



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) PI 0910145-4 A2



(22) Data do Depósito: 18/06/2009

(43) Data da Publicação Nacional: 25/08/2020

(54) Título: COMPOSTO DE FÓRMULA (I) E QUALQUER UM DOS SEUS DERIVADOS, USO DO COMPOSTO, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, E, USO DA COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA

(51) Int. Cl.: C07D 311/60; A61K 31/353.

(30) Prioridade Unionista: 30/06/2008 ES P200801964.

(71) Depositante(es): CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS.

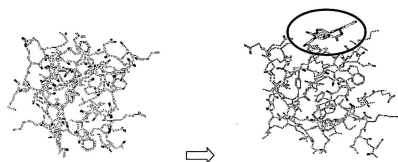
(72) Inventor(es): BALBINO ALARCÓN SÁNCHEZ; ÁNGEL RAMÍREZ ORTIZ; ALDO BORROTO REVUELTA; ANTONIO MORREALE DE LÉON.

(86) Pedido PCT: PCT ES2009070239 de 18/06/2009

(87) Publicação PCT: WO 2010/000900 de 07/01/2010

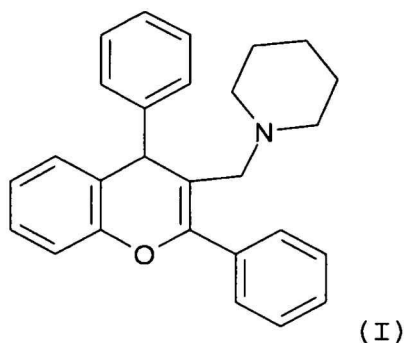
(85) Data da Fase Nacional: 28/12/2010

(57) Resumo: COMPOSTO DE FÓRMULA (I) E QUALQUER UM DOS SEUS DERIVADOS, USO DO COMPOSTO, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, E, USO DA COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA A presente invenção refere-se a um composto de fórmula estrutural (I) e seus derivados, para uso como medicamento. Preferivelmente como agente imunossupressor com base na interrupção da interação entre TCR-Nck.



COMPOSTO DE FÓRMULA (I) E QUALQUER UM DOS SEUS DERIVADOS, USO DO COMPOSTO, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, E, USO DA COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA

A presente invenção diz respeito a um composto de
5 fórmula estrutural (I)



e seus derivados, para uso como medicamento.

~~Preferivelmente, para uso como agente imunossupressor com~~
base na interrupção da interação entre TCR-Nck.

ESTADO DA TÉCNICA ANTERIOR

10 Os linfócitos T desempenham um papel central na
rejeição de alotransplantes e, de forma mais ou menos
directa, na origem de doenças auto-imunes. Por isso, os
actuais fármacos imunossupressores baseiam o seu mecanismo
de ação na inibição da activação dos linfócitos T. Estes
15 imunossupressores apresentam uma baixa toxicidade, pois não
inibem as vias linfocitárias de forma específica.

Os linfócitos T são activados através do receptor
de antígenos (TCR) que reconhece o complexo major de
histocompatibilidade (MHC) do órgão transplantado como algo
20 estranho. O TCR é formado por 6 subunidades, duas das quais
(TCR α e TCR β) são responsáveis pela identificação de MHC
ligado a péptidos antigénicos, enquanto que as restantes
quatro (CD3 γ , CD3 δ , CD3 ϵ e CD3 ζ) são responsáveis pela
transmissão de sinais ao citoplasma do linfócito (revisto
25 por Alarcon, B., Gil, D., Delgado, P. and Schamel, W.W.

(2003) *Immunol Rev*, 191, 38-46). Um dos processos iniciais que ocorrem após a ligação do TCR por parte do MHC é a activação das tirosina cinases da família src, Lck e Fyn, que fosforilam as tirosinas das ITAM's das subunidades de CD3 que, por sua vez, se convertem em locais de fixação das tirosina cinases da família Syk (ZAP70 e Syk). Até há bem pouco tempo, acreditava-se que este era o esquema linear de transmissão de sinais, e que a partir das cinases da família Syk (essencialmente ZAP70) se produzia a divergência na cadeia de activação que resulta na activação de diversos factores de transcrição, incluindo NFAT, alvo dos fármacos imunossuppressores ciclosporina A e FK506 (Lin, J. and Weiss, A. (2001) *J Cell Sci*, 114, 243-244). Sendo assim, os autores da presente invenção descobriram há alguns anos atrás que, para se activar, o TCR sofre uma alteração conformacional que resulta no recrutamento do adaptador Nck directamente numa sequência rica em prolinas (PRS) da subunidade CD3 ϵ (Gil, D., Schamel, W.W., Montoya, M., Sanchez-Madrid, F. and Alarcon, B. (2002) *Cell*, 109, 901-912). Esta interacção entre TCR-Nck foi dada como essencial para a activação de TCR mediante experiências de sobreexpressão do domínio SH3.1 amino-terminal de Nck (que se liga a CD3 ϵ) e mediante a introdução dos linfócitos T do anticorpo APA1/1, que se liga a PRS, bloqueando-a.

