladores en relación con los linfocitos T CD4+ efectores tales como los linfocitos Th17 IL17+ o los linfocitos Th1 IFN $\gamma$ +. Otro efecto observado puede ser la disminución de la proliferación celular resultante de la combinación de una disminución del metabolismo anaeróbico y un aumento de las vías del punto de control inmunitario. Otro efecto de los cambios en el metabolismo desencadenados terapéuticamente puede ser la disminución de la expresión de quimiocinas inflamatorias tales como MCP-1, IL-8 o CXCL9 resultante de una alteración del procesamiento y almacenamiento de ácidos grasos. Por lo tanto, los métodos también pueden considerarse métodos para afectar o alterar la respuesta inmunitaria de un sujeto al que se administra la terapia, interceptando así la inflamación, enfermedad y patología.

La invención proporciona métodos para inhibir la inflamación en el tracto gastrointestinal, en donde los componentes relevantes incluyen el estómago, el intestino delgado, el intestino grueso y el recto.

La invención proporciona métodos de tratamiento o prevención de un sujeto que padece EII, o de individuos por lo demás sanos, tal vez con una predisposición genética a la enfermedad de Crohn o la colitis ulcerosa, de desarrollar EII. Los métodos también pueden implicar el tratamiento de personas con una forma remitiva de la EII. De acuerdo con la invención, la expresión "un sujeto que padece EII" se usa para referirse a un sujeto (por ejemplo, animal, humano) que padece una enfermedad o trastorno que muestra uno o más signos clínicos típicos de la EII. En general, el método de tratamiento o prevención de acuerdo con este aspecto de la invención comprende administrar al sujeto una cantidad de compuesto o terapia celular que es eficaz para tratar o prevenir uno o más síntomas o manifestaciones clínicas de la EII, o para prevenir el desarrollo de tales síntomas o manifestaciones.

Así, de acuerdo con los métodos de la invención, la invención puede proporcionar métodos de tratamiento de la EII, inflamación asociada a infección entérica e inflamación asociada a enfermedades autoinmunitarias. Los métodos de tratamiento pueden ser métodos profilácticos. En determinadas realizaciones, el método es un método para tratar la EII, inflamación asociada a infección entérica e inflamación asociada a enfermedades autoinmunitarias. En otras realizaciones, el método es un método para prevenir la EII. En realizaciones, el método es un método para prevenir que una forma remitiva de la EII se vuelva activa. En otras realizaciones adicionales, el método es un método para

mejorar el estado de salud de un sujeto que padece EI, inflamación asociada a infección entérica e inflamación asociada a enfermedades autoinmunitarias. Organismos que causan infecciones gastroentéricas incluyen, pero sin limitación, *Escherichia coli*, *Shigella*, *Salmonella*, *Vibrios* patógeno, *Campylobacter jejuni*, *Yersinia enterocolitica*, *Toxoplasma gondii*, *Entamoeba histolytica* y *Giardia lamblia*. De acuerdo con esto, en determinadas realizaciones, la invención proporciona un método para proteger la salud, los órganos y/o los tejidos de un sujeto que padece EI, inflamación asociada a infección entérica e inflamación asociada a enfermedades autoinmunitarias o con riesgo de desarrollar EI, inflamación asociada a infección entérica e inflamación asociada a enfermedades autoinmunitarias.

En una realización de la invención, el método para tratar la EI comprende tratar la EI sin causar efectos secundarios discernibles, tales como un aumento significativo de peso, inmunodepresión sistémica, aspecto cushingoide, osteopenia/osteoporosis o pancreatitis que es común en los tratamientos para la EI actualmente disponibles (es decir, corticosteroides, inhibidores del factor de necrosis tumoral alfa). Esto es, se ha descubierto que el método de tratamiento de acuerdo con la presente invención, que proporciona el efecto del tratamiento, al menos en parte, al afectar la expresión y/o activación de LANCL2 en algunas células, proporciona el efecto beneficioso sin provocar un aumento significativo de peso, por ejemplo por retención de líquidos, en el sujeto que se está tratando, en comparación con otros sujetos similares que no recibieron el tratamiento.

Como tales, los métodos de la presente invención pueden proporcionar métodos para reducir la inflamación. Los métodos pueden reducir la inflamación de forma sistémica (es decir, en todo el cuerpo del sujeto) o localmente (por ejemplo, en el sitio de administración o en el sitio de las células inflamatorias, incluidos, pero sin limitación, linfocitos T y macrófagos). En el tratamiento o prevención de la inflamación de acuerdo con los métodos de la presente invención, un efecto que se puede observar es la disminución del número de monocitos o macrófagos sanguíneos y de linfocitos que se infiltran en el intestino. Otro puede ser el aumento de las poblaciones de células inmunitarias reguladoras, tales como linfocitos T reguladores CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>, o un aumento en las propiedades reguladoras de linfocitos o macrófagos (por ejemplo, un aumento de interleucina 4 (IL-4) o IL-10 o una disminución de TNF- $\alpha$  e IL-6). Otro puede ser la menor presencia de genes inflamatorios y/o moléculas de adhesión. Por tanto, los métodos también pueden considerarse métodos para afectar o alterar la respuesta inmunitaria de un sujeto al que se administra la terapia. El sujeto puede tener enfermedad inflamatoria intestinal u otra afección en la que la inmunomodulación de los linfocitos T o la regulación negativa de las moléculas de adhesión celular es un resultado deseado.

La invención también proporciona métodos para tratar una enfermedad infecciosa con los compuestos o células descritos en el presente documento. Ejemplos no limitantes de tales enfermedades infecciosas incluyen infecciones víricas, infecciones bacterianas e infecciones por hongos.

Ejemplos no limitantes de infecciones víricas incluyen infecciones por virus de la familia *Adenoviridae*, tales como adenovirus; virus de la familia *Herpesviridae* tales como herpes simple, de tipo 1, herpes simple, de tipo 2, virus de la varicela-zóster, virus de Epstein-Barr, citomegalovirus humano, herpesvirus humano y tipo 8; virus de la familia *Papillomaviridae* tales como el virus del papiloma humano; virus de la familia *Polyomaviridae* tales como virus BK y virus JC; virus de la familia *Poxviridae* tales como el de la viruela; virus de la familia *Hepadnaviridae* tales como el virus de la hepatitis B; virus de la familia *Parvoviridae* tales como bocavirus humanos y parvovirus B 19; virus de la familia *Astroviridae* tales como astrovirus humano; virus de la familia *Caliciviridae* tales como el virus Norwalk; virus de la familia *Picornaviridae* tales como el virus de Coxsackie, virus de la hepatitis A, poliovirus y rinovirus; virus de la familia *Coronaviridae* tal como el coronavirus; virus de la familia *Flaviridae* tal como el virus de la hepatitis C, virus de Zika, virus de la fiebre amarilla, virus del dengue y virus del Nilo Occidental, virus de la familia *Togaviridae* tal como el virus de la rubéola; virus de la familia *Hepeviridae* tal como el virus de la hepatitis E; virus de la familia *Retroviridae* tal como el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH); virus de la familia *Orthomyxoviridae* tal como el virus de la gripe; virus de la familia *Arenaviridae* tal como el virus guanarito, virus de Junín, virus de Lassa, virus Machupo y virus Sabia; virus de la familia *Bunyaviridae* tal como el virus de la fiebre hemorrágica de Crimea-Congo; virus de la familia *Filoviridae* tal como el virus del Ébola y el virus de Marburgo; virus de la familia *Paramixoviridae* tal como el virus del sarampión, virus de las paperas, virus paragripal, virus sincitial respiratorio, metapneumovirus humano, Virus Hendra y virus Nipah; virus de la familia *Rhabdoviridae* tal como el virus de la rabia; virus no asignados tales como el virus de la hepatitis D; y virus de la familia *Reoviridae* tal como rotavirus, orbivirus, coltivirus y virus Banna, entre otros.

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

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

La invención también proporciona métodos para tratar trastornos hiperproliferativos con los compuestos o las células descritos en el presente documento. Los trastornos hiperproliferativos incluyen afecciones que implican un crecimiento incontrolado de células, tales como cánceres o afecciones que implican el crecimiento de tumores, adenomas o pólipos. Ejemplos no limitantes de trastornos hiperproliferativos incluyen cáncer colorrectal, poliposis adenomatosa familiar (PAP), cáncer de garganta, cáncer de tiroides, cáncer gástrico, cánceres del tracto gastrointestinal, cáncer pancreático, linfoma de Hodgkin, linfoma no hodgkiniano, leucemia mieloide aguda, cáncer hepatocelular, tumores del estroma gastrointestinal, leucemia linfoblástica aguda, trastornos crónicos mieloproliferativos, síndrome hipereosinofílico, mastocitosis, entre otros.

La invención también proporciona métodos para tratar un metabolopatía congénita con los compuestos o las células descritos en el presente documento. Ejemplos no limitantes de metabolopatía congénitas incluyen la enfermedad de Wilson, enfermedad de Andersen u otras enfermedades por almacenamiento de glucógeno, cistinuria, enfermedad de Fabry, citrulinemia tipo II de inicio en la edad adulta, síndrome de Zellweger, cetoaciduria de cadena ramificada, síndrome de Lesch-Nyhan, enfermedad de Niemann-Pick, enfermedad de Fanconi-Bickel, enfermedad de von Gierke, intolerancia a la fructosa hereditaria, fenilcetonuria, deficiencia de acil-CoA deshidrogenasa de cadena media, entre otros.

La invención también proporciona métodos para tratar una enfermedad inmunometabólica crónica con los compuestos o las células descritos en el presente documento. Ejemplos no limitantes de enfermedades inmunometabólicas crónicas incluyen enfermedades cardiovasculares, tales como aterosclerosis, arteriopatía coronaria, arteriopatía periférica, enfermedad cardíaca pulmonar, endocarditis, miocarditis e hipertensión.

La invención también proporciona métodos para tratar una enfermedad autoinmunitaria, tal como una enfermedad autoinmunitaria inflamatoria, con los compuestos o las células descritos en el presente documento. Ejemplos no limitantes de enfermedades autoinmunitarias incluyen enfermedad inflamatoria intestinal (EII) (por ejemplo, enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa), lupus, lupus sistémico, síndrome de Sjögren, artritis reumatoide, diabetes de tipo 1, psoriasis, esclerosis múltiple y enfermedades autoinmunitarias inducidas por inmunoterapia contra el cáncer, entre otros. Ejemplos no limitantes de enfermedades autoinmunitarias inducidas por inmunoterapia contra el cáncer incluyen enfermedades reumáticas inducidas por inmunoterapia contra el cáncer.

La invención también proporciona métodos para tratar enfermedades inflamatorias crónicas con los compuestos o las células descritos en el presente documento. Ejemplos no limitantes de enfermedades inflamatorias crónicas incluyen síndrome metabólico, obesidad, prediabetes, enfermedades cardiovasculares y diabetes de tipo 2, entre otros.

La invención también proporciona métodos para tratar trastornos inflamatorios tales como diverticulitis colónica aguda, inflamación del tracto gastrointestinal inducida por radiación e inflamación del hígado, incluyendo, pero sin limitación, la esteatohepatitis no alcohólica (NASH), con los compuestos o las células descritos en el presente documento. Ejemplos no limitantes de inflamación del tracto gastrointestinal inducida por radiación incluyen proctitis por radiación, enteritis por radiación y proctosigmoiditis por radiación.

La invención también proporciona métodos para tratar la diabetes con los compuestos o las células descritos en el presente documento, incluyendo la diabetes de tipo 1, diabetes de tipo 2 y otros tipos de diabetes. El término "diabetes" o la expresión "diabetes mellitus" se usan para abarcar trastornos metabólicos en los que un sujeto tiene un nivel alto de azúcar en sangre (es decir, hiperglucemia). Las afecciones hiperglucémicas tienen diversas etiologías, tales como que el páncreas no produce suficiente insulina, o que las células no responden a la insulina que se produce. Hay varios subtipos reconocidos de diabetes. La diabetes de tipo 1 se caracteriza por la incapacidad total del cuerpo para producir insulina o la incapacidad del cuerpo para producir suficiente insulina. La diabetes de tipo 2 generalmente es el resultado de la resistencia a la insulina, una afección en la que las células no logran usar la insulina apropiadamente. La diabetes de tipo 2 a veces se presenta simultáneamente con una deficiencia de insulina. La diabetes gestacional ocurre cuando las mujeres embarazadas sin un diagnóstico previo de diabetes desarrollan hiperglucemia. Las formas menos comunes de diabetes incluyen diabetes congénita (debido a defectos genéticos relacionados con la secreción de insulina), diabetes relacionada con la fibrosis quística, diabetes esteroide inducida por altas dosis de glucocorticoides y varias formas de diabetes monogénica (incluida la diabetes de inicio en la madurez de los jóvenes). La diabetes monogénica abarca varias formas hereditarias de diabetes causadas por mutaciones en un único gen autosómico dominante (en contraste con etiologías poligénicas más complejas que resultan en hiperglucemia).

La invención también proporciona métodos para tratar el dolor crónico con los compuestos o las células descritos en el presente documento. Ejemplos no limitantes de enfermedades de dolor crónico incluyen fibromialgia, lesión nerviosa, dolores de cabeza de tipo migraña, dolor de espalda, dolor abdominal, entre otros.

5 La invención también proporciona métodos para tratar afecciones adicionales con los compuestos o las células descritos en el presente documento. Estas incluyen enfermedades inflamatorias crónicas tales como la enfermedad granulomatosa crónica, enfermedad de injerto contra huésped y síndrome periódico asociado al receptor del factor de necrosis tumoral; pérdida muscular, tales como la esclerosis lateral amiotrófica, distrofia muscular de Duchenne, escoliosis, y atrofia muscular progresiva; y otros.

10 En un aspecto, la invención proporciona métodos para tratar una enfermedad inflamatoria autoinmunitaria con los compuestos o las células descritos en el presente documento. Ejemplos no limitantes de enfermedades inflamatorias autoinmunitarias incluyen enfermedad inflamatoria intestinal (EII), lupus eritematoso sistémico, artritis reumatoide, diabetes de tipo 1, psoriasis y esclerosis múltiple, entre otros.

15 La invención también proporciona un método para tratar o mejorar los síntomas en un sujeto diagnosticado con lupus eritematoso sistémico o para prevenir el desarrollo de una enfermedad en un sujeto genéticamente predispuesto al lupus eritematoso sistémico. Los síntomas e indicaciones del lupus que se pueden tratar con la invención incluyen, pero sin limitación, nefritis lúpica, inflamación del sistema nervioso central, cefaleas, escleritis, neuritis óptica, fiebre, endurecimiento de las arterias, arteriopatía coronaria, dolor en las articulaciones y eritema vespertilio. La invención también proporciona un método para tratar formas adicionales de lupus que incluyen lupus cutáneo (discoide), lupus inducido por fármacos y lupus neonatal.

25 Las afecciones que se pueden tratar con los métodos descritos en el presente documento incluyen cualquier afección descrita como capaz de ser tratada con BT-11 en cualquiera de las patentes US 9.556.146 de Bassaganya-Riera. *et al.*; patente US 9.839.635 de Bassaganya-Riera *et al.*; patente US 10.028.950 de Bassaganya-Riera *et al.*; patente US 10.201.538 de Bassaganya-Riera *et al.*; patente US 10.493.072 de Bassaganya-Riera *et al.*; patente US 10.682.349 de Bassaganya-Riera *et al.*; US 2019/0160100 A1 de Bassaganya-Riera *et al.*; Bissel *et al.* 2016 (Bissel P, BoesK, Hinckley J, Jortner BS, Magnin-Bissel G, Werre SR, Ehrich M, Carbo A, Philipson C, Hontecillas R, Philipson N, Gandour RD, Bassaganya-Riera J. "Exploratory Studies With BT-11: A Proposed Orally Active Therapeutic for Crohn's Disease". *Int J Toxicol.* sep. 2016;35(5):521-9); y Carbo *et al.* 2016 (Carbo A, Gandour RD, Hontecillas R, Philipson N, Uren A, Bassaganya-Riera J. "An N,N-Bis(benzimidazolylpicolinoyl)piperazine (BT-11): A Novel Lanthionine Synthetase C-Like 2-Based Therapeutic for Inflammatory Bowel Disease". *J Med Chem.* 23 de noviembre de 2016;59(22):10113-10126); Leber *et al.* 2018 (Leber A, Hontecillas R, Zoccoli-Rodriguez V, Bassaganya-Riera J. "Activation of LANCL2 by BT-11 Ameliorates IBD by Supporting Regulatory T Cell Stability Through Immunometabolic Mechanisms". *Inflamm Bowel Dis.* 16 de agosto de 2018; 24(9):1978-1991); Leber *et al.* 2019 *Int J Toxicol.* (Leber A, Hontecillas R, Zoccoli-Rodriguez V, Ehrich M, Davis J, Chauhan J, Bassaganya-Riera J. "Nonclinical Toxicology and Toxicokinetic Profile of an Oral Lanthionine Synthetase C-Like 2 (LANCL2) Agonist, BT-11". *Int J Toxicol.* marzo-abril de 2019;38(2):96-109); Leber *et al.* 2019 *J Immunol.* (Leber A, Hontecillas R, Zoccoli-Rodriguez V, Chauhan J, Bassaganya-Riera J. "Oral Treatment with BT-11 Ameliorates Inflammatory Bowel Disease by Enhancing Regulatory T Cell Responses in the Gut". *J Immunol.* 1 de abril de 2019;202(7):2095-2104); y Leber *et al.* 2020 (Leber A, Hontecillas R, Zoccoli-Rodriguez V, Colombel JF, Chauhan J, Ehrich M, Farinola N, Bassaganya-Riera J. "The Safety, Tolerability, and Pharmacokinetics Profile of BT-11, an Oral, Gut-Restricted Lanthionine Synthetase C-Like 2 Agonist Investigational New Drug for Inflammatory Bowel Disease: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Phase I Clinical Trial". *Inflamm Bowel Dis.* 4 de marzo de 2020; 26(4):643-652).

50 Los elementos y etapas del método descritos en el presente documento se pueden utilizar en cualquier combinación, ya sea que se describan explícitamente o no.

Todas las combinaciones de etapas del método o del proceso tal como se usan en el presente documento pueden realizarse en cualquier orden, a menos que se especifique otra cosa o quede implicado claramente lo contrario por el contexto en el que se realiza la combinación referenciada.

55 Tal como se usa en el presente documento, las formas singulares "un", "uno", "una", y "el" o "la", incluyen las referencias en plural a menos que el contenido dicte claramente lo contrario.

60 Los intervalos numéricos tal como se usan en el presente documento pretenden incluir cada número y subconjunto de números dentro de ese intervalo, ya sea que se desvelen específicamente o no. Por otra parte, debe interpretarse que estos intervalos numéricos proporcionan un respaldo para una reivindicación dirigida a cualquier número o subconjunto de números en ese intervalo. Por ejemplo, debe interpretarse que una divulgación de 1 a 10 soporta un intervalo de 2 a 8, de 3 a 7, de 5 a 6, de 1 a 9, de 3,6 a 4,6, de 3,5 a 9,9 y así sucesivamente.