25 DESCRIÇÃO DA INVENÇÃO

Um dos problemas associados aos actuais imunossuppressores diz respeito à sua toxicidade, que faz com que não inibam as vias linfocitárias de forma específica.

A presente invenção proporciona um composto 30 imunossupressor mais específico de linfócitos T e com menos efeitos secundários que os actualmente existentes, com base na interrupção da interacção TCR-Nck.

Para seleccionar o composto da presente invenção,

foi tida em conta a alteração conformacional do TCR e o mecanismo de início da transmissão de sinais, passo fundamental para o recrutamento de proteínas efectoras.

A alteração conformacional do TCR, que ocorre após a união de anticorpos estimuladores a MHC, colocou-se em manifesta evidência mediante um ensaio de "pull-down", onde o TCR se une de forma indutível a uma matriz da proteína de fusão GST-Nck. Este ensaio bioquímico não permite identificar de forma individual as células cujo TCR está a sofrer uma alteração conformacional. No entanto, os autores da presente invenção demonstraram que o anticorpo APA1/1 também reconhece a alteração conformacional (Risueno, R.M., Gil, D., Fernandez, E., Sanchez-Madrid, F. and Alarcon, B. (2005) *Blood*, 106, 601-608). O anticorpo pode ser usado em preparados de linfócitos T para cultura e também em cortes submetidos a técnica imunohistoquímica. Este reagente permite demonstrar, através de um outro procedimento distinto, o "pull-down" da existência da alteração conformacional, para além de demonstrar que a alteração conformacional ocorre *in vivo*. Além disso, o anticorpo reconhece as sinapses imunitárias formadas entre os linfócitos T e as células que contêm antigénio carregadas com um péptido antagonista, mas não as sinapses formadas por um agonista parcial/antagonista. Estes dados sugerem que a alteração conformacional no TCR poderia estar subjacente à distinção entre agonistas fortes e fracos por parte dos linfócitos T e poderia activar cadeias de activação específicas durante o reconhecimento de ligandos fortes. Esta hipótese parece ser corroborada pelo facto de que durante o desenvolvimento tímico da alteração conformacional (visualizado através de coloração com APA1/1) ocorre durante o reconhecimento de ligandos que induzem uma seleção negativa, mas não durante o reconhecimento de ligandos que

induzem uma seleção positiva (Risueno, R.M., van Santen, H.M. and Alarcon, B. (2006) *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 103, 9625-9630). Por outro lado, a única consequência conhecida da alteração conformacional no TCR é a exposição da PRS a CD3 ϵ , ainda que não seja descartada a hipótese de que a alteração conformacional se transmita também às regiões citoplasmáticas das outras subunidades CD3 e influencia globalmente todo o processo de iniciação da transmissão de sinais pelo TCR, incluindo a fosforilação nas tirosinas dos ITAM's (Minguet, S., Swamy, M., Alarcon, B., Luescher, I.F. and Schamel, W.W. (2007) *Immunity.*, 26, 43-54). Contudo, o recrutamento de Nck na PRS de CD3 ϵ constitui um possível mecanismo da transmissão da alteração conformacional a vias de activação intracelulares (Gil, D., Schamel, W.W., Montoya, M., Sanchez-Madrid, F. and Alarcon, B. (2002) *Cell*, 109, 901-912).

A fim de demonstrar a importância da interação entre Nck-CD3 ϵ na activação de linfócitos T e validar esta interação como alvo de agentes imunomoduladores, foi produzido um modelo de péptidos sintéticos que mimetizam a sequência da PRS e que poderiam bloquear o local de ligação de Nck à CD3 ϵ . Assim, obteve-se um péptido, denominado 11R085, que é 300 vezes mais potente que um péptido com a sequência "wild type" na inibição da interação de CD3 ϵ com o domínio SH3.1 de Nck. Utilizando este péptido, conseguimos inibir de forma específica a proliferação de linfócitos T humanos tanto de CD4+ como de CD8+, em resposta à estimulação com anticorpos anti-CD3, com um IC50 de aproximadamente 20 μ M, enquanto que a proliferação de linfócitos T humanos dependente de um receptor diferente, o IL2R, não é praticamente afectada por tal péptido, inclusivamente em concentrações 3 vezes superiores.