65 Se entiende que la invención no se limita a la construcción y disposición particulares de las piezas aquí ilustradas y descritas en el presente documento, sino que abarca dichas formas modificadas de esta que están dentro del alcance de las reivindicaciones.

## Ejemplos

## MODELADO MOLECULAR

5

## Ejemplo 1. Modelado molecular de ligandos LANCL2

Usando los ligandos de LANCL2 descritos previamente, incluido el ácido abscísico y el NSC61610, los presentes inventores determinaron la existencia de un bolsillo de unión de moléculas pequeñas principal en LANCL2. Estos ligandos se acoplaron a una estructura modelo de homología de LANCL2 basada en la estructura cristalina del homólogo de familia cercana LANCL1 para establecer residuos de unión importantes.

Generación de compuestos. A partir de los residuos identificados y las interacciones bioquímicas predichas, se generaron estructuras para ligandos LANCL2 de alta afinidad (figura 1). Las estructuras se generaron y optimizaron químicamente utilizando WebMo. Los archivos de estructura se generaron en formato .pdb y se convirtieron a formato .pdbqt mediante el cálculo de cargas por el método Gasteiger. Las estructuras se acoplaron utilizando AutoDock Vina para confirmar la afinidad de unión en el bolsillo de unión definido utilizando una cuadrícula de búsqueda cuboide de tamaño (21 × 21 × 21 angstrom) para proporcionar afinidades de unión y conformaciones de ligandos predichas. La afinidad de unión se normalizó con respecto al peso molecular del ligando. Se seleccionaron los ligandos superiores para un examen más detallado de la posición de unión.

Análisis. Los compuestos se clasificaron preliminarmente según la afinidad de unión más baja predicha, normalizada al peso molecular, que representa la posición de unión más favorable mediante una minimización de la energía intermolecular total, la energía interna total y la energía libre de torsión. Después se priorizaron los compuestos en función de las distancias favorables a los residuos de unión críticos en LANCL2.

Resultados. A partir del cribado virtual y de los compuestos generados (figura 1), el BT-63, una molécula pequeña que contiene piperazina asimétrica, proporcionó una afinidad de unión suficiente mayor que la afinidad predicha del ABA (control positivo). Además de la unión, el BT-63 proporcionó características favorables del fármaco oral y pocos problemas de seguridad. Moléculas similares dentro del quimiotipo pequeño proporcionaron una afinidad casi igual con ligeras modificaciones de las propiedades químicas. Estas incluían BT-64, BT-65, BT-95, BT-96 y BT-99 (este último es solo para referencia). Mientras tanto, los cambios en el lado opuesto de la molécula (BT-71, -72, -73, -74, -75) dieron como resultado variaciones igualmente pequeñas en la afinidad de unión. El modelado molecular de esta familia de moléculas respalda la afirmación de que el quimiotipo incluido tiene propiedades de unión a LANCL2.

35

## QUÍMICA MÉDICINAL

## Ejemplo 2A. Síntesis de BT-63

El BT-63, (2-(4-(6-(1H-benzo[d]imidazol-2-il)picolinoil)piperazin-1-il)-1-feniletanona, se puede sintetizar mediante un proceso de cinco etapas. Se añadió azufre en polvo a una mezcla de benceno-1,2-diamina y 2,6-dimetilpiridina, después se calentó a 160 °C. La mezcla de reacción se diluyó con metanol, se filtró y se evaporó a presión reducida para obtener 2-(6-metilpiridin-2-il)-1H-benzo[d]imidazol. Se añadió dióxido de selenio a una solución de 2-(6-metilpiridin-2-il)-1H-benzo[d]imidazol en piridina y se calentó a 110 °C. El disolvente de la mezcla de reacción se evaporó a presión reducida y el producto bruto obtenido se extrajo con acetato de etilo. El sólido seco se filtró y se secó al vacío para obtener ácido 6-(1H-benzo[d]imidazol-2-il)picolínico. Se añadió DIPEA a una solución de piperazin-1-carboxilato de *tert*-butilo y 2-bromo-1-feniletanona en DCM a 0 °C y se agitó. La mezcla de reacción se diluyó con agua helada y la capa orgánica se separó para obtener 4-(2-oxo-2-feniletil)piperazina-1-carboxilato de *tert*-butilo. Se añadió HCl 4 N en 1,4-dioxano a una solución de 4-(2-oxo-2-feniletil)piperazina-1-carboxilato de *tert*-butilo en DCM a 0 °C y se agitó a temperatura ambiente. Se evaporó el disolvente para obtener 1-fenil-2-(piperazin-1-il)etanona.HCl como un sólido blanquecino. Se añadió HATU a una solución de ácido 6-(1H-benzo[d]imidazol-2-il)picolínico, 1-fenil-2-(piperazin-1-il)etanona.HCl y DIPEA en DMF y se agitó. La mezcla de reacción se diluyó y se extrajo con acetato de etilo. La capa orgánica combinada se secó sobre sulfato de sodio y se evaporó a presión reducida. El producto bruto obtenido se purificó mediante el sistema de purificación Grace en una columna de sílice de 40 µm usando metanol-diclorometano como eluyente para obtener 2-(4-(6-(1H-benzo[d]imidazol-2-il)picolinoil)piperazin-1-il)-1-feniletanona. RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO): δ 12,98 (s, 1H), 8,37 (d, J = 8,00 Hz, 1H), 8,10 (t, J = 8,00 Hz, 1H), 7,99 (d, J = 6,80 Hz, 2H), 7,72 (d, J = 8,40 Hz, 1H), 7,65-7,48 (m, 5H), 7,28-7,18 (m, 2H), 3,95 (s, 2H), 3,74 (t, J = 4,80 Hz, 2H), 3,45 (t, J = 4,80 Hz, 2H), 2,68 (t, J = 4,80 Hz, 2H), 2,55 (t, J = 4,80 Hz, 2H).

## Ejemplo 2B. Síntesis de BT-104-A

El BT-104-A, (2-(4-(6-(1H-benzo[d]imidazol-2-il)picolinoil)piperazin-1-il)-2-metil-1-fenilpropan-1-ona, se puede sintetizar mediante un proceso de seis etapas.

Se agitó 2,6-piridincarboxilato de dimetilo en metanol y se enfrió a una temperatura de 10 a 20 °C. Se añadió lentamente hidróxido de potasio a la masa de reacción y se agitó durante 6 horas. Después de la finalización de la

reacción, se evaporó el disolvente para obtener éster monometílico del ácido 2,6-piridindicarboxílico.

Se agitó el éster monometílico del ácido 2,6-piridindicarboxílico en N-metilpirrolidona y se enfrió a una temperatura de 10 a 20 °C. Se añadieron DIPEA, EDC.HCl y HOBt secuencialmente a la mezcla de reacción. Después de la adición de disolvente, se añadió benceno-1,2-diamina y se agitó durante 24 h. Después de la finalización de la reacción, el disolvente se evaporó para obtener 6-(metoxicarbonil)piridin-2-(2'-aminoacetanilida).

Se agitó 6-(metoxicarbonil)piridin-2-(2'-aminoacetanilida) en ácido acético durante 15 minutos. La masa de reacción se calentó a 60 - 65 °C y se agitó durante 16 h. Después de la finalización de la reacción, el disolvente se evaporó para obtener 6-(1H-benzo[d]imidazol-2-il)picolinato de metilo.

Se añadió el 6-(1H-benzo[d]imidazol-2-il)picolinato de metilo a hidróxido de litio en THF/agua y se agitó durante 7 h. Después de la finalización de la reacción, el disolvente se evaporó para obtener ácido 6-(1H-benzo[d]imidazol-2-il)picolínico.

Se añadió metóxido de sodio a una solución de 2-bromo-2-metil-1-fenilpropan-1-ona en metanol seco y se calentó a 40 °C durante 4 h. El producto bruto se recogió en tolueno. Se añadió piperazina al producto bruto y se mantuvo a reflujo durante 16 h. Después de la finalización de la reacción, el disolvente se evaporó a presión reducida para obtener 2-metil-1-fenil-2-(piperazin-1-il)propan-1-ona.

Se añadió ácido 6-(1H-benzo[d]imidazol-2-il)picolínico en TEA a una solución de 2-metil-1-fenil-2-(piperazin-1-il)propan-1-ona en THF y se agitó durante 10 min. Se añadió T3P en acetato de etilo y se agitó durante 6 h. Después de la finalización de la reacción, el disolvente se evaporó a presión reducida. El producto se purificó para obtener (2-(4-(6-(1H-benzo[d]imidazol-2-il)picolinoil)piperazin-1-il)-2-metil-1-fenilpropan-1-ona (BT-104- A). RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ 10,34 (s, 1H), 8,51 (d, J = 8,0 Hz, 2H), 8,45 (d, J = 7,6 Hz, 1H), 7,95 (t, J = 8,0 Hz, 1H), 7,85 (d, J = 6,4 Hz, 1H), 7,59 (d, J = 6,4 Hz, 1H), 7,57-7,50 (m, 2H), 7,42 (t, J = 7,6 Hz, 2H), 7,35-7,30 (m, 2H), 3,88 (s a, 2H), 3,53 (t, J = 4,80 Hz, 2H), 2,77 (t, J = 4,80 Hz, 2H), 2,57 (t, J = 4,80 Hz, 2H), 1,37 (s, 6H).

### Ejemplo 2C. Síntesis de BT-104-B

El BT-104-B, 4-(6-(1H-benzo[d]imidazol-2-il)picolinoil)-1-(2-oxo-2-feniletíl)piperazin-2,6-diona, se puede sintetizar mediante un proceso de seis etapas.

Se agitó 2,6-piridincarboxilato de dimetilo en metanol y se enfrió a una temperatura de 10 a 20 °C. Se añadió lentamente hidróxido de potasio a la masa de reacción y se agitó durante 6 horas. Después de la finalización de la reacción, se evaporó el disolvente para obtener éster monometílico del ácido 2,6-piridindicarboxílico.

Se agitó el éster monometílico del ácido 2,6-piridindicarboxílico en N-metilpirrolidona y se enfrió a una temperatura de 10 a 20 °C. Se añadieron DIPEA, EDC.HCl y HOBt secuencialmente a la mezcla de reacción. Después de la adición de disolvente, se añadió benceno-1,2-diamina y se agitó durante 24 h. Después de la finalización de la reacción, el disolvente se evaporó para obtener 6-(metoxicarbonil)piridin-2-(2'-aminoacetanilida).

Se agitó 6-(metoxicarbonil)piridin-2-(2'-aminoacetanilida) en ácido acético durante 15 minutos. La masa de reacción se calentó a 60 - 65 °C y se agitó durante 16 h. Después de la finalización de la reacción, el disolvente se evaporó para obtener 6-(1H-benzo[d]imidazol-2-il)picolinato de metilo.

Se añadió el 6-(1H-benzo[d]imidazol-2-il)picolinato de metilo a hidróxido de litio en THF/agua y se agitó durante 7 h. Después de la finalización de la reacción, el disolvente se evaporó para obtener ácido 6-(1H-benzo[d]imidazol-2-il)picolínico.

Se añadió piperazin-2,6-diona en TEA a una solución de ácido 6-(1H-benzo[d]imidazol-2-il)picolínico en THF y se agitó durante 10 min. Después se añadió T3P en acetato de etilo y se agitó durante 2 h. Después de la finalización de la reacción, la mezcla de reacción se extrajo con acetato de etilo y se lavó con agua para obtener 1-(6-(1H-benzo[d]imidazol-2-il)picolinoil)-piperazin-2,6-diona.

Se añadió 2-bromo-1-feniletan-1-ona en DIPEA a una solución de 1-(6-(1H-benzo[d]imidazol-2-il)picolinoil)-piperazin-2,6-diona en DCM:DMF seco y se agitó durante 2 h. Después de la finalización de la reacción, la mezcla de reacción se diluyó con acetato de etilo, se lavó con agua. El material se secó y se purificó para obtener 4-(6-(1H-benzo[d]imidazol-2-il)picolinoil)-1-(2-oxo-2-feniletíl)piperazin-2,6-diona (BT-104 -B). RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ 12,88 (s, 1H), 8,46 (d, J = 7,60 Hz, 1H), 8,20 (t, J = 8,00 Hz, 1H), 8,07 (d, J = 8,00 Hz, 2H), 7,84 (d, J = 7,60 Hz, 1H), 7,75-7,71 (m, 2H), 7,60-7,56 (m, 3H), 7,30-7,24 (m, 2H), 5,25 (s, 2H), 4,86 (d, J = 4,40 Hz, 4H). Pureza por HPLC: 98,82 %; MS: m/z 452,26 (M-H).

## UNIÓN AL RECEPTOR

### Ejemplo 3. Unión a LANCL2 por resonancia de plasmón superficial

## Introducción

La detección virtual y la experimentación informática son medios valiosos para identificar y priorizar estructuras de interés al diseñar nuevos ligandos de molécula pequeña para una diana terapéutica. Para validar estos hallazgos, existen numerosos métodos *in vitro* para determinar la afinidad de una molécula pequeña por la proteína de interés. Un método particular es la resonancia de plasmón superficial, que es la capacidad para estimar la unión en estado estacionario haciendo fluir una suspensión de ligando sobre una proteína purificada inmovilizada. Este método se utilizó para evaluar posibles ligandos de LANCL2.

## Métodos

Producción y purificación de LANCL2. El LANCL2 se clonó en *E. coli*, se amplificó y se transfectó en *Pichia pastoris*. La *P. pastoris* se sembró en medios selectivos de adenina. Se seleccionaron colonias transfectadas estables y se cultivaron en caldo YPD a 30 °C durante 24 horas, con agitación de 240 rpm. Se utilizó un cultivo iniciador para inocular medios base (1 % extracto de levadura, 2 % peptona, 1 % de sorbitol, 2 % de base nitrogenada de levadura) que contenía biotina y estaba tamponado con fosfato potásico. El medio base inoculado se incubó durante 48 horas a 30 °C, 240 rpm. La *P. pastoris* se sedimentó después mediante centrifugación y se resuspendió en medios de expresión (1 % de sorbitol, 2 % de base nitrogenada de levadura) que contenían biotina y estaban tamponados con fosfato potásico. El cultivo se indujo diariamente para la producción de proteínas mediante la adición de metanol y se incubó durante un total de 4 días a 28 °C, 240 rpm. Después de la incubación, las células se sedimentaron mediante centrifugación y se lisaron mediante ultrasonidos. La proteína LANCL2 recombinante se purificó mediante cromatografía líquida rápida de proteínas (AktaPrime) utilizando cromatografía de afinidad por metales inmovilizados. Se eluyeron fracciones de proteína en alícuotas de 1 ml y se evaluó el contenido de LANCL2.

Resonancia de plasmón superficial. Se utilizó un dispositivo Biacore T200 para evaluar la unión a la proteína LANCL2. La proteína se inmovilizó en el chip sensor CM5. La LANCL2 se diluyó en tampón de acetato de sodio 10 mM a pH 4,0 y se inmovilizó en la celda de flujo a un nivel de ~3700 UR, utilizando química de acoplamiento de aminas estándar. Según los valores de respuesta inmovilizados, se calcularon los valores teóricos de  $R_{máx}$ . Los valores de  $R_{máx}$  asumen un mecanismo de interacción 1:1. Se realizaron cinéticas durante la noche para todos los analitos que se unían a las proteínas inmovilizadas. Los experimentos de cinética se efectuaron en presencia de tampón de ejecución + DMSO al 1 %. El caudal de todas las soluciones se mantuvo a 50  $\mu$ l/min. Las concentraciones de analito fueron 0  $\mu$ M, 2,5  $\mu$ M, 5  $\mu$ M, 10  $\mu$ M, 20  $\mu$ M, y 40  $\mu$ M.

## Resultados

El BT-63 se unió a la proteína LANCL2 con una  $K_D$  de 2,74  $\mu$ M. La resonancia de plasmón superficial valida la unión a LANCL2 predicha de esta familia de moléculas con la estructura de Markush descrita. En comparación, el BT-62, una molécula idéntica al BT-63 excepto por el metileno entre la piperazina y el carbonilo en el BT-63, tenía una  $K_D$  de 18,0  $\mu$ M. La adición de metileno proporciona una mayor afinidad por la LANCL2 con una  $K_D$  en un intervalo similar al del BT-11, un agente terapéutico dirigido a LANCL2.

## ESTUDIOS EXPERIMENTALES

### Ejemplo 4. Farmacocinética del BT-63

#### Introducción

Además de la inducción de efectos inmunitarios, un compuesto farmacéutico también debe llegar a los compartimentos del cuerpo en concentraciones adecuadas para proporcionar un beneficio terapéutico. Por otra parte, es necesaria una evaluación preliminar de la farmacocinética para determinar la vía de administración deseada.

#### Métodos

Se administraron a ratones C57BL/6 por vía oral 10 y 40 mg/kg de BT-63 mediante sonda oral de una solución de metilcelulosa que contenía BT-63. Después de la alimentación forzada, se les extrajo sangre a las 0,5, 1, 2, 4, 6, 8, 12 y 24 horas posteriores al tratamiento. El plasma se recogió de la sangre mediante centrifugación. El BT-63 se extrajo del plasma y se cuantificó mediante LC-MS/MS.

#### Resultados

El BT-63 oral (10 mg/kg) dio como resultado una concentración plasmática máxima de 585 ng/ml y un área bajo la curva de exposición de 1055 h\*ng/ml (figura 2). La dosis oral de 40 mg/kg produjo un fuerte aumento de la concentración plasmática máxima (4465 ng/ml), así como de la exposición (11552 ng/ml). Los resultados indican que el BT-63 es viable como molécula pequeña terapéutica oral. Basándose en estos resultados, el BT-63 es un compuesto altamente biodisponible a diferencia de otros compuestos dirigidos a LANCL2 tal como el BT-11. De manera notable,

en dosis orales iguales, el BT-63 tiene un aumento > 100 veces de la concentración plasmática máxima en ratones en comparación con el BT-11 (4,9 ng/ml a una dosis de 10 mg/kg).

### Ejemplo 5. Identificación de efectos inmunitarios en linfocitos T CD4+

5

#### Introducción

Un elemento fundamental de la patogénesis de muchas enfermedades autoinmunitarias es la disfunción de los linfocitos T auxiliares CD4+. Estas células son importantes para mantener la salud de un individuo, amplificar las respuestas inmunitarias y promover la homeostasis. Sin embargo, en el caso de enfermedades autoinmunitarias e inflamatorias, los linfocitos T auxiliares CD4+ pueden volverse hiperactivos, activarse en ausencia de estímulos o ser incapaces de resolver la inflamación. En estos escenarios, los agentes terapéuticos que pueden mitigar o prevenir la inflamación son tratamientos valiosos para el manejo de la enfermedad. Con este fin, los presentes inventores validaron el potencial terapéutico funcional del BT-63, BT-104-A (véase la figura 15), BT-104-B (véase la figura 15) y BT-104-C (véase la figura 15), ligandos de unión a LANCL2, en este tipo de células.