Assim sendo, o péptido 11R085 inibe a activação

iniciada pelo TCR mas não a activação mediada por outro receptor e, por tal, é específico do alvo molecular para o qual foi concebido.

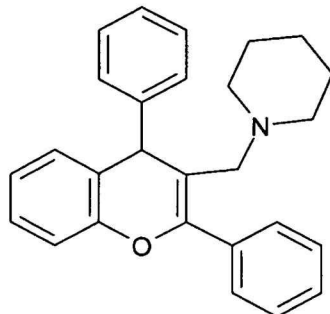
5 O péptido 11R085 também inibe a produção de IL2 e a proliferação induzida por antigénio em linfócitos primários de ratos transgénicos OT-I com um IC50 de aproximadamente 5 μ M. Fica, assim, validada a interação entre Nck-CD3 ϵ como alvo molecular para o desenvolvimento de imunossuppressores.

10 A partir de então, e utilizando estratégias bioinformáticas de seleção, realizou-se uma filtragem virtual de compostos que se unem ao domínio SH3.1, conforme se descreve nos exemplos da invenção. Após esta filtragem, foram seleccionados os dez compostos que teoricamente se encaixavam
15 ~~melhor numa bolsa hidrófoba de SH3.1, encarregado do~~ reconhecimento da sequência de PRS de CD3 ϵ (veja-se a FIG. 1). Todos os compostos, estruturalmente muito diferentes, ~~apresentaram um certo grau de actividade, mas aquele que~~ apresenta um maior grau de actividade e menor toxicidade, inclusivamente a doses elevadas, (FIG. 7) é o composto
20 denominado por CBM-1, composto de fórmula estrutural (I).

O composto CBM-1 apresentou uma boa actividade e capacidade imunossupressora, e inibe a proliferação de linfócitos T humanos induzida por anticorpos anti-CD3, mas não a proliferação dependente de IL2. Ainda assim, inibe a
25 proliferação de linfócitos T de ratinho dependente de antigénio e também inibe a libertação de IL2. Nos linfócitos humanos estimulados com anticorpos anti-CD3 e anti-CD28 inibe a produção de IFN γ , de IL-10 e de TNF β , bem como a geração de células humanas produtoras de IFN γ , em resposta a anti-CD3 e
30 anti-CD28. Estes dados demonstram que este composto possui uma ação inibidora da activação de linfócitos T, tanto de ratinho como humano, a concentrações baixas de a partir 0.1 μ M, e preferivelmente no intervalo de entre 0,1 e 1 μ M.

Assim, o CBM-1 é activo enquanto imunossupressor.

Por tudo isso, um primeiro aspecto da presente invenção refere-se a um composto de fórmula (I):



(I)

ou quaisquer derivados do mesmo, entre os quais se incluem os seus sais, isómeros ou misturas de isómeros, pró-fármacos, formas cristalinas, etc. para seu uso como medicamento, preferivelmente como imunossupressor.

Entende-se por isómeros ou misturas de isómeros na presente invenção:

10. 1) isómeros em disposição Z ou E definidos pela posição dos substituintes em relação às ligações múltiplas que apresentam os compostos,

2) isómeros ópticos ou enantiómeros, originados pela presença de centros quirais (átomos unidos a quatro substituintes diferentes) que provocam a diferenciação entre enantiómeros relativamente à sua actividade óptica (rotação da luz polarizada ao passar através de uma solução do enantiómero),

20 3) diastereoisómeros, isómeros com, pelo menos, dois centros quirais, estando os substituintes de um dos referidos centros dispostos de forma idêntica nos diastereoisómeros e os substituintes de pelo menos outro dos centros dispostos de forma distinta entre ambos.

25 Entende-se por "pró-fármacos" dos compostos de fórmula (I) qualquer derivado (por exemplo, ésteres, carbamatos, amidas, etc.) que, quando administrado a um

indivíduo, é capaz de proporcionar, directa ou indirectamente, um ou vários dos compostos da referida fórmula (I).

Também se incorpora na definição de derivados
5 "formas cristalinas" dos compostos de fórmula (I) em estado livre ou como solvatos. O termo "solvato", conforme utilizado, inclui solvatos que possam ser utilizados na composição de um medicamento, e solvatos úteis na preparação de tal medicamento. Os solvatos podem obter-se através de
10 métodos convencionais de solvatação, conhecidos pelos técnicos no assunto.

Na presente invenção, entende-se por "sais" tanto os sais farmacologicamente aceitáveis como aqueles que não são farmacologicamente aceitáveis mas que, ainda assim, podem ser
15 úteis na preparação de fármacos, pelo que todos os sais dos compostos da invenção, farmacologicamente aceitáveis ou não, estão incluídos no âmbito da presente invenção.

Por último, inclui-se na definição de "derivados" aqueles compostos da invenção que contêm um ou mais átomos
20 isotopicamente enriquecidos. Por exemplo, compostos com uma das fórmulas da invenção nas quais um ou vários átomos de hidrogénio foram substituídos por átomos de deutério ou trítio, um ou vários átomos de carbono foram substituídos por átomos de ^{13}C ou ^{14}C ou um ou vários átomos de azoto foram
25 substituídos por ^{15}N .

O composto de fórmula (I) é capaz de se ligar ao domínio SH3.1 de Nck, interrompendo a interação TCR-Nck e, por isso, é um composto imunossupressor específico de linfócitos T, que apresenta vantagens claras comparativamente
30 com outros imunossuppressores, entre outras, origina menos efeitos secundários.

Por tudo isso, um aspecto da invenção diz respeito ao uso do composto de fórmula estrutural (I) ou qualquer um

dos seus derivados para a preparação de um medicamento destinado ao tratamento e/ou prevenção de doenças advindas da hiperproliferação de linfócitos T.

Preferivelmente, estas doenças são doenças auto-imunes, doenças advindas da rejeição de alotransplantes ou xenotransplantes de órgãos ou tecidos, ou linfomas e/ou leucemias T.

Mais preferivelmente, as doenças auto-imunes são aquelas nas quais a activação de linfócitos T desempenha um papel importante na fase de indução e/ou na fase efectiva, e mais preferivelmente as doenças auto-imunes sistémicas e específicas de um órgão, entre a lista que inclui esclerose múltipla e suas variantes, lúpus eritematoso sistémico, psoríase, vitiligo, artrite reumatóide, asma, psoríase, hepatite auto-imune, diabetes tipo 1, miastenia grave, espondilite anquilosante, doença de Crohn, etc.

Outro aspecto da invenção diz respeito a uma composição farmacêutica que inclui o composto de fórmula estrutural (I), ou qualquer um dos seus derivados supra descritos, e um excipiente farmacêuticamente aceitável.

Em cada um dos casos, a composição adaptar-se-á ao tipo de administração utilizada. Por isso, a composição supra descrita pode apresentar-se sob uma forma farmacêutica de administração por via oral, bem como sob uma forma sólida (por exemplo, comprimidos, drageias, cápsulas, etc.) ou líquida (por exemplo, soluções, suspensões, emulsões, etc.), por via parentérica (por exemplo, intramuscular, subcutânea, intravenosa, etc.), rectal, ou qualquer outra via de administração clinicamente permitida e numa quantidade terapêuticamente eficaz.

Os adjuvantes e veículos farmacêuticamente aceitáveis que podem ser utilizados nas referidas composições são os veículos habitualmente utilizados na arte. A

composição farmacêutica proporcionada por esta invenção pode ser administrada através de qualquer via de administração, sendo que a referida composição será formulada numa forma farmacêutica adequada à via de administração seleccionada.

5 Ao longo da descrição e das reivindicações, a palavra "inclui" e suas variantes não pretendem excluir outras características técnicas, aditivos, componentes ou passos. Para os técnicos no assunto, outros objectos, vantagens e características da invenção serão depreendidas em
10 parte da descrição e em parte da prática da invenção. As figuras e exemplos seguintes são apresentadas com fins ilustrativos, não tendo quaisquer intuitos limitativos da presente invenção.

DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

15 **FIG 1. Modelo de domínio SH3.1 e filtragem virtual de compostos com potencial de ligação.**

 Filtragem virtual de compostos que se ligam ao domínio SH3.1 de Nck. Modelo teórico de estrutura do domínio SH3.1 de Nck (seção A). A seção B mostra como se encaixa um
20 desses compostos na parte superior do modelo virtual.

FIG 2. Efeito selectivo dos compostos resultantes da filtragem virtual na proliferação induzida por anti-CD3.

 Proliferação avaliada por citometria de fluxo de acordo com a perda de fluorescência verde (CFSE) dentro da
25 população CD8+. Os compostos distintos são representados através do código NSI seguido de um número. O CBM-1 é o composto NSI-65.

FIG 3. Efeito selectivo do composto CBM-1 na proliferação induzida por anti-CD3.

30 Inibição por CBM-1 da proliferação de linfócitos T humanos em resposta à estimulação com anticorpos anti-CD3. São comparados estes resultados com os resultados da proliferação de linfoblastos humanos dependentes de IL2.