#### Métodos

Cultivo celular. Se extirparon los bazo de ratones C57BL/6 y se evaluaron en estados de tipo salvaje y deficientes en LANCL2. Los bazo se trituraron entre los extremos esmerilados de los portaobjetos de un microscopio y se filtraron para proporcionar una suspensión celular. Los glóbulos rojos se lisaron mediante lisis hipotónica. Las células restantes se lavaron y se filtraron. Los linfocitos T CD4+ se enriquecieron en la suspensión mediante selección negativa basada en una clasificación magnética. Las células se recogieron y se sembraron en placas de 96 pocillos recubiertas con anti-CD3 y se cultivaron en presencia de BT-63 a 0, 0,1, 1 y 10 micromolar o de BT-104A, BT-104B o BT-104C a 0,1 micromolar durante 48 h. Durante las últimas 6 h de cultivo, las células se estimularon con 12-miristato-13-acetato de forbol (PMA) e ionomicina.

Análisis inmunológico. Se recogieron células de las placas de 96 pocillos y se tiñeron con un cóctel de anticuerpos para inmunofenotipificación mediante citometría de flujo. Se recogió el sobrenadante del cultivo y se analizaron las concentraciones de citocinas mediante una matriz de perlas citométricas. Los datos se capturaron en un BD FACS Celesta y se analizaron utilizando FacsDiva.

#### Resultados

El BT-63 redujo las proporciones de linfocitos T CD4+ productores de IPN $\gamma$  y TNF $\alpha$  dentro del cultivo de células de tipo salvaje y aumentó las proporciones de linfocitos T CD4+ IL10+ FOXP3+ (figura 3). En ausencia de LANCL2, estos efectos se perdieron. A partir de una regulación negativa de las citocinas inflamatorias, estos resultados indican que el BT-63 puede funcionar como un activador de LANCL2. Dada la pérdida de actividad en las células deficientes en LANCL2, el BT-63 tiene acciones mecanicistas dominantes a través de la vía LANCL2. En combinación con los resultados de unión informáticos e *in vitro*, las acciones a través de la vía LANCL2 probablemente sean el resultado de la unión directa a LANCL2.

De manera adicional, el BT-63 proporciona mayores efectos inmunitarios en comparación con el BT-62 (figura 4A). Mientras que el BT-63 proporciona un aumento significativo de células FOXP3+ y una disminución significativa de células IFN $\gamma$ +, el BT-62 no induce ningún cambio en las concentraciones ensayadas. Por consiguiente, el conector alquileno entre los grupos piperazina y carbonilo es fundamental para una mayor afinidad de unión a LANCL2 y una mayor eficacia inmunológica.

El BT-104-A, BT-104-B y BT-104-C se observó que disminuyen significativamente las proporciones de linfocitos T IFN $\gamma$ + CD4+, con el BT-104-A y BT-104-B también disminuían significativamente los linfocitos T TNF $\alpha$ + CD4+ (figura 4B). De los tres compuestos, se observó que el BT-104-B tenía el mayor efecto numérico sobre las células IFN $\gamma$ +, y se observó que el BT-104-A tenía el mayor efecto numérico sobre las células TNF $\alpha$ +, aunque las únicas diferencias estadísticas observadas fueron relativas al vehículo.

### Ejemplo 6. Uso del BT-63 en un modelo de ratón NOD de DT1

#### Introducción

La diabetes de tipo 1 (DT1) es una enfermedad autoinmunitaria en la que el sistema inmunitario destruye las células pancreáticas productoras de insulina, lo que requiere terapia con insulina de por vida mediante inyecciones o bombas. Con los tratamientos actuales, el control de la glucemia es difícil, lo que lleva a periodos prolongados de hiperglucemia y metabolismo desregulado de la glucosa que contribuyen al daño orgánico y comorbilidades (ceguera, insuficiencia renal, enfermedad cardiovascular, pérdida de extremidades). Actualmente no hay tratamientos aprobados para prevenir la progresión de la enfermedad al inicio (es decir, restaurar la tolerancia inmunológica a los antígenos asociados a la diabetes para permitir el recrecimiento de las células beta pancreáticas) y muy pocos están aprobados para ayudar en el control de la glucemia. La LANCL2 es un potente receptor que contribuye a las respuestas

inmunitarias, al metabolismo celular y a la supervivencia de las células. Con este triple mecanismo, la LANCL2 es una diana atractiva para la terapia de mantenimiento aguda y a largo plazo en la DT1.

### **Métodos**

5 Modelo NOD. En este estudio se utilizaron ratones ShILt diabéticos no obesos (NOD). Los ratones NOD presentan numerosas mutaciones genéticas que permiten la aparición espontánea de hiperglucemia y patologías pancreáticas asociadas a la DT1. Los ratones se incluyeron en el experimento a las 9 semanas de edad y se controlaron durante un periodo de 12. Los ratones se trataron diariamente con vehículo, 10 mg/kg de BT-63, o 20 mg/kg de BT-63 mediante sonda oral. Una vez a la semana se extrajeron muestras de sangre de la vena de la cola para analizar la concentración de glucosa mediante un glucómetro. Los ratones se sacrificaron al cabo de 12 semanas para la extracción de sangre y órganos para pruebas inmunológicas.

15 Administración del tratamiento. El BT-63 se preparó en una solución de metilcelulosa al 0,5 % (12-15 mPa s.(12-15 cP)). La dosis utilizada fue de 10 o 20 mg/kg administrada una vez al día. Los ratones se pesaron semanalmente para actualizar la formulación de dosificación. La dosis se calculó en función del peso corporal medio para cada sexo. La dosis oral se administró mediante sonda orogástrica de dosificación en un volumen de 0,2 ml.

20 Análisis inmunológico. La sangre se extrajo mediante punción cardíaca a un tubo heparinizado. El plasma se separó después de la centrifugación y se analizó con Luminex para determinar las citocinas y hormonas relacionadas con el desarrollo de la DT1. Los bazo se extirparon, se trituraron y se filtraron para proporcionar una suspensión celular. Los glóbulos rojos se lisaron. Las células se marcaron con mezclas de anticuerpos extracelulares (CD45, CD3, CD4, CD8, CD19, NK1.1, CD25, F4/80, CD11b, Gr1, CX3CR1, CD64) e intracelulares (Tbet, BCL6, FOXP3, IFN $\gamma$ , IL21, IL10) en una tinción secuencial en vivo en placas de 96 pocillos en preparación para la citometría de flujo. Los datos se capturaron en un BD FACS Celesta y se analizaron utilizando FacsDiva.

### **Resultados**

30 El BT-63 oral protegió contra el desarrollo de la hiperglucemia. Los ratones tratados con BT-63 tuvieron niveles de glucosa en sangre significativamente más bajos desde las 19 semanas de edad hasta el final del experimento (figura 5). El porcentaje de ratones hiperglucémicos se redujo en un 50 % en el grupo de 20 mg/kg en comparación con el grupo tratado con vehículo, mientras que la HbA1c a las 21 semanas de edad se redujo en los grupos con dosis de 10 mg/kg y 20 mg/kg. En el bazo, el BT-63 oral aumentó la proporción de CD4+ IL10+ con respecto a CD4+ IFN $\gamma$ + al tiempo que disminuyeron los linfocitos T foliculares auxiliares (Tfh) (BCL6+ IL21+) y aumentaron los linfocitos T CD4+ PD1+ (figura 6). El BT-63 también aumentó los niveles plasmáticos de insulina y péptido C y redujo los de MCP-1 y TNF (figura 7). Los datos respaldan al BT-63 como terapia preventiva y reparadora en la DT1.

### **Ejemplo 7. Uso del BT-63 en un modelo de LES en ratón inducido por TLR**

#### **40 Introducción**

El lupus eritematoso sistémico (LES) es una enfermedad autoinmunitaria sistémica que puede causar daño a los riñones, la cardiovascular y las articulaciones. Debido a la autotolerancia, la apoptosis estándar de las células da como resultado la generación de antígenos nucleares que se procesan sin respuesta inmunitaria en individuos que no padecen LES. Sin embargo, en el LSE, el sistema inmunitario responde a estos antígenos generando anticuerpos contra el ADN bicatenario (ADNbc) y otros antígenos nucleares que forman complejos inmunitarios que pueden depositarse en todo el cuerpo y provocar respuestas inmunitarias injustificadas. Actualmente la enfermedad se trata con esteroides, productos biológicos y otros inmunosupresores con una alta probabilidad de efectos secundarios perjudiciales y debilitamiento del sistema inmunitario del cuerpo. El tratamiento mediante ligandos activadores de LANCL2 podría restaurar la tolerancia inmunológica y reducir la producción de anticuerpos autodirigidos.

#### **Métodos**

55 Modelo del resiquimod. Se preparó resiquimod en una mezcla de etanol:acetona 1:3 para proporcionar 85 microgramos de resiquimod a cada ratón. La solución de resiquimod se mezcló bien y se aplicó en la oreja de los ratones C57BL6 tres veces a la semana durante un periodo de 2 semanas. Los ratones se controlaron diariamente para detectar signos de enfermedad.

60 Administración del tratamiento. El BT-63 se preparó en una solución de metilcelulosa al 0,5 % (12-15 mPa s.(12-15 cP)). La dosis utilizada fue de 20 mg/kg administrada una vez al día. Los ratones se pesaron semanalmente para actualizar la formulación de dosificación. La dosis se calculó en función del peso corporal medio para cada sexo. La dosis oral se administró mediante sonda orogástrica de dosificación en un volumen de 0,2 ml.

65 Análisis inmunológico. La sangre se extrajo mediante punción cardíaca a un tubo con EDTA. El plasma se separó después de la centrifugación y se analizó mediante ELISA para detectar anticuerpos anti-ADNbc. Se recogió orina para analizar el contenido de albúmina y evaluar la función renal. Los bazo se extirparon, se trituraron y se filtraron

para proporcionar una suspensión celular. Los glóbulos rojos se lisaron. Las células se marcaron con mezclas de anticuerpos extracelulares (CD45, CD3, CD4, CD8, CD19, NK1.1, CD25, F4/80, CD11b, Gr1, CX3CR1, CD64) e intracelulares (Tbet, BCL6, FOXP3, IFN $\gamma$ , IL6, IL10) en una tinción secuencial en vivo en placas de 96 pocillos en preparación para la citometría de flujo. Los datos se capturaron en un BD FACS Celesta y se analizaron utilizando FacsDiva.

### Resultados

El BT-63 oral reduce la concentración de anticuerpos anti-ADNbc en plasma después de 2 semanas de tratamiento y proporciona una reducción del contenido de albúmina en orina, lo que conduce a dos beneficios específicos de la patogénesis del LES (figura 8). Las diferencias inmunológicas están presentes dentro del bazo en forma de linfocitos T CD8<sup>+</sup> IFN $\gamma$ <sup>+</sup> y células IL6<sup>+</sup> reducidas, lo que indica una disminución de la inflamación.

### Ejemplo 8. Uso del BT-63 en un modelo crónico de EII

#### Introducción

La enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa son enfermedades crónicas con periodos esporádicos de exacerbación inflamatoria no resuelta que provocan un daño progresivo en la mucosa intestinal. La pérdida de Mdr1a en ratones afecta la capacidad de las células epiteliales para procesar y expulsar correctamente los productos de desecho, lo que provoca una colitis espontánea. La colitis en estos ratones es crónica y penetra a través de las capas del intestino. Por lo tanto, el modelo Mdr1a<sup>-/-</sup> es un modelo ideal para ensayar la administración crónica de un agente terapéutico para la inducción y el mantenimiento de una disminución de la gravedad de la enfermedad.

A diferencia de otros modelos genéticos de enfermedad que pueden generar ratones inmunocomprometidos, los ratones Mdr1a<sup>-/-</sup> son inmunocompetentes, y la supresión, en cambio, afecta la capacidad celular para expulsar moléculas y prevenir el estrés celular. La acumulación de desechos y subproductos celulares conduce a una disregulación del ciclo de vida de las células epiteliales y a un aumento de la secreción de citocinas y quimiocinas inflamatorias. Así, proporciona un inicio crónico y espontáneo de la enfermedad con eventos iniciadores primarios que ocurren dentro del epitelio. De manera adicional, el gen MDR1 es un alelo de riesgo emergente para la EII y afecta la capacidad de respuesta a los tratamientos basados en glucocorticoides. La capacidad del BT-63 para proporcionar eficacia terapéutica en ausencia de este gen es una indicación importante de solidez en presencia de anomalías genéticas e indica una capacidad de traducción humana en un contexto que ahorra cirugía.

#### Métodos

Modelo MDR1a<sup>-/-</sup>. Los ratones con deficiencia de MDR1a desarrollan colitis espontáneamente. Los ratones MDR1a<sup>-/-</sup> comenzaron a recibir tratamiento con BT-63 (oral, 20 mg/kg) a las 6 semanas de edad y el tratamiento continuó hasta las 10 semanas de edad. Los ratones se pesaron y se les dio una puntuación semanalmente.

Administración del tratamiento. El BT-63 se preparó en una solución de metilcelulosa al 0,5 % (12-15 mPa s.(12-15 cP)). La dosis utilizada fue de 20 mg/kg administrada una vez al día. Los ratones se pesaron semanalmente para actualizar la formulación de dosificación. La dosis se calculó en función del peso corporal medio para cada sexo. La dosis oral se administró mediante sonda orogástrica de dosificación en un volumen de 0,2 ml.

Citometría de flujo. Se recogieron los colones en tampón RPMI/FBS que contenía colagenasa (300 U/ml) y DNasa (50 U/ml) para la digestión. Los tejidos se digirieron durante 60 minutos con agitación a 37 °C. Las suspensiones celulares resultantes se filtraron a través de filtros de 100  $\mu$ m., se centrifugaron (300 x g, 8 min) y se lavaron en RPMI nuevo. Después de filtrar las suspensiones de células individuales resultantes, las células inmunitarias se purificaron mediante un gradiente de Percoll de Percoll al 40 % que contenía células superpuesto sobre una solución de Percoll al 70 %. Después de la centrifugación, la interfase se recogió y se lavó para obtener fracciones de células de la lámina propia del colon enriquecidas. Las células se marcaron con mezclas de anticuerpos extracelulares (CD45, CD3, CD4, CD8, CD19, NK1.1, CD25, F4/80, CD11b, Gr1, CX3CR1, CD64) e intracelulares (Tbet, ROR $\gamma$ T, FOXP3, IFN $\gamma$ , IL17, IL10) en una tinción secuencial en vivo en placas de 96 pocillos. Los datos se adquirieron utilizando un citómetro de flujo FACS Celesta con software FACSDiva.

### Resultados

El tratamiento oral con BT-63 disminuye la actividad de la enfermedad en ratones Mdr1a<sup>-/-</sup>. La actividad de la enfermedad en este modelo de colitis es una puntuación resumida de la pérdida de peso, la presencia y gravedad del sangrado rectal, la consistencia fecal, los síntomas de dolor y el comportamiento general de un ratón. El BT-63 redujo la actividad de la enfermedad durante el periodo de exposición con una reducción máxima observada del 90 % en la cuarta semana de tratamiento. Dentro de la lámina propia del colon, el BT-63 altera significativamente las proporciones de células inmunitarias (figura 9). En particular, el BT-63 reduce las proporciones de Th1, Th17 y neutrófilos, tres subconjuntos principales de células responsables de la inflamación en la mucosa del colon. Las proporciones de linfocitos reguladores T CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> aumentaron en el colon. Mientras tanto, los linfocitos Th1 esplénicos

disminuyeron y los linfocitos Treg CD25+ esplénicos aumentaron después del tratamiento con BT-63 (figura 10). La eficacia del BT-63 en un modelo de ratón altamente traslacional de EII destaca el uso del BT-63 como agente terapéutico oral para la EC y la CU.

## 5 Ejemplo 9. Eficacia del BT-63 en un modelo de infección vírica

La activación de LANCL2 por ligandos específicos puede modular la respuesta inmunitaria, prevenir los procesos de entrada o replicación del virus para reducir la carga viral y promover la reparación y homeostasis del tejido local. Para validar la eficacia del BT-63, los presentes inventores usan un modelo de ratón de infección por el virus de la gripe.

### Métodos

Modelo de ratón. Se anestesiaron ratones C57BL/6 de tipo salvaje de ocho a diez semanas de edad mediante inhalación de isoflurano. Los ratones se infectaron con el virus de la gripe A (H1N1) por vía intranasal con un título de exposición de 350 ufp/ratón [37]. Los ratones se trataron diariamente con BT-63 a una dosis de 20 mg/kg por vía oral mediante alimentación forzada. Los ratones se pesaron y se les dio una puntuación diariamente durante 12 días. Los ratones se sacrificaron el día 12 para medir las respuestas inmunitarias mediante citometría de flujo en los pulmones.

Citometría de flujo. Los pulmones se cortan en trozos pequeños y se recogen en un tampón RPMI/FBS/CaCl<sub>2</sub> que contiene colagenasa (300 U/ml) y DNasa (50 U/ml) para la digestión. Los tejidos se digieren durante un periodo de 60 a 90 minutos con agitación a 37 °C. Las suspensiones celulares resultantes se filtran a través de filtros de 100 µm, se centrifugan (300 x g, 8 min) y se lavan en RPMI nuevo. Los glóbulos rojos se lisan mediante lisis hipotónica y se eliminan mediante filtración. Las células se lavan y se siembran en placas para la tinción por citometría de flujo. Las células se marcan con mezclas de anticuerpos extracelulares (CD45, CD3, CD4, CD8, CD19, NK1.1, CD25, F4/80, CD11b, CD11c, Gr1, CX3CR1, CD64, SiglecF, Ly6C) e intracelulares (Tbet, RORγT, FOXP3, IFNγ, IL6, IL10, IFNβ) en una tinción secuencial *in vivo* en placas de 96 pocillos. Los datos se adquieren utilizando un citómetro de flujo FACS Celesta con software FACSDiva.

### Resultados

El BT-63 oral protege contra la mortalidad y disminuye la presentación de síntomas asociados a la gripe (figura 11). El BT-63 reduce significativamente el índice de actividad de la enfermedad desde el día 3 después de la infección hasta el día 12 después de la infección en comparación con los animales tratados con vehículo. De manera adicional, el BT-63 aumenta la supervivencia en más del 50 % en comparación con el vehículo. Inmunológicamente, el BT-63 aumenta los linfocitos T IL10+ CD8+ y los macrófagos alveolares el día 12 después de la infección en el pulmón (figura 12). Estos dos tipos de células se han caracterizado previamente como células importantes en la recuperación de infecciones víricas pulmonares. Por otra parte, los ratones tratados con BT-63 tienen menores proporciones de linfocitos T CD4+ TNFα+ y neutrófilos en los pulmones, tipos de células asociados al daño tisular. En conjunto, los datos confirman los efectos protectores del BT-63 en infecciones víricas.

## Ejemplo 10. Tratamiento *ex-vivo* de linfocitos T CD4+ para el tratamiento de enfermedades inflamatorias

El BT-63 a través de la señalización inmunometabólica cambia el perfil fenotípico de las células *in vitro* y las respuestas inmunitarias *in vivo*. En particular, El BT-63 configura los linfocitos T CD4+ para aumentar la expresión de FOXP3, aumentar la capacidad supresora y aumentar la estabilidad de estas células reguladoras en afecciones inflamatorias. Por tanto, la transferencia adoptiva de linfocitos tratados *ex-vivo* con BT-63 es beneficiosa en el tratamiento de enfermedades y trastornos inflamatorios con respuestas inadecuadas de los linfocitos T CD4+, tales como la enfermedad inflamatoria intestinal, la enfermedad de injerto contra huésped, y otras descritas en el presente documento.

### Métodos

Se pueden aislar se pueden aislar linfocitos T CD4+ vírgenes del bazo de ratones mediante clasificación magnética. Las células aisladas se pueden incubar en placas de 96 pocillos recubiertas con anti-CD3/anti-CD28 en medios de diferenciación Treg. Los medios de diferenciación de Treg pueden ser medios de medio de Dulbecco modificado (IMDM) de Iscove (ThermoFisher Scientific) suplementados con suero fetal bovino, HEPES, penicilina/estreptomicina, L-glutamina y agentes de diferenciación. Los agentes de diferenciación de Treg pueden ser ácido todo-trans-retinoico 10 nM y TGF-β 5 ng/ml. Se pueden realizar experimentos adicionales comparando la diferenciación en los medios de diferenciación Treg con y sin la adición de 10 ng/ml de IL-2 o IL-12. Las células se pueden incubar con vehículo, BT-63 10 nM o 100 nM en medios de diferenciación durante 48 horas antes del ensayo. Antes del ensayo, las células se pueden estimular con PMA e ionomicina durante 6 horas.

En experimentos de transferencia, los bazos de los donantes se pueden triturar y enriquecer para la fracción CD4+ mediante clasificación magnética. Las células CD4+ CD45RB<sup>hi</sup>CD25<sup>-</sup> (Teff) y CD4+ CD45RB<sup>lo</sup>CD25<sup>+</sup> (Treg<sub>9</sub>) se pueden clasificar mediante un clasificador de células FACSAria. Las células Treg aisladas se pueden cultivar durante 12 h en presencia de vehículo o BT-63 (100 nM). Las Teff aisladas se puede cultivar durante 12 h en vehículo.

Basándose en el grupo experimental indicado, los ratones receptores Rag2<sup>-/-</sup> pueden recibir 4×10<sup>5</sup> células Teff y 1×10<sup>5</sup> células Treg de los grupos tratados con vehículo o BT-63 mediante inyección intraperitoneal. Los ratones se pueden pesar y darles una puntuación semanalmente hasta la eutanasia 5 semanas después de la transferencia.

5 Los linfocitos de la lámina propia del colon y las células cultivadas se pueden sembrar en placas de 96 pocillos (6×10<sup>5</sup> células/pocillo) y se procesan para la inmunofenotipificación mediante citometría de flujo tal como se describe anteriormente. En resumen, las células se pueden incubar con anticuerpos conjugados con fluorocromo contra marcadores extracelulares: CD45, CD4, CD3, CD25, CD8. Las muestras que necesitan una tinción secundaria se pueden incubar con anticuerpos secundarios o con fluorocromo conjugado con estreptavidina. Después las muestras se pueden fijar y permeabilizar. Las células se pueden incubar con anticuerpos contra marcadores intracelulares: Tbet, IPN $\gamma$ , IL10, FOXP3, IL17, RORYT. Los datos se pueden adquirir con un citómetro de flujo BD FACS Celesta y se pueden analizar utilizando el software FACS Diva (BD Pharmingen).

### Resultados

15 Con la importancia de los linfocitos T reguladores CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> FOXP3<sup>+</sup> para la eficacia de BT-63, el objetivo de los presentes inventores es confirmar el efecto directo del BT-63 sobre su diferenciación y capacidad para retener el fenotipo en afecciones inflamatorias. Los linfocitos T CD4<sup>+</sup> vírgenes se pueden diferenciar en Treg *in vitro* en presencia o ausencia de IL-2 según los métodos descritos anteriormente. Los presentes inventores predicen que el tratamiento con BT-63 (100 nM) aumentará significativamente el establecimiento de un subtipo CD25<sup>+</sup> FOXP3<sup>+</sup> en ausencia de IL-2, una diferencia que se acentuará aún más con la adición de IL-2. Los presentes inventores predicen que en concentraciones de tan solo 10 nM, el BT-63 inducirá significativamente más células CD25<sup>+</sup> FOXP3<sup>+</sup> en presencia de IL-2. Los presentes inventores predicen que solo se observarán niveles bajos de un subtipo CD25<sup>+</sup> Tbet<sup>+</sup> mixto en estas condiciones de diferenciación, y esto no será alterado estadísticamente por el BT-63. Los presentes inventores predicen que el BT-63 retendrá niveles significativamente más altos de células CD25<sup>+</sup> FOXP3<sup>+</sup> en muestras tratadas con IL-12. Esto contrastará con la supresión de células CD25<sup>+</sup> FOXP3<sup>+</sup> en muestras tratadas con IL-12 en ausencia de BT-63. La adición de IL-12 también inducirá un aumento de células CD25<sup>+</sup> Tbet<sup>+</sup> en todos los grupos, aunque el BT-63 proporcionará una protección dependiente de la dosis contra este subconjunto mixto.

30 Para identificar vías de señalización moduladas por BT-63 *in vivo*, los presentes inventores aislarán linfocitos T CD4<sup>+</sup> del colon de ratones Mdr1a<sup>-/-</sup> tratados con vehículo y BT-63 en la presentación de colitis a las 10 semanas de edad. En los linfocitos T CD4<sup>+</sup>, el tratamiento oral con BT-63 dará como resultado una expresión significativamente mayor de Stat5a y Foxo1, dos miembros de la vía de señalización de la IL-2. Mientras tanto, la expresión de Pten y Phlpp1 aumentará. *In vitro*, el STAT5a se fosforilará en una proporción mayor en muestras tratadas con BT-63 en los medios de diferenciación de Treg de base y también en los medios de diferenciación de Treg suplementados con IL-2 o IL-12. El FOXO1 se verá afectado de manera similar tanto en los medios de diferenciación de Treg de base como en los medios de diferenciación de Treg que contienen IL-2, pero no en los medios de diferenciación Treg que contienen IL-12. Las células también se diferenciarán en presencia de inhibidores de PTEN (SF1670) o STATS (STAT5i). En los medios de diferenciación Treg que contienen tanto IL-2 como IL-12, la adición de STAT5i evitará los efectos del BT-63 en las células CD25<sup>+</sup> FOXP3<sup>+</sup> y CD25<sup>+</sup> Tbet<sup>+</sup>. Por el contrario, el SF1670 solo evitará los efectos del BT-63 en las células CD25<sup>+</sup> Tbet<sup>+</sup> en medios que contienen IL-2.

45 Los ratones Rag2<sup>-/-</sup> carecen de linfocitos T y B maduros. Por consiguiente, estos ratones no logran desarrollar mecanismos de autotolerancia, homeostasis microbiana e inmunorregulación general. La transferencia de linfocitos T CD4<sup>+</sup> vírgenes a ratones Rag2<sup>-/-</sup> induce la inflamación intestinal resultante de la ausencia de estos mecanismos a través de la expansión *in vivo* de las células transferidas y la diferenciación en fenotipos inflamatorios de una manera similar a las experimentadas en enfermedades autoinmunitarias inflamatorias activas que incluyen, pero sin limitación, la enfermedad inflamatoria intestinal. La hipótesis de los presentes inventores es que la transferencia de células reguladoras tratadas *ex-vivo* con BT-63 conferirá mecanismos de homeostasis e inmunorregulación a los animales receptores.

50 La transferencia adoptiva de Treg tratados *ex-vivo* con BT-63 (100 nM) disminuirá la gravedad general de la enfermedad y proporcionará el mantenimiento de los beneficios inmunitarios hasta la duración límite ensayada de 5 semanas después de la transferencia. Además de la mejora general de la enfermedad, el tratamiento de Treg *ex-vivo* con BT-63 dará como resultado fenotipos modificados de las células de la lámina propia del colon. En los grupos de Treg tratados con BT-63, los linfocitos T CD4<sup>+</sup> productores de IPN $\gamma$  e IL-17<sup>+</sup> RORYT<sup>+</sup> se reducirán. Mientras tanto, los Treg CD25<sup>+</sup> aumentarán, lo que indica una mayor estabilidad y una mayor capacidad para servir como población fundadora de células reguladoras. Por otra parte, la interacción con el eje de señalización IL-2/STAT5 promoverá cambios importantes en el microambiente de citocinas y quimiocinas que amplifican los efectos de las células transferidas.

60 Estos resultados mostrarán que los efectos del BT-63 en las células inmunitarias cuando se administra *in vivo* se replicarán cuando se traten células inmunitarias *ex-vivo*. Los presentes autores predicen que la administración de las células preparadas de la invención a un animal será eficaz en el tratamiento de cualquiera de las afecciones descritas en el presente documento más allá de las enfermedades inflamatorias tales como la EII.

**Ejemplo 11. Uso del BT-63 en un modelo genético de ratón de LES****Introducción**

5 El lupus eritematoso sistémico (LES) es una enfermedad autoinmunitaria sistémica que puede causar daño a los riñones, la cardiovascular y las articulaciones. El LES es el resultado de una interacción compleja de factores genéticos que dan como resultado una enfermedad inmunológica que se manifiesta principalmente a través de una generación de autoanticuerpos. Un modelo preclínico destinado a capturar estos factores complejos es el modelo NZB/W F1. El cruzamiento F1 de ratones NZB y NZW da como resultado ratones con autoinmunidad de gravedad progresiva. Esta autoinmunidad comparte muchas características comunes con el LES humano, incluida la generación de anticuerpos antinucleares, daño renal y respuestas elevadas al interferón tipo I.

**Métodos**

15 Modelo NZB/W F1. Ratones hembra NZB/W F1 de veinticuatro semanas, se asignaron aleatoriamente a grupos tratados con vehículo o BT-63 según los niveles basales de proteína en orina (n = 10). El BT-63 se administró diariamente por vía oral a 20 mg/kg durante 12 semanas. Los ratones se pesaron semanalmente para actualizar la formulación de dosificación. La dosis se calculó sobre la base de los pesos corporales medios.

20 Análisis inmunológico. La sangre se extrajo mediante punción cardíaca a un tubo con EDTA. El plasma se separó después de la centrifugación y se analizó mediante ELISA para detectar anticuerpos anti-ADNbc e IFN- $\alpha$ . Se recogió orina para analizar el contenido de proteínas y evaluar la función renal. Los bazo se extirparon, se trituraron y se filtraron para proporcionar una suspensión celular. Los glóbulos rojos se lisaron. Las células se marcaron con mezclas de anticuerpos extracelulares (CD45, CD3, CD4, CD8, CD19, CD138, CD25, MHCII, CD11b, CD11c, CXCR3, IgD, IgM) e intracelulares (BCL6, FOXP3, IL21, IL6, IL10) en una tinción secuencial en vivo en placas de 96 pocillos en preparación para la citometría de flujo. Los datos se capturaron en un BD FACS Celesta y se analizaron utilizando FacsDiva.

**Resultados**

30 El BT-63 administrado por vía oral protegió a los ratones de la pérdida de peso y evitó el empeoramiento de la puntuación de proteinuria desde el valor inicial (figura 13). Los ratones tratados con BT-63 tenían niveles reducidos de anti-ADNbc e IFN- $\alpha$  en plasma a las 36 semanas de edad (12 semanas de tratamiento). El tratamiento con BT-63 produjo una reducción moderada de los linfocitos B foliculares y las células plasmáticas en el bazo, en particular células plasmáticas CXCR3+, un subconjunto patógeno principal en el lupus. Sin embargo, se observaron mayores reducciones de las células mieloides IL6+, linfocitos T reguladores CD4+ CD25+ FOXP3+ y linfocitos T foliculares auxiliares IL21+ BCL6+ en relación con el vehículo (figura 14).

**Ejemplo 12. Uso del BT-104-B en un modelo de esteatohepatitis no alcohólica (NASH)****Introducción**

La NASH es una enfermedad hepática crónica progresiva que afecta a más de 140 millones de personas en todo el mundo y cuyos costes totales de atención médica superan los 8 mil millones de dólares al año sólo en Estados Unidos. No se han aprobado agentes terapéuticos actuales para la NASH. Si bien es una afección reversible, la falta de un tratamiento eficaz de la NASH conlleva a un mayor riesgo de carcinoma hepatocelular, insuficiencia hepática y muerte cardíaca. Con multitud de factores hepáticos y extrahepáticos, la NASH es una enfermedad compleja. Aún así, muchas terapias en desarrollo no logran abordar las tres áreas principales de desregulación, compuestas por factores metabólicos, inflamatorios y fibróticos.

**Métodos**

55 *Modelo inducido por WD.* A los ratones C57BL/6 se les administraron inyecciones intraperitoneales quincenales de 0,5  $\mu$ l/g de CCl<sub>4</sub> para inducir esteatohepatitis durante 4 semanas. Los ratones se trataron diariamente, de manera terapéutica después de 2 semanas de inyecciones. El tratamiento con BT-104-B (20 mg/kg) o el control del vehículo se realizó mediante sonda oral. La dosis se calculó sobre la base de los pesos corporales medios.

60 *Análisis.* Se extirparon y se pesaron los hígados. Se extirparon secciones de los hígados y se almacenaron en formalina tamponada para tinción con rojo Sirio o se congelaron rápidamente para evaluar la fibrosis. La gravedad de la fibrosis se evaluó mediante la puntuación del hígado teñido con rojo Sirio mediante examen microscópico.

**Resultados**

65 El BT-104-B oral redujo el peso del hígado (figura 16A) y la puntuación de fibrosis (figura 16B) después de 2 semanas de tratamiento, lo que indica la capacidad de mejorar la inflamación y la fibrosis hepática en el contexto de la NASH.

**Ejemplo 13. Uso de BT-104-B en un modelo de ratón con artritis reumatoide****Introducción**

5 La artritis reumatoide (AR) provoca una inflamación grave de las articulaciones que lleva a una pérdida de movilidad y a un dolor intenso. La inmunología subyacente de la inflamación sinovial es compleja, e implica la interacción de las células mieloides, linfocitos T, fibroblastos y otras células estructurales de la membrana sinovial. La alta expresión de TNF e IL-6 son fundamentales para la patogénesis de la AR, con contribuciones adicionales de IL-1 $\beta$ , IL-12, IL-17, IL-21, IL-23, MCP1 y TGF- $\beta$ . En conjunto, estas citocinas pueden llevar al reclutamiento de leucocitos, remodelación ósea, formación de paño sinovial, estrés oxidativo e hiperplasia del revestimiento de la articulación.

**Métodos**

15 *Modelos.* Se inmunizaron ratones C57B1/6 de seis semanas de edad con 200  $\mu$ g de colágeno de pollo emulsionado en adyuvante completo de Freund mediante inyecciones intradérmicas en la base de la cola. Los ratones se trataron con 20 mg/kg de BT-104-B o vehículo, diariamente durante cuatro semanas.

20 *Análisis inmunológico.* Se extirparon los bazos de los ratones. Los tejidos se trituraron y filtraron para proporcionar una suspensión celular. Los glóbulos rojos se lisaron. Las células se marcaron con mezclas de anticuerpos extracelulares (CD45, CD3, CD4, CD8, CD11b, CD11c) e intracelulares (IFN $\gamma$ , IL17, TNF) en una tinción secuencial en vivo en placas de 96 pocillos en preparación para la citometría de flujo. Los datos se capturaron en un BD FACS Celesta y se analizaron utilizando FACSDiva.

**Resultados**

25 El BT-104-B oral redujo significativamente la proporción de linfocitos T CD4+ IL-17+ (figura 17A), linfocitos T CD4+ IFN $\gamma$ + (figura 17B) y células mieloides CD11b+ CD11c+ TNF+ (figura 17C) en los bazos de ratones con artritis inducida por colágeno en comparación con los controles tratados con vehículo. Esto indica la capacidad de BT-104-B y compuestos relacionados en el tratamiento de la artritis reumatoide.

**Ejemplo 14. Uso del BT-104-B en un modelo genético de ratón de LES****Introducción**

35 El lupus eritematoso sistémico (LES) es una enfermedad autoinmunitaria sistémica que puede causar daño a los riñones, la cardiovascular y las articulaciones. El LES es el resultado de una interacción compleja de factores genéticos que dan como resultado una enfermedad inmunológica que se manifiesta principalmente a través de una generación de autoanticuerpos. Un modelo preclínico destinado a capturar estos factores complejos es el modelo NZB/W F1. El cruzamiento F1 de ratones NZB y NZW da como resultado ratones con autoinmunidad de gravedad progresiva. Esta autoinmunidad comparte muchas características comunes con el LES humano, incluida la generación de anticuerpos antinucleares, daño renal y respuestas elevadas al interferón tipo I.

**Métodos**

45 *Modelo NZB/W F1.* Ratones hembra NZB/W F1 de veinticuatro semanas, se asignaron aleatoriamente a grupos tratados con vehículo o BT-104-B según los niveles basales de proteína en orina. El BT-104-B se administró diariamente a 20 mg/kg durante 12 semanas. Los ratones se pesaron semanalmente para actualizar la formulación de dosificación. La dosis se calculó sobre la base de los pesos corporales medios.

50 *Análisis inmunológico.* Los bazos se extirparon, se trituraron y se filtraron para proporcionar una suspensión celular. Los glóbulos rojos se lisaron. Las células se marcaron con mezclas de anticuerpos extracelulares (CD45, CD3, CD4, CD8, CD25) e intracelulares (IL21, IL17, FOXP3) en una tinción secuencial en vivo en placas de 96 pocillos en preparación para la citometría de flujo. Los datos se capturaron en un BD FACS Celesta y se analizaron utilizando FACSDiva.

**Resultados**

60 El BT-104-B oral redujo significativamente la proporción de linfocitos T CD4+ IL-17+ (figura 18A) y linfocitos T CD4+ IL21+ (figura 18B) mientras que aumentó significativamente la proporción de linfocitos T CD4+ CD25+ FOXP3+ (figura 18C) en los bazos de ratones NZB/W F1 en comparación con los controles tratados con vehículo. Esto indica la capacidad del BT-104-B y compuestos relacionados en el tratamiento del LES.



heterocíclico no aromático opcionalmente sustituido; y

R<sup>4</sup> es un átomo de hidrógeno, alquilo opcionalmente sustituido, alqueno opcionalmente sustituido, alquilo opcionalmente sustituido, cicloalquilo opcionalmente sustituido, acilo, alquilo opcionalmente sustituido, arilo opcionalmente sustituido, heteroarilo opcionalmente sustituido, o un grupo heterocíclico no aromático opcionalmente sustituido.