FIG 4. Inibição da libertação de citocinas por CBM-1.

Inibição por CBM-1 da secreção de citocinas por linfócitos T humanos em resposta à estimulação com anticorpos anti-CD3. Estimularam-se células mononucleares de sangue periférico (PBMNC) purificadas de doadores sãos durante 72 h sobre placas recobertas de anticorpo anti-CD3 OKT3 na presença de doses distintas de CBM-1. A concentração do sobrenadante das citocinas indicadas (IL-10, IFN- γ , e TFN- β) foi avaliada através de citometria de fluxo multiparamétrica (*cytometric bead array de BD*). O composto CBM-1 não apresentou qualquer efeito sobre a libertação de IL5, IL1- β e IL6, enquanto que não foi possível detectar o IL2 e IL4.

FIG 5. Inibição da produção intracelular de IFN γ .

Expressão intracelular de IFN γ em resposta à estimulação com uma mistura de anti-CD3 e anti-CD28. No gráfico é apresentada a expressão de IFN γ intracelular (como produto da percentagem de células positivas e da fluorescência média) em função da concentração do composto CBM-1.

FIG 6. Estrutura por RMN do domínio SH3.1 e deslocamentos produzidos após a ligação do péptido de alta afinidade 11R085.

Estrutura por RMN do domínio SH3.1 de Nck α (A). As cinco lâminas β estão enumeradas de forma consecutiva. N e C indicam as extremidades amino- e carboxi-terminais, respectivamente. (B) Comparação dos resíduos deslocados pela união do péptido de alta afinidade 11R085 ao domínio SH3.1 de Nck α (a negro), com os resíduos correspondentes de Nck β .

FIG 7. Estrutura por RMN do domínio SH3.1 e deslocamentos produzidos após a ligação de CBM-1.

Deslocamentos de resíduos de aminoácidos no domínio SH3.1 produzidos pela interação com o composto CBM-1. São

5

10

15

20

Adiante, é ilustrada a invenção através de algumas experiências realizadas pelos inventores, que desenvolvem os esforços levados a cabo para identificar o composto da invenção e comprovar a sua eficácia.

25

30

11R085, que é 300 vezes mais potente que um péptido com a sequência "wild type" na inibição da interação de CD3 ϵ com o domínio SH3.1 de Nck. Utilizando este péptido, conseguimos inibir de forma específica a proliferação de linfócitos T humanos tanto de CD4+ como de CD8+, em resposta à estimulação com anticorpos anti-CD3, com um IC50 de 20 μ M, enquanto que a proliferação de linfócitos T humanos dependente de um receptor diferente, o IL2R, não foi praticamente afectada por tal péptido, inclusivamente em concentrações 3 vezes superiores. Tais resultados sugeriam que o péptido 11R085 inibe a activação iniciada pelo TCR mas não a activação mediada por outro receptor e que, assim sendo, é específico do alvo molecular para o qual foi concebido. O péptido 11R085 também inibiu a produção de IL2 e a proliferação induzida por antigénio em linfócitos primários de ratos transgénicos OT-I com um IC50 de 5 μ M. Ficava, assim, validada a interacção entre Nck-CD3 ϵ como alvo molecular para o desenvolvimento de imunossuppressores.

EXEMPLO 2

Seleção por filtragem *in silico* de compostos com potencial de bloqueio da interacção Nck-CD3 ϵ e avaliação da sua capacidade imunossupressora.

Foram utilizadas técnicas de modelação molecular (Fiser, A., Feig, M., Brooks, C.L., 3rd and Sali, A. (2002) Acc Chem Res., 35, 413-421) para se obter por homologia a estrutura do domínio SH3.1 de Nck α com base na sua sequência e na estrutura de 50 domínios SH3 conhecidos de outras proteínas. Desta forma, chegou-se a um modelo teórico de estrutura que pode ajustar-se com muito boa fiabilidade à estrutura real do domínio. Partindo desta estrutura, fez-se uma filtragem virtual com software próprio de um conjunto de mais de 300 000 compostos disponibilizados pela empresa norte-americana Chembridge, seleccionando-se dez compostos

que, teoricamente, encaixavam melhor numa bolsa hidrófoba do SH3.1, supostamente responsável pelo reconhecimento da sequência PRS de CD3 ϵ (veja-se a FIG. 1). Estes compostos foram posteriormente utilizados para realizar as experiências de inibição da proliferação de linfócitos T humanos estimulados com anticorpos anti-CD3.

EXEMPLO 3

Efeito selectivo dos compostos resultantes da filtração virtual sobre a proliferação induzida por anti-CD3.