5

2. El compuesto de la reivindicación 1, en donde:

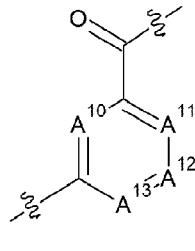
A<sup>1</sup>, A<sup>2</sup> y A<sup>3</sup> son C(R<sup>3</sup>);

10 A<sup>5</sup> es N(R<sup>3</sup>); y

A<sup>6</sup> es N; o

en donde:

15 Y es:

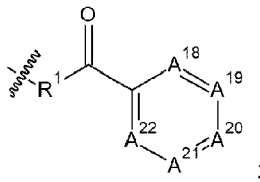


20 y  
A<sup>11</sup>, A<sup>12</sup> y A<sup>13</sup> son C(R<sup>3</sup>); o

en donde Q es piperazin-1,4-diilo o piperazin-1,4-diilo sustituido; o en donde:

Y' es:

25



A<sup>18</sup>, A<sup>20</sup> y A<sup>22</sup> son C(R<sup>3</sup>); y

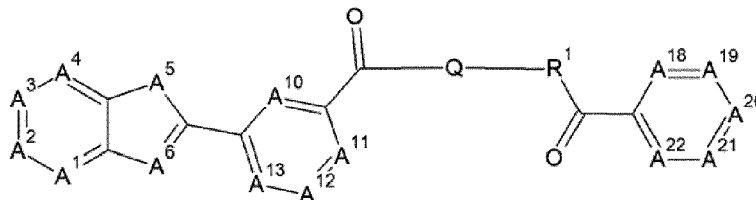
R<sup>1</sup> es alqueno opcionalmente sustituido que contiene opcionalmente uno o dos heteroátomos; o

30

en donde R<sup>1</sup> es alqueno opcionalmente sustituido.

3. El compuesto de la reivindicación 1, en donde:

35 Z-Y-Q-Y' es:



40 Q es piperazin-1,4-diilo o piperazin-1,4-diilo sustituido;

A<sup>1</sup>, A<sup>2</sup>, A<sup>3</sup>, A<sup>4</sup>, A<sup>11</sup>, A<sup>12</sup>, A<sup>13</sup>, A<sup>18</sup>, A<sup>20</sup> y A<sup>22</sup> son C(R<sup>3</sup>);

A<sup>5</sup> es N(R<sup>3</sup>);

A<sup>6</sup> y A<sup>10</sup> son N; y

R<sup>1</sup> es alqueno opcionalmente sustituido.

45 4. El compuesto de la reivindicación 3, en donde R<sup>1</sup> es alqueno, opcionalmente sustituido, C1, C2 o C3; alqueno, no

sustituido, C1, C2 o C3; o alquileo C1, C2 o C3 sustituido con uno o más grupos alquilo.

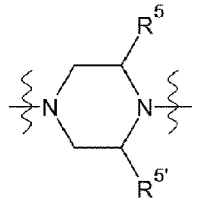
5. El compuesto de la reivindicación 3, en donde R<sup>1</sup> es alquileo C1 no sustituido.

6. El compuesto de la reivindicación 3, en donde R<sup>1</sup> es alquileo C1 sustituido con uno o dos grupos alquilo.

7. El compuesto de la reivindicación 3, en donde:

Q es:

10



y  
R<sup>5</sup> y R<sup>5'</sup> son cada uno oxo.

15

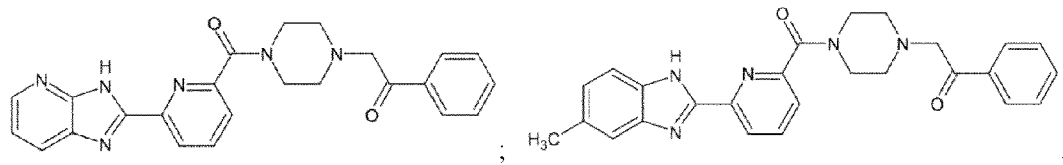
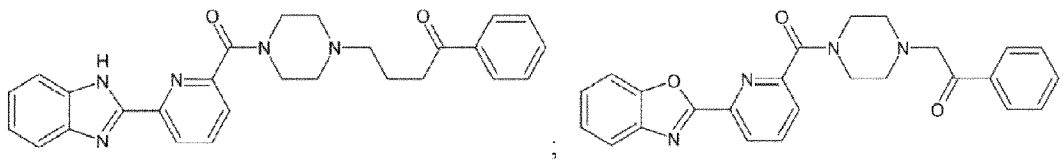
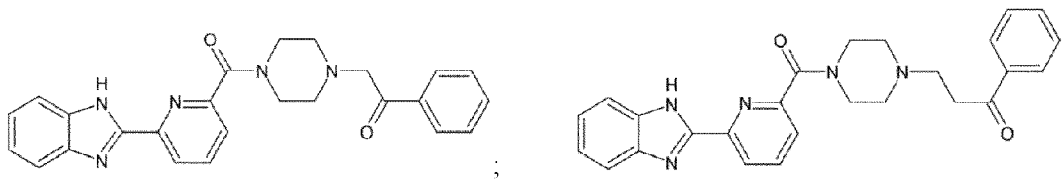
8. El compuesto de la reivindicación 3, en donde el R<sup>3</sup> en A<sup>20</sup> es ciano.

9. El compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde R<sup>3</sup> en cada caso, a menos que se indique lo contrario, es independientemente un átomo de hidrógeno, un átomo de halógeno, alquilo C1-C6, hidroxilo, metoxi, carboxi, acetilo, trifluorometilo, amino, cicloalquilo, un grupo heterocíclico no aromático, arilo o heteroarilo.

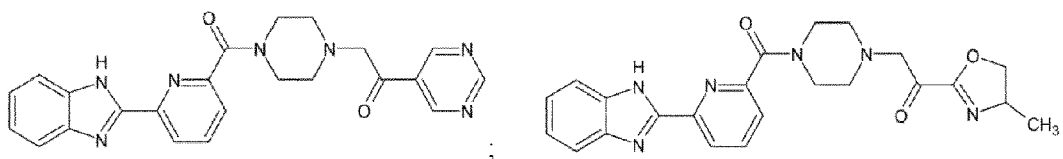
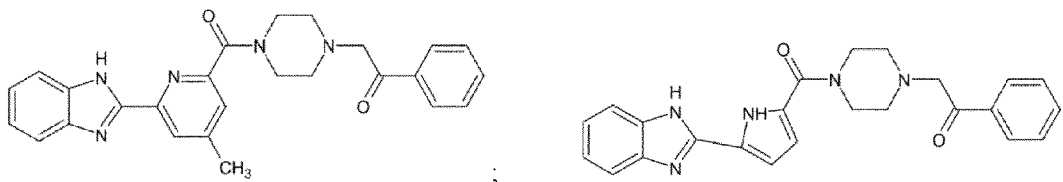
20

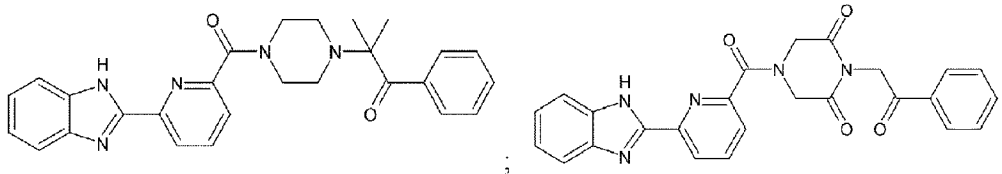
10. El compuesto de la reivindicación 1, en donde el compuesto se selecciona entre:

25

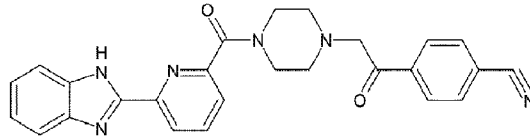


30





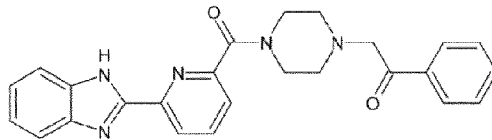
y



5

o una sal farmacéuticamente aceptable de cualquiera de los anteriores.

11. El compuesto de la reivindicación 1, en donde el compuesto es:

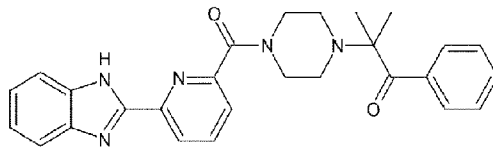


10

o una sal farmacéuticamente aceptable de este.

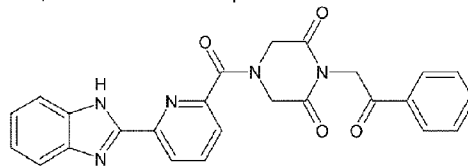
12. El compuesto de la reivindicación 1, en donde el compuesto es:

15



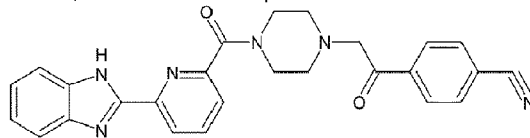
o una sal farmacéuticamente aceptable de este.

20 13. El compuesto de la reivindicación 1, en donde el compuesto es:



o una sal farmacéuticamente aceptable de este.

25 14. El compuesto de la reivindicación 1, en donde el compuesto es:



o una sal farmacéuticamente aceptable de este.

30 15. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, para su uso en un método de tratamiento de una afección, en donde la afección comprende al menos una de una enfermedad autoinmunitaria, una enfermedad inflamatoria, una enfermedad inflamatoria crónica, diabetes y una enfermedad infecciosa, opcionalmente en donde la afección comprende al menos uno de lupus, síndrome de Sjögren, artritis reumatoide, diabetes de tipo 1, enfermedad inflamatoria intestinal, una enfermedad vírica y esteatohepatitis no alcohólica.

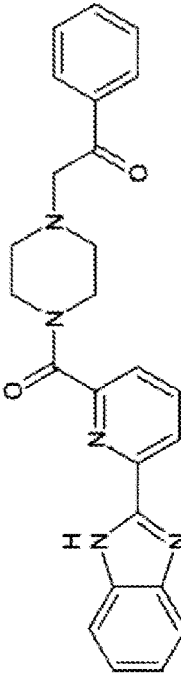
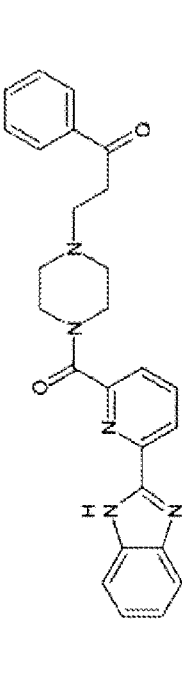
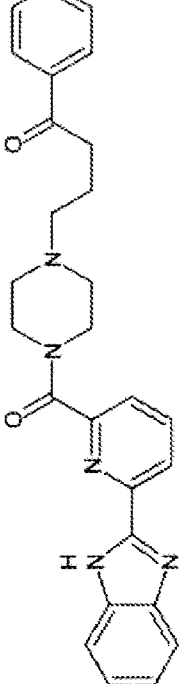
ID	Estructura	Afinidad (kcal/mol)
BT-63		-7,8
BT-64		-7,7
BT-65		-7,5

FIG. 1A

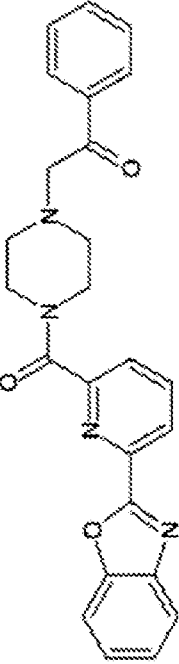
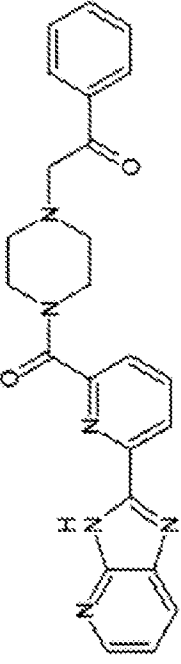
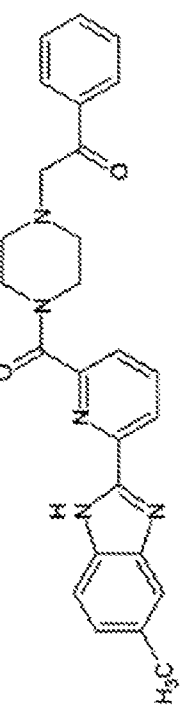
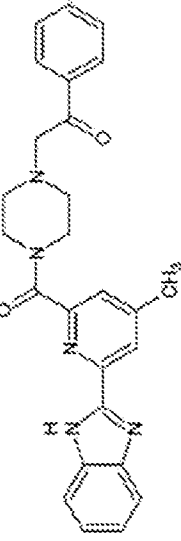
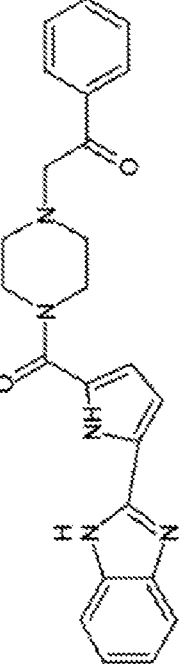
ID	Estructura	Afinidad (kcal/mol)
BT-71		-7,9
BT-72		-7,7
BT-73		-7,9
BT-74		-8,0
BT-75		-7,5

FIG. 1B

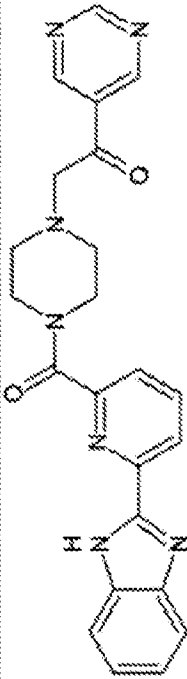
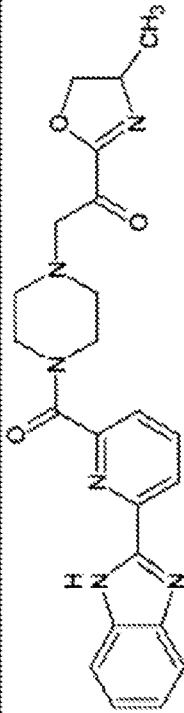
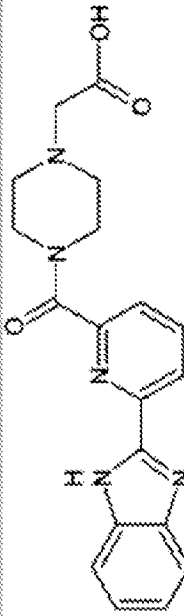
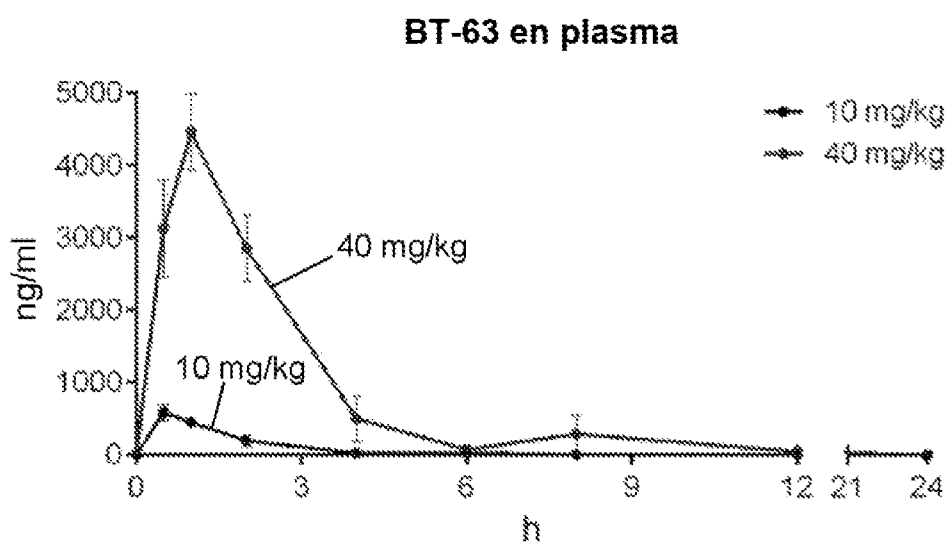
ID	Estructura	Afinidad (kcal/mol)
BT-95		-8,1
BT-96		-7,7
BT-99*		-7,2

FIG. 1C

\*BT-99 es solo para referencia



**FIG. 2**

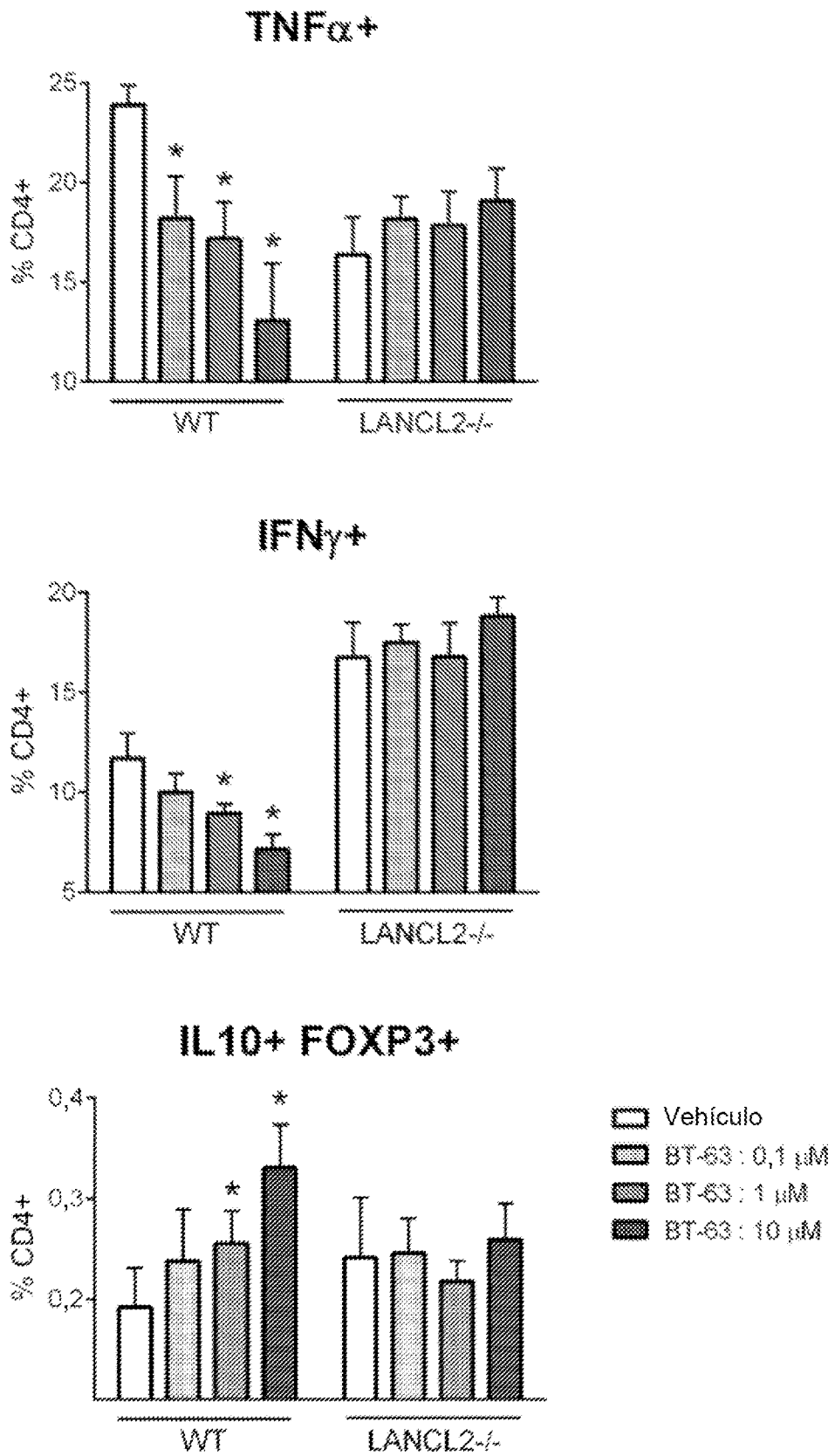


FIG. 3

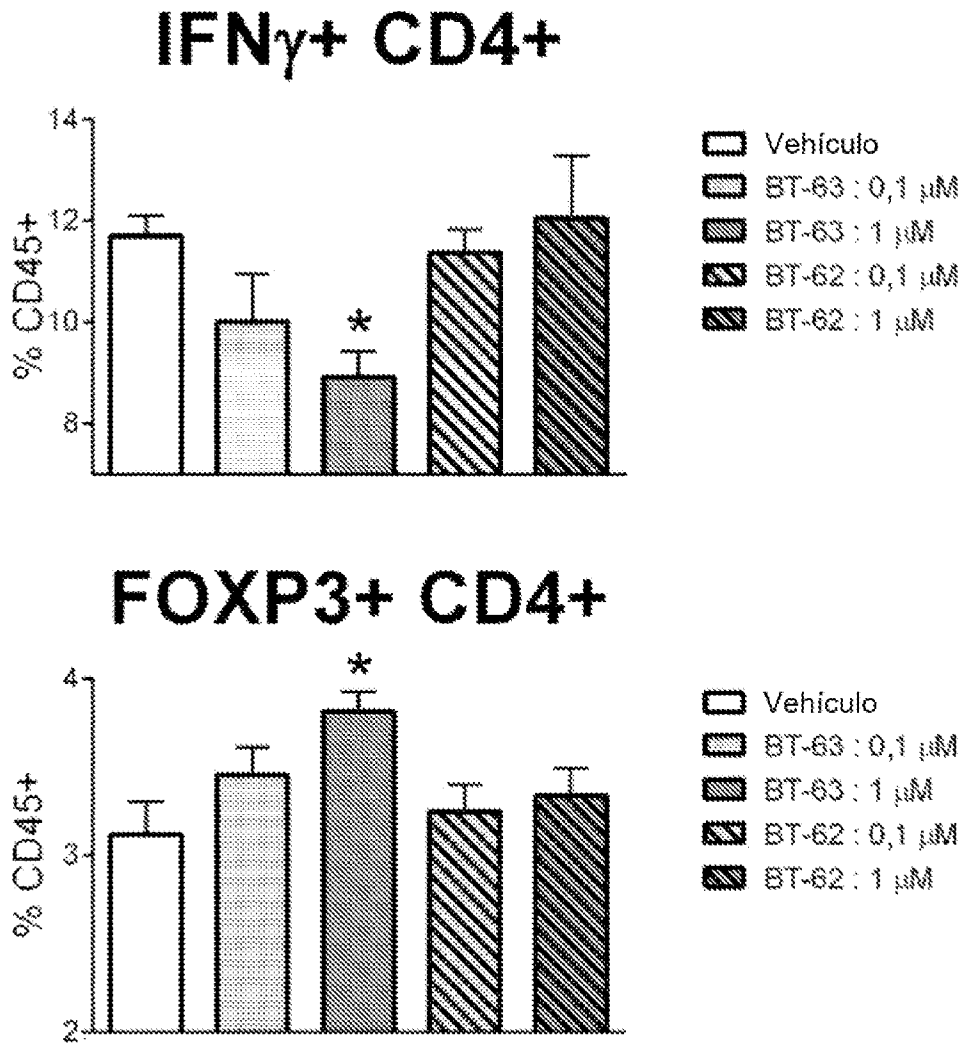


FIG. 4A

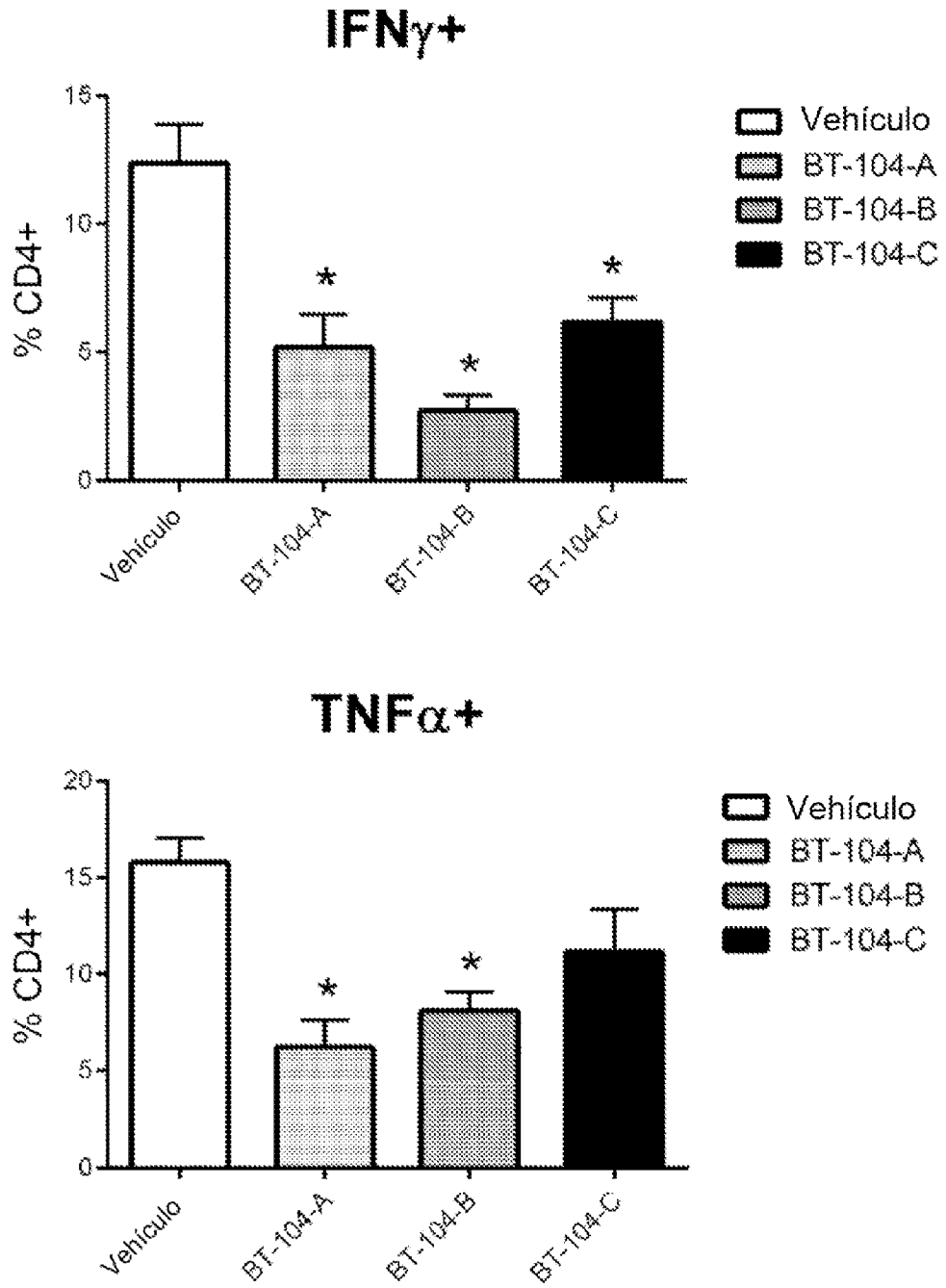


FIG. 4B

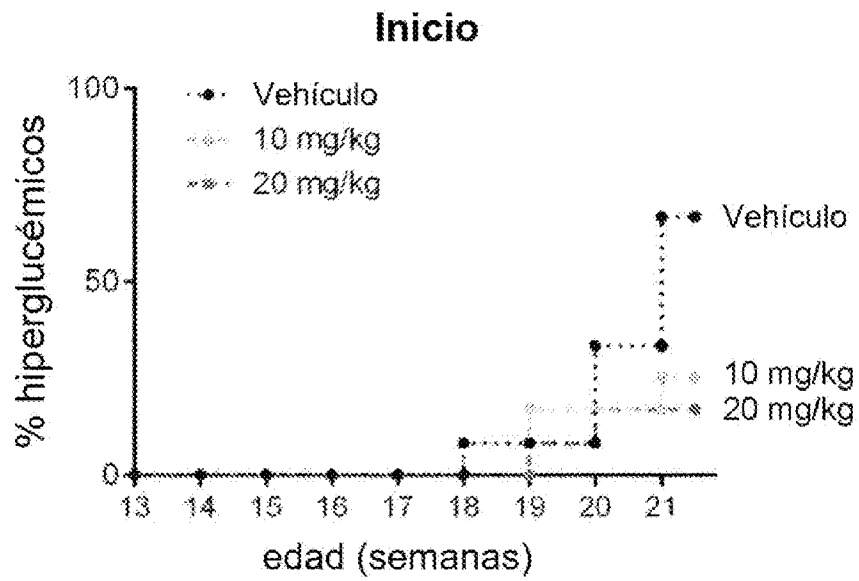
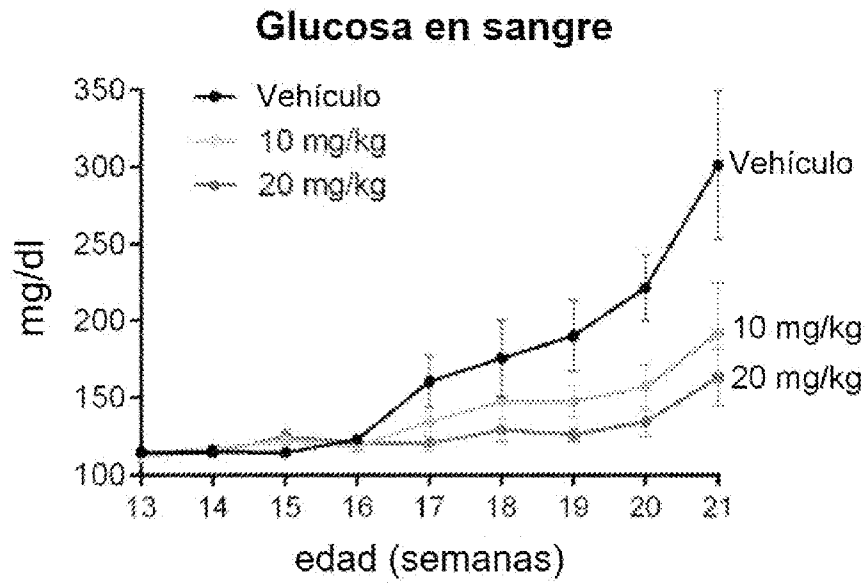