Para a ronda seguinte de seleção dos compostos resultantes da filtração virtual com potencial de bloqueio da interação Nck-CD3 ϵ , foram marcadas PBMNC (culturas de células mononucleares de sangue periférico) purificadas de dadores ~~sãos através de fluorescência e foram incubadas durante 5~~ dias sobre placas recobertas do anticorpo anti-CD3 OTK3 na presença de doses distintas dos tais compostos. Avaliou-se a proliferação dos linfócitos T através de citometria de fluxo de acordo com a perda de fluorescência verde (CFSE) dentro da população de CD8+.

Todos os compostos submetidos a experiências tiveram um determinado grau de actividade de bloqueio da proliferação dos linfócitos, mas o melhor e menos tóxico foi o composto denominado por CBM-1 (composto de fórmula estrutural (I)), como se mostra na figura 2 (FIG. 2), onde o CBM-1 está representado pelo composto NSI-65.

EXEMPLO 4

Efeito selectivo de CBM-1 na proliferação induzida por anti-CD3.

Marcaram-se PBMNC purificadas de dadores sãos com CFSE e incubaram-se durante 5 dias sobre placas recobertas com o anticorpo anti-CD3 OKT3 na presença de doses distintas de vários compostos indicados, entre eles CBM-1. Avaliou-se a proliferação por citometria de fluxo de acordo com a perda de

fluorescência verde (CFSE) dentro das amostras de CD4+ e CD8+. Em simultâneo, realizou-se uma experiência de proliferação de linfoblastos humanos dependente de IL2. Estimularam-se PBMNC purificadas de doadores sãos com PHA durante 38 horas e marcaram-se com CFSE. Posteriormente, cultivaram-se durante 3 dias na presença de 100 IU/ml de IL2 humana recombinante na presença de concentrações dos compostos utilizados, particularmente de CBM-1.

O composto CBM-1 inibiu a proliferação induzida por anti-CD3 de linfócitos CD4+ com um IC50 de 2 μ M e a proliferação de linfócitos CD8+ com um IC50 de 3 μ M (FIG. 3). O efeito inibidor de outros dos compostos foi ligeiramente inferior. O CBM-1 não inibiu significativamente a proliferação de linfoblastos humanos dependente de IL2 a concentrações de 20 μ M, indicando a sua especificidade em relação à proliferação dependente da activação de TCR, mas não em relação à proliferação dependente de IL25. Estes dados suportam a existência de um mecanismo de ação selectivo sobre o TCR.

EXEMPLO 5

Inibição da secreção de citocinas por linfócitos T humanos em resposta à estimulação com anticorpos anti-CD3.

Mediu-se o efeito do composto CBM-1 sob a produção de citocinas numa experiência na qual as PBMNC humanas foram estimuladas com anticorpos anti-CD3. O sobrenadante destas células foi recolhido 72 horas depois e mediram-se várias citocinas simultaneamente através de um ensaio de citometria de fluxo. Estas experiências demonstraram que o composto teve um potente efeito inibidor sobre as citocinas Th1, bem como IFN γ (IC50 de 0,3 μ M), TNF β (IC50 de 0,2 μ M) e IL10 (IC50 de 0,2 μ M), e não teve qualquer efeito sobre a produção de IL5 e IL6 até concentrações de 30 μ M (FIG 4). Os dados indicam que o CBM-1 inibe selectivamente a produção de algumas citocinas

por linfócitos T, mas não de outras. Ou seja, o CBM-1 apresenta um grau de selectividade na inibição de vias intracelulares de transmissão de sinais.

EXEMPLO 6

5 Inibição da expressão de IFN γ intracelular por células T CD4+ de ratinho em resposta à estimulação com anticorpos anti-CD3.

Para demonstrar se os inibidores previnem a diferenciação de linfócitos Th0 e Th1, realizaram-se ensaios de diferenciação *in vitro*. Estimularam-se células de baço de ratinhos C57BL/6 com anticorpos anti-CD3 + anti-CD28 durante 10 48 horas na presença das concentrações de CBM-1 indicadas e incubaram-se durante mais 6 horas com brefeldina A, verificando-se que o CBM-1 inibe a geração de linfócitos Th1 secretores de IFN γ com um IC50 de 0,8 μ M. As células foram em primeiro lugar marcadas com CD4-PE e depois de fixadas e permeabilizadas, foram marcadas com anticorpo anti-IFN γ . O gráfico (FIG. 5) mostra a expressão de IFN γ intracelular (como produto da percentagem de células positivas e da fluorescência média) em função da concentração de CBM-1.

EXEMPLO 7

Determinação por RMN da estrutura tridimensional do domínio SH3.1 de Nck α

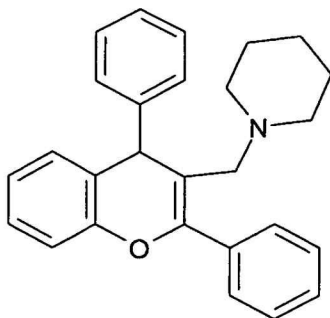
Em simultâneo, determinou-se por RMN (em 25 colaboração com o laboratório dos Prof. María Angeles Jiménez e Manuel Rico, do Instituto de Química-Física Rocasolano, CSIC, Madrid), a estrutura tridimensional do domínio SH3.1 de Nck α com e sem o péptido 11R085 (FIG. 6). Tal facto permitiu validar a predição do modelo de estrutura *in silico* utilizado para a filtragem virtual. Além disso, permitiu medir os desvios químicos ocorridos na estrutura provocados pelo 30 composto CBM-1 (FIG. 7).

Os resultados indicam que o composto CBM-1 interage

estruturalmente com a proteína aproximadamente na forma prevista pelos estudos bioinformáticos. O composto liga-se a uma bolsa hidrófoba na qual participam os resíduos Trp41 e Tyr50/Phe53, provocando uma distorção e deslocamento da lâmina $\beta 2$ e de resíduos no anel distal (FIG. 7 e FIG. 9). Os deslocamentos de resíduos no domínio SH3.1 validam a previsão acerca da interação do domínio SH3.1 com CBM-1 a nível molecular e são consequentes com o modelo.

REIVINDICAÇÕES

1. COMPOSTO DE FÓRMULA (I):



E QUALQUER UM DOS SEUS DERIVADOS, caracterizado pelo fato de ser para uso como medicamento.

5 2. USO DO COMPOSTO, tal como definido pela reivindicação 1, caracterizado pelo fato de ser para preparar um medicamento.

3. USO DO COMPOSTO, de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo fato de ser para preparar um medicamento destinado ao tratamento e/ou prevenção de doenças advindas da activação de linfócitos T ou da hiperproliferação ou proliferação anómala dos mesmos.

4. USO DO COMPOSTO, de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato de que as doenças provocadas pela activação de linfócitos T são doenças auto-imunes.

5. USO DO COMPOSTO, de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo fato de que as doenças auto-imunes são seleccionadas entre a lista que compreende: esclerose múltipla e suas variantes, lúpus eritematoso sistémico, psoríase, vitiligo, artrite reumatóide, asma, hepatite auto-imune, diabetes tipo 1, miastenia grave, espondilite anquilosante e doença de Crohn.

6. USO DO COMPOSTO, de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato de que as doenças provocadas pela activação de linfócitos T são doenças advindas da rejeição de alotransplantes ou xenotransplantes de órgãos ou tecidos.

7. USO DO COMPOSTO, de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato de que as doenças provocadas pela activação de linfócitos T são linfomas ou leucemias T.

8. COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, caracterizada pelo
5 fato de que compreende o composto tal como definido pela reivindicação 1 e um excipiente farmacêuticamente aceitável.

9. USO DA COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, tal como definido pela reivindicação 6, caracterizado pelo fato de ser como imunossupressor.