FIG. 5

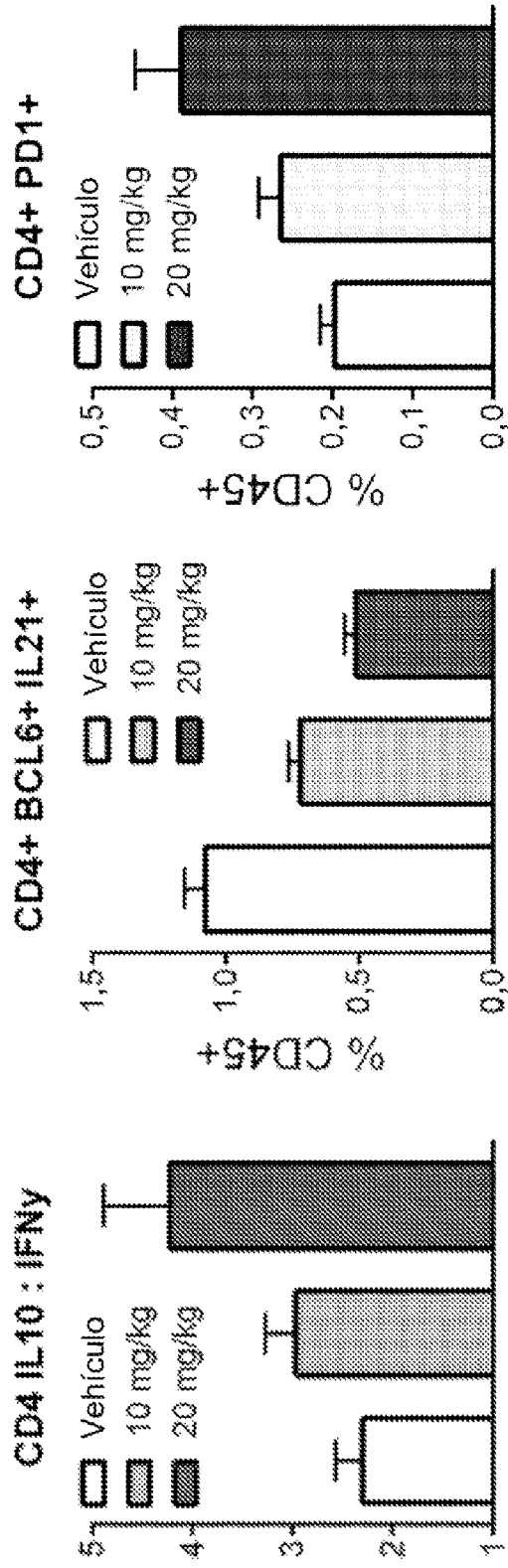


FIG. 6

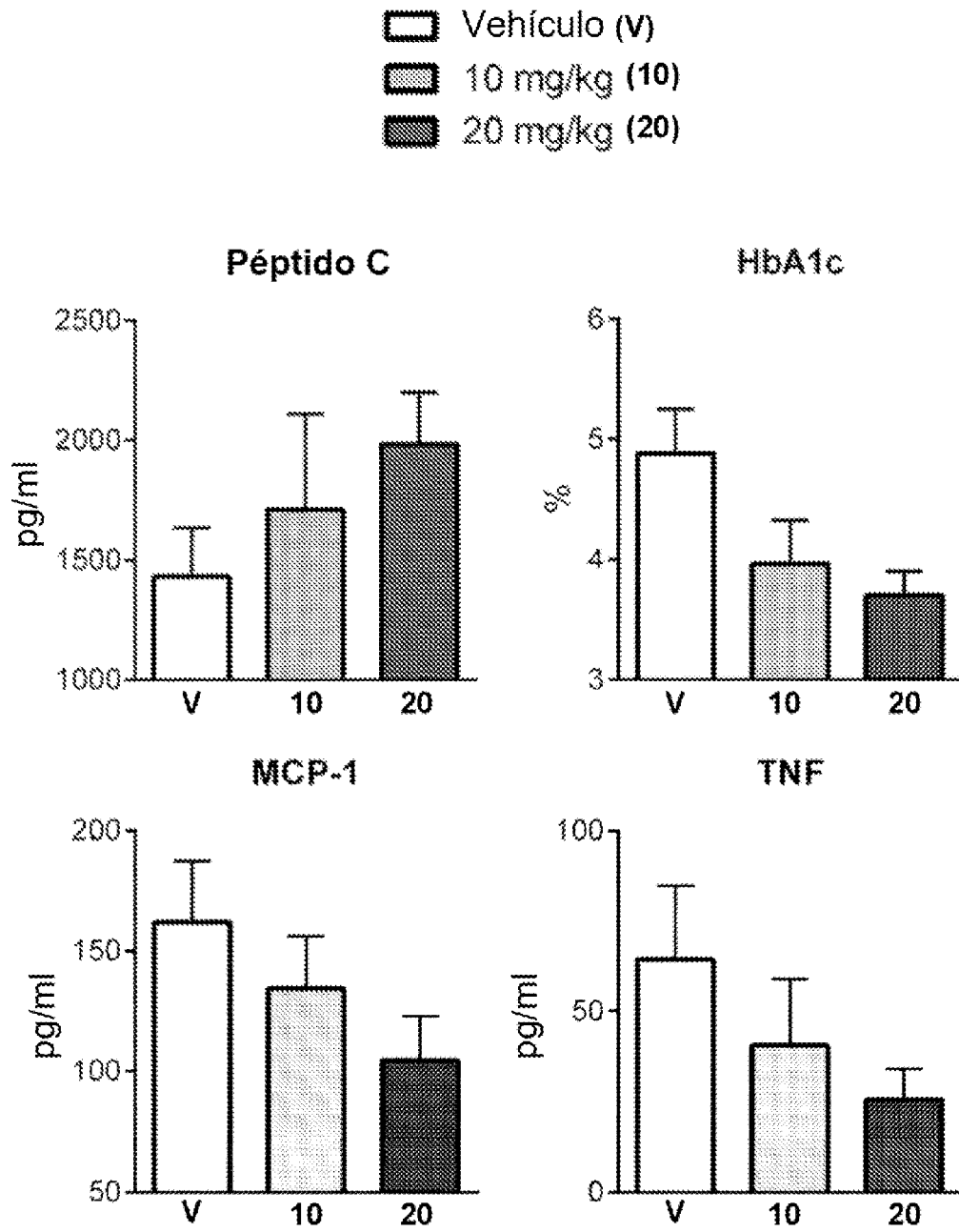


FIG. 7

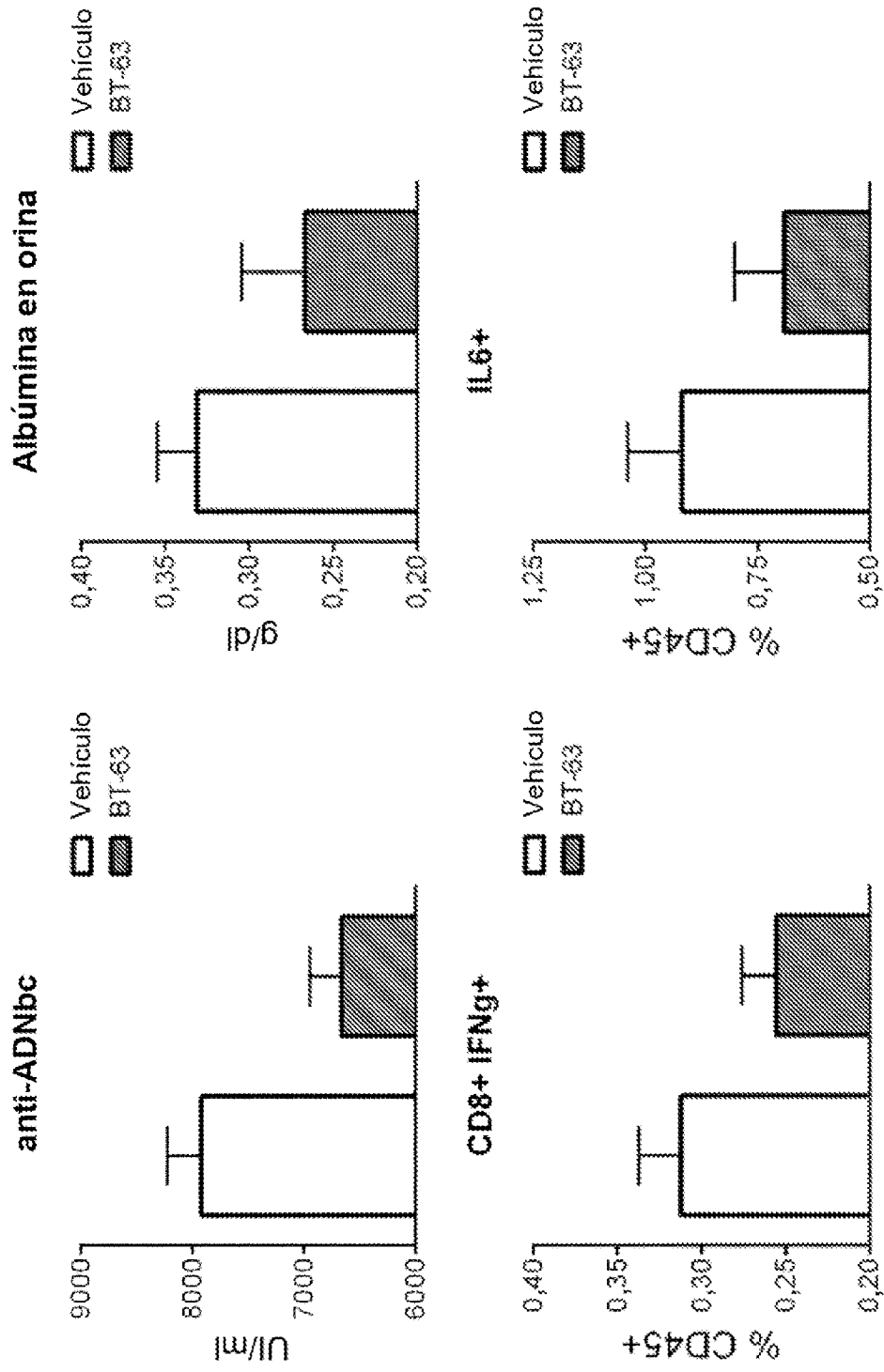


FIG. 8

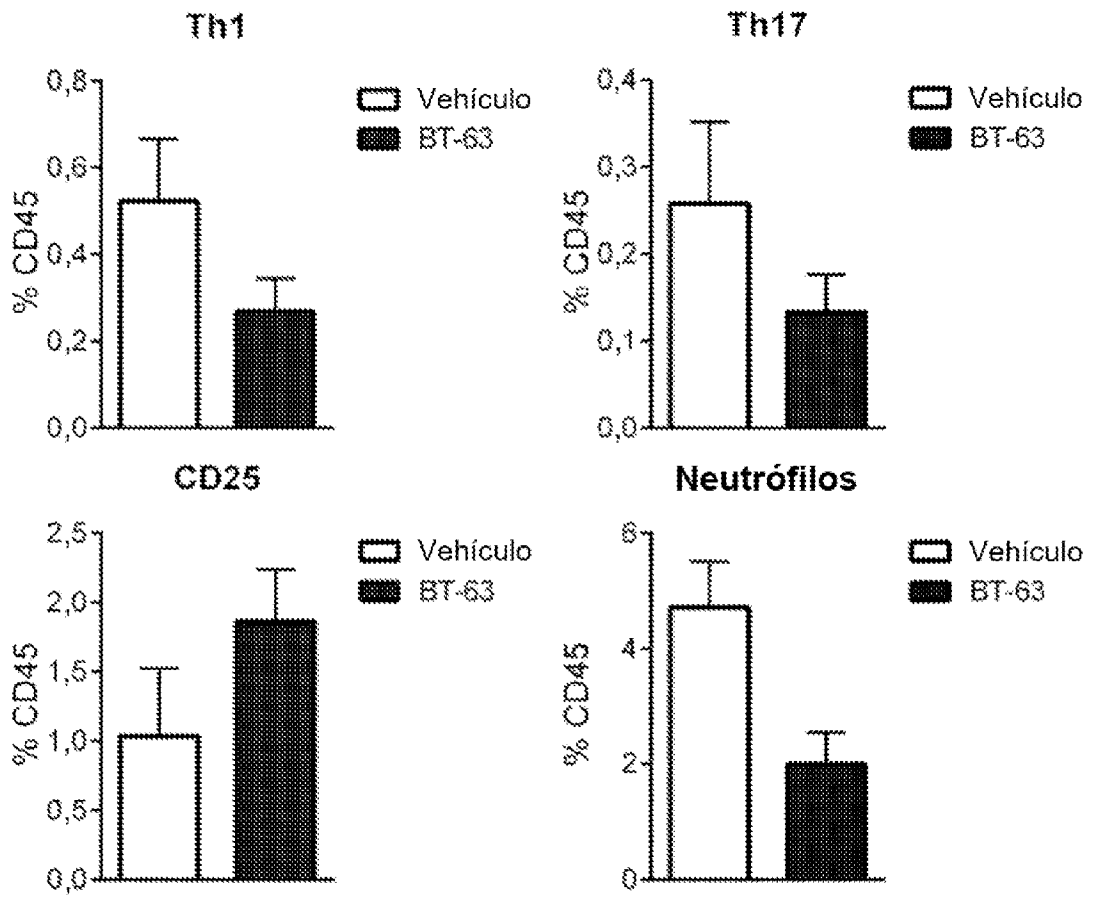


FIG. 9

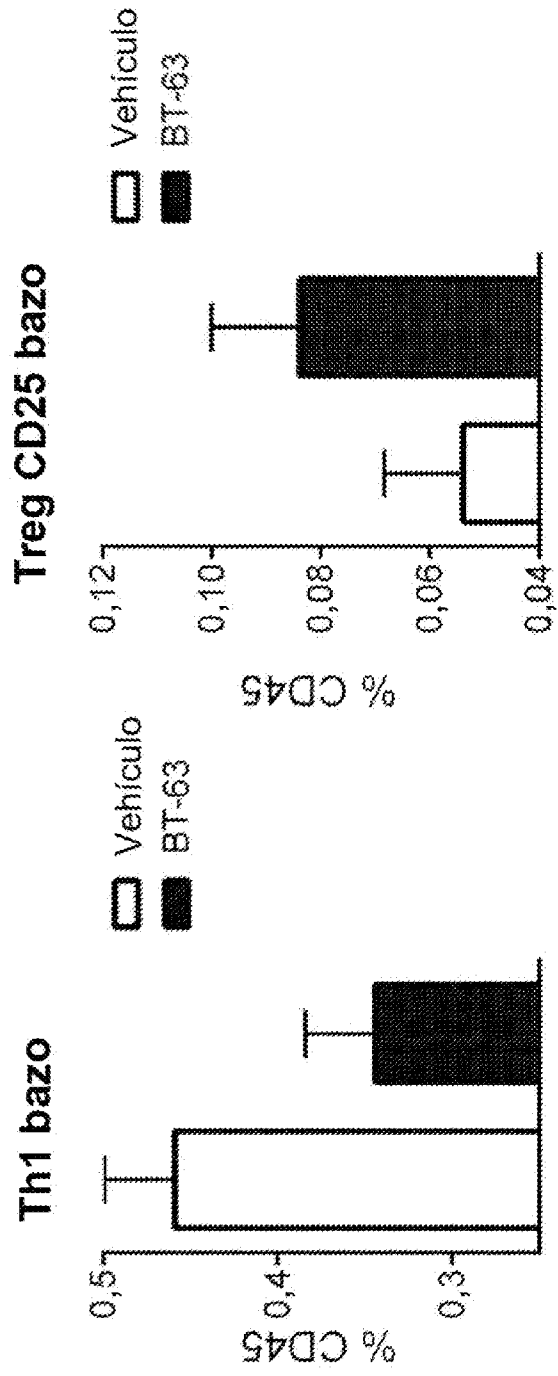


FIG. 10

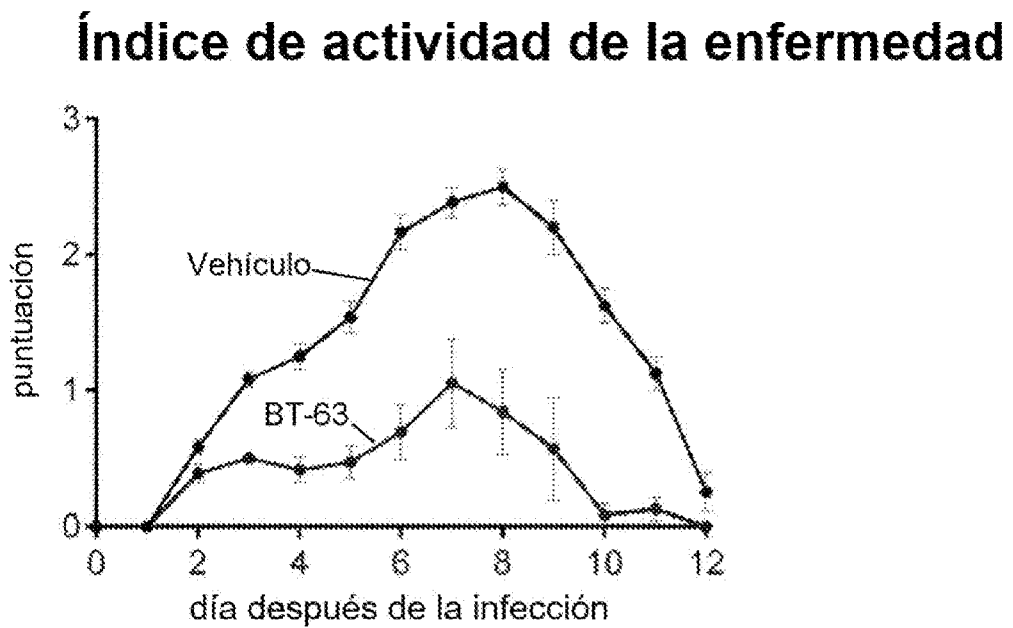
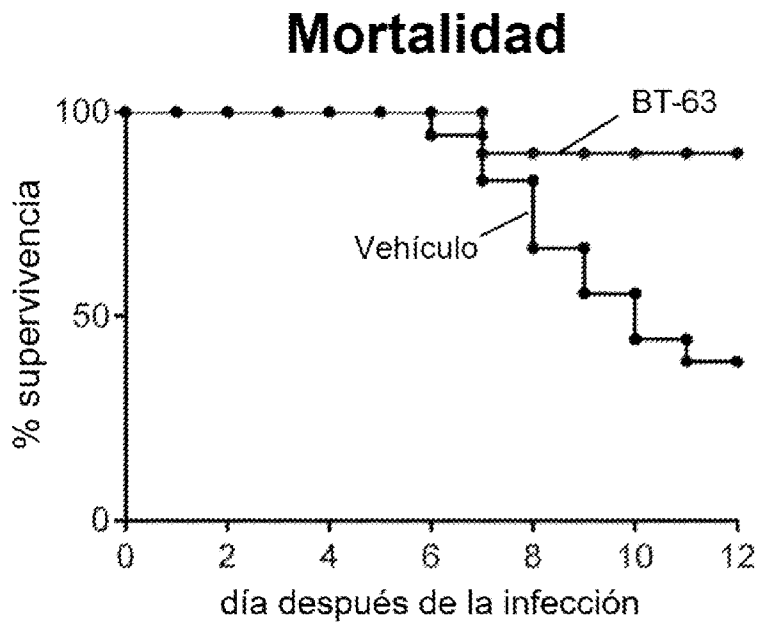


FIG. 11

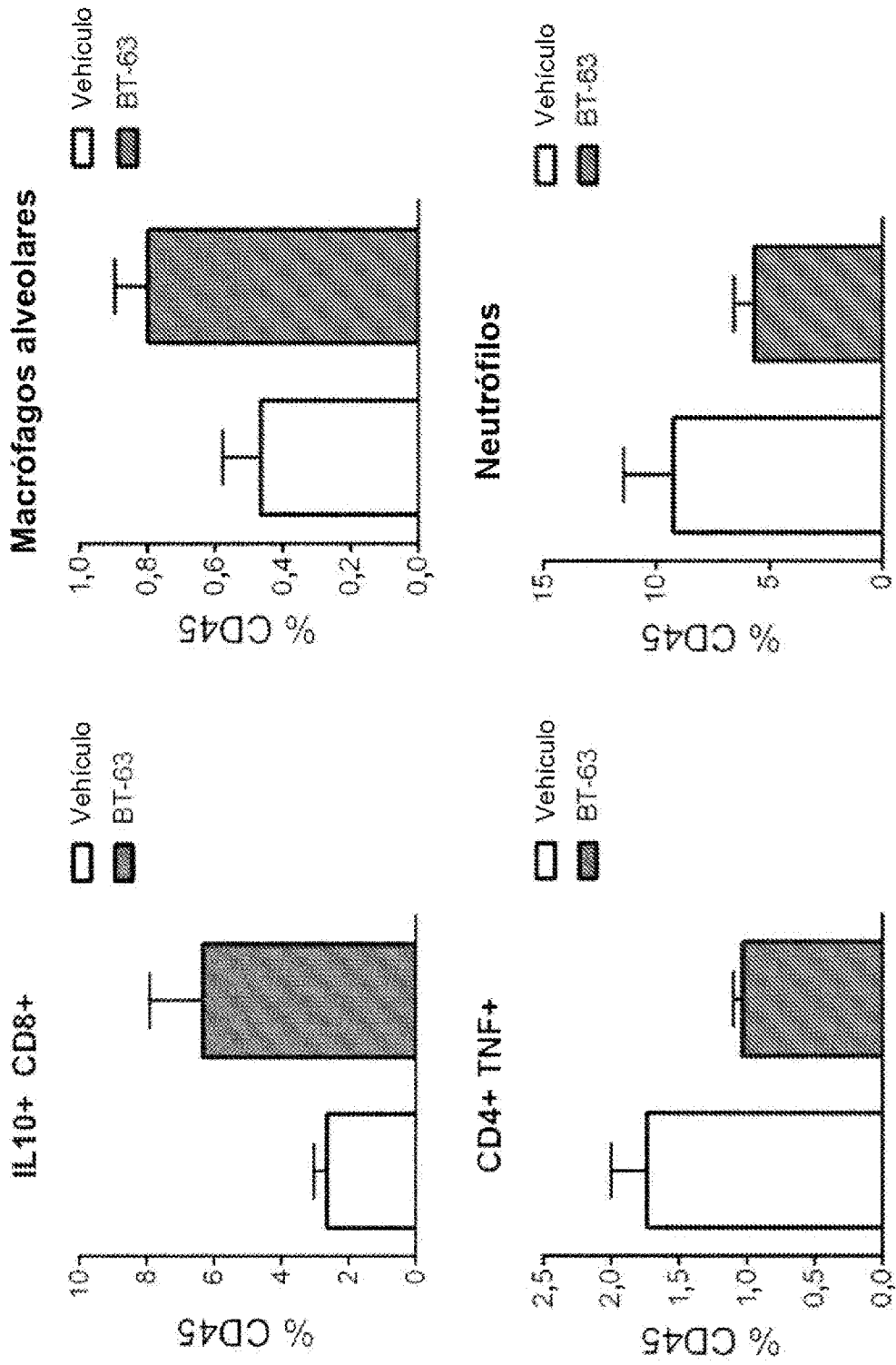


FIG. 12

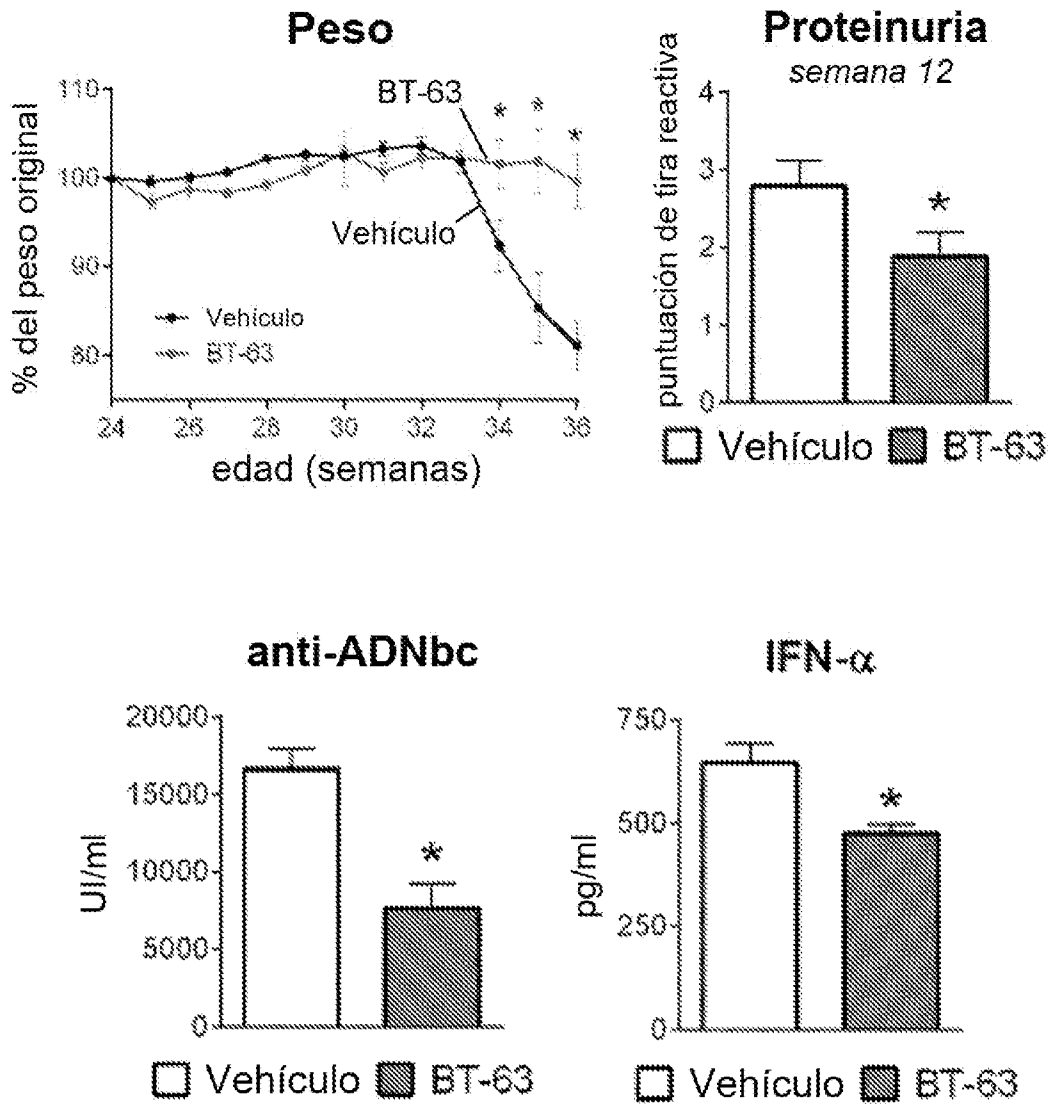


FIG. 13

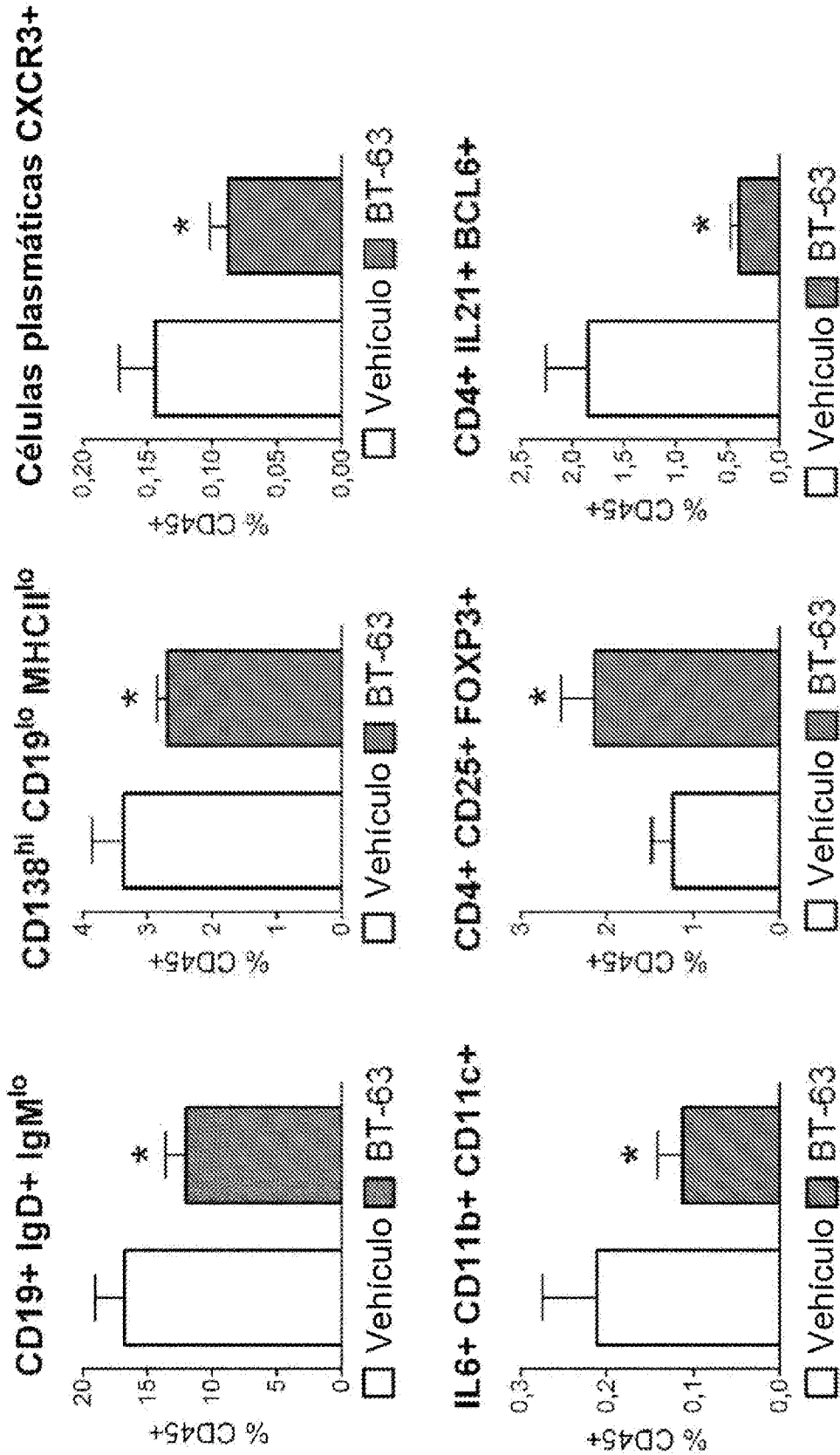


FIG. 14

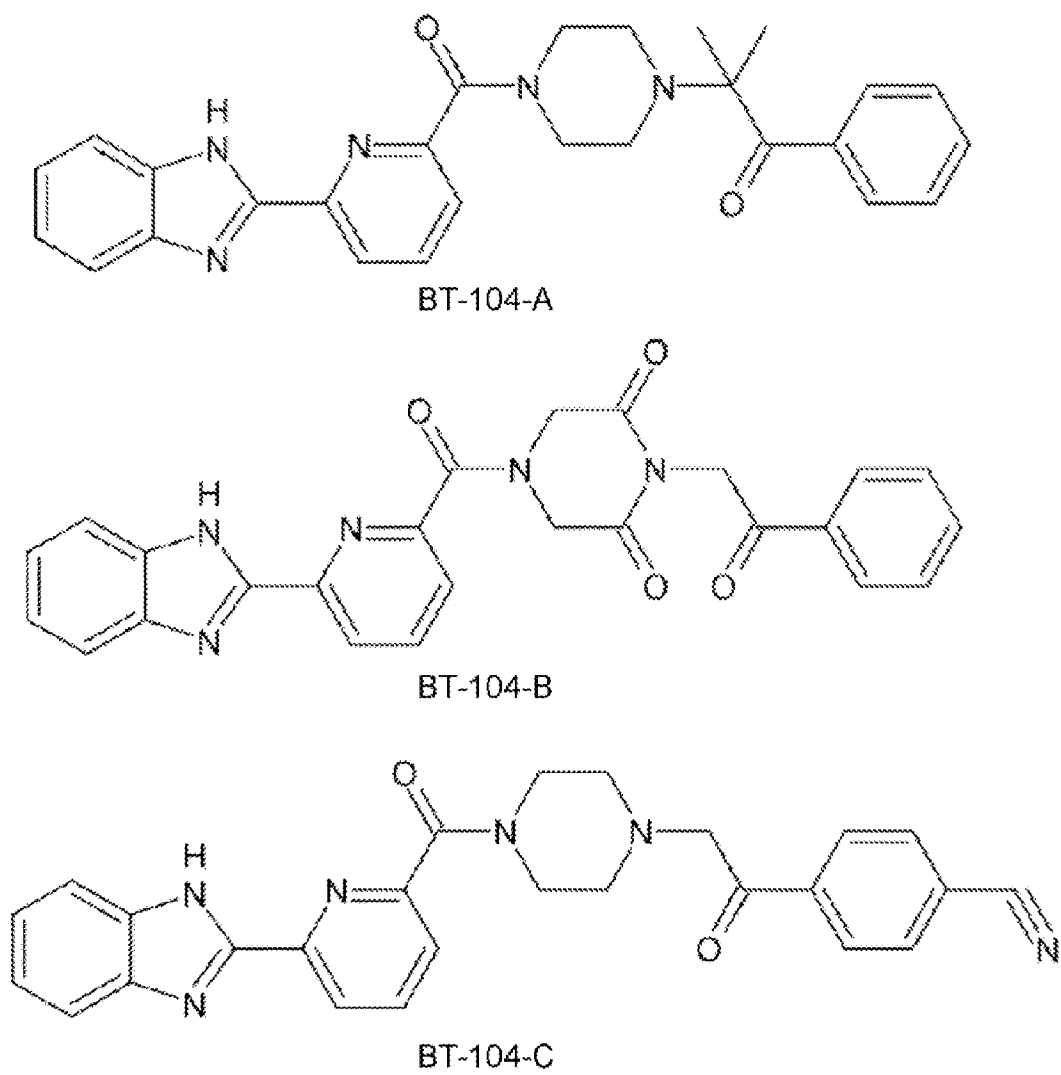


FIG. 15

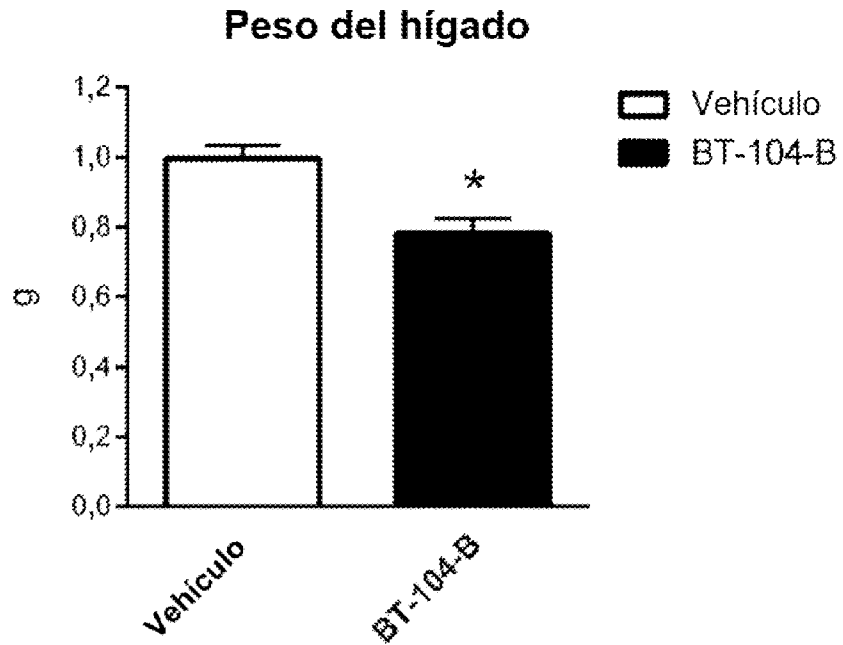


FIG. 16A

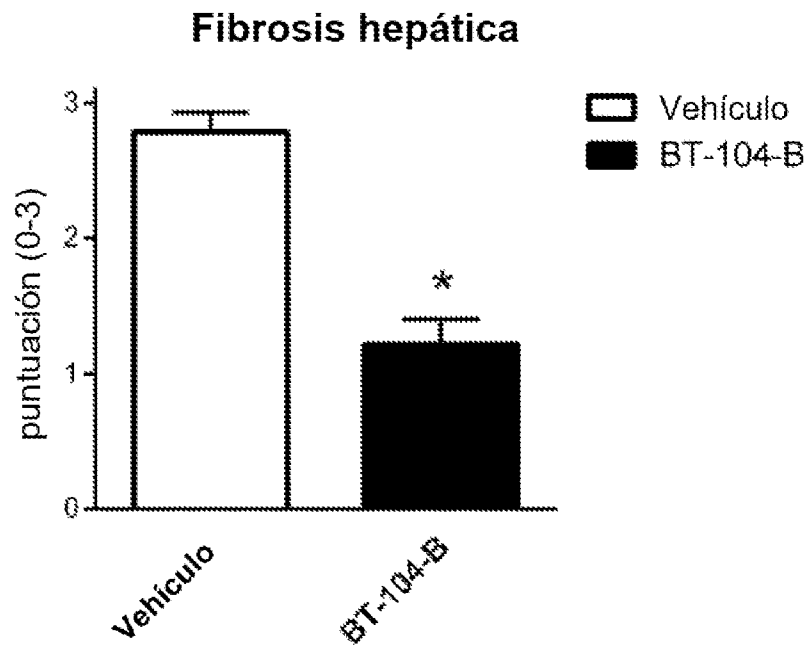


FIG. 16B

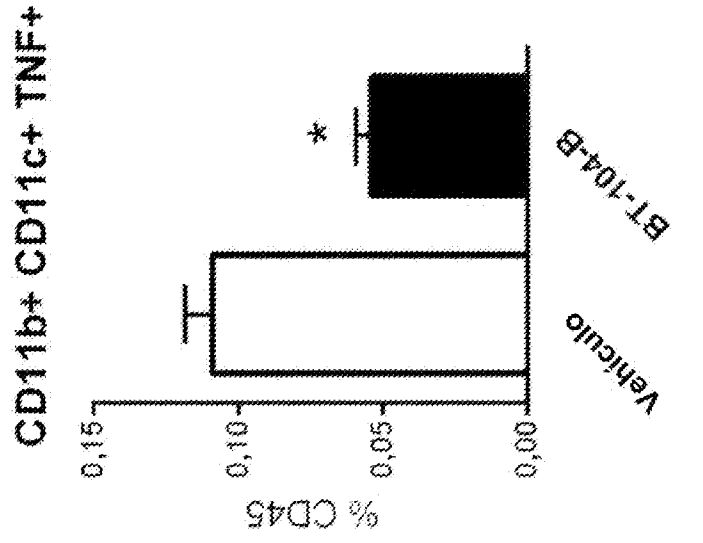


FIG. 17C

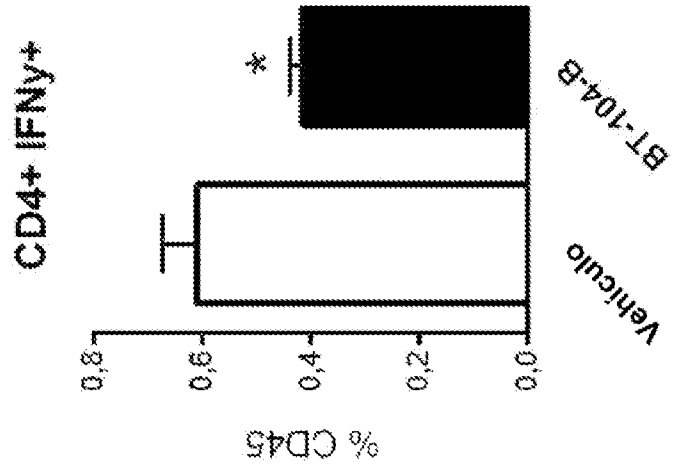


FIG. 17B

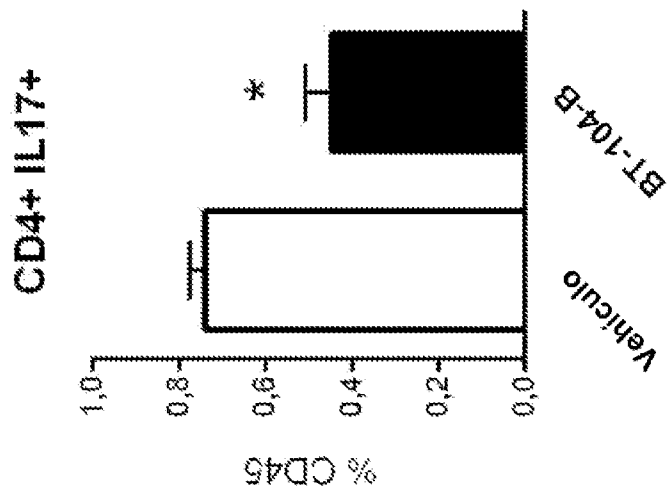


FIG. 17A

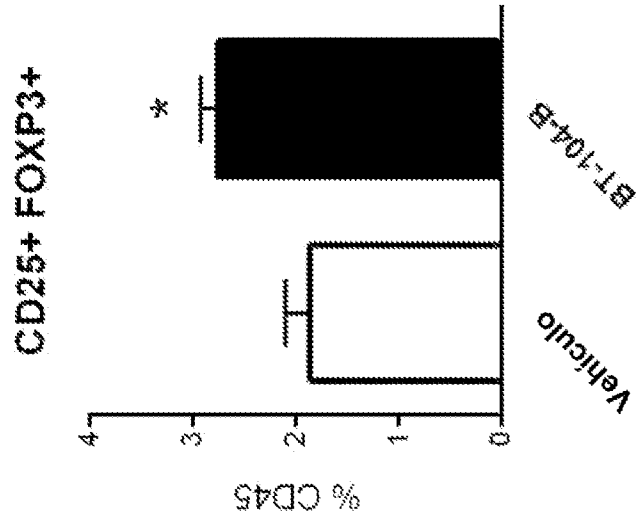


FIG. 18C

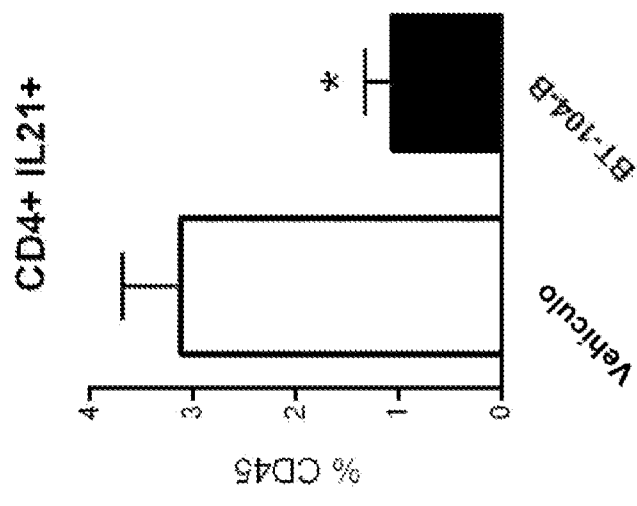


FIG. 18B

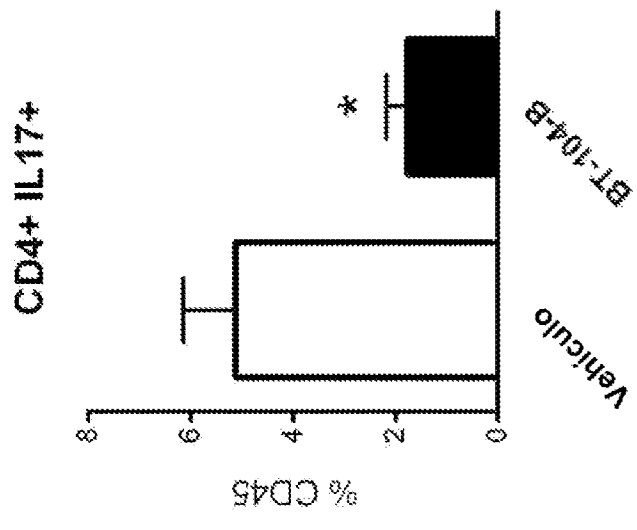


FIG. 18A