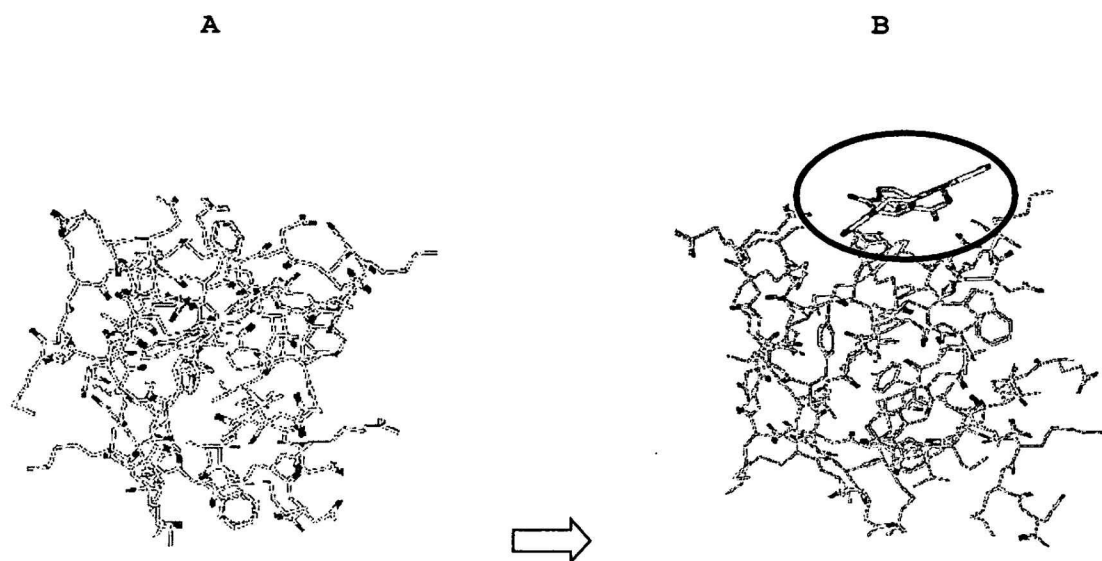


FIG. 1

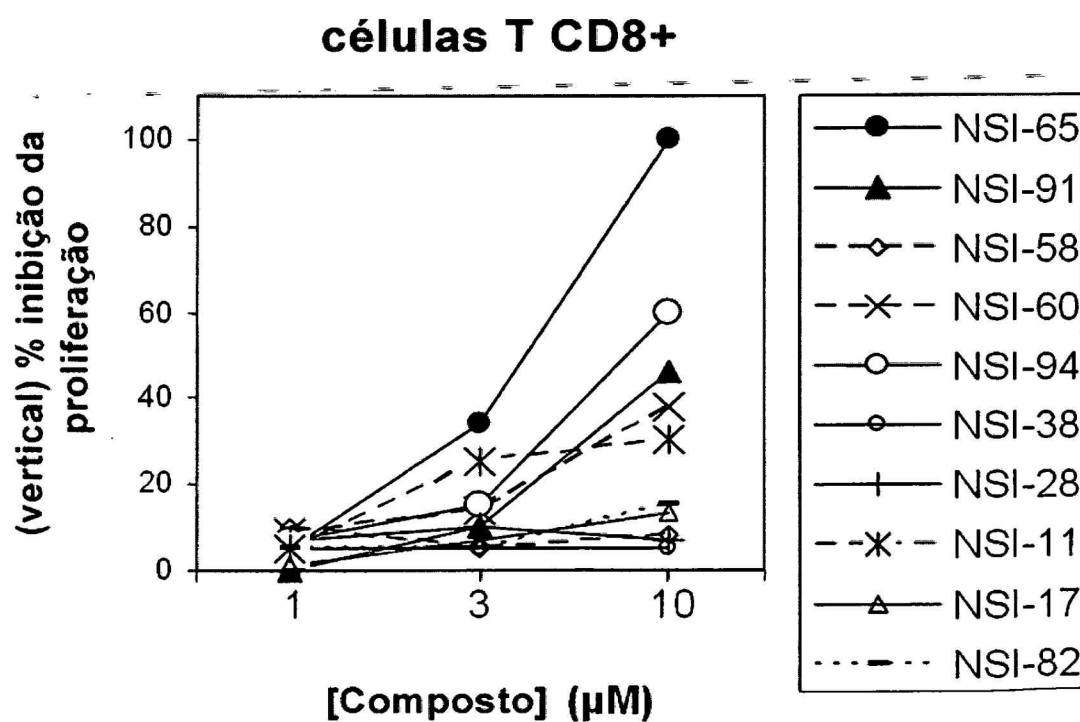


FIG. 2

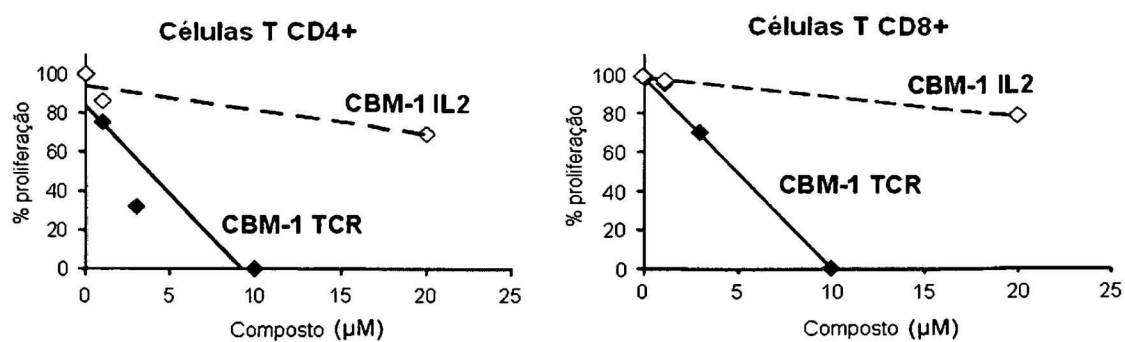


FIG. 3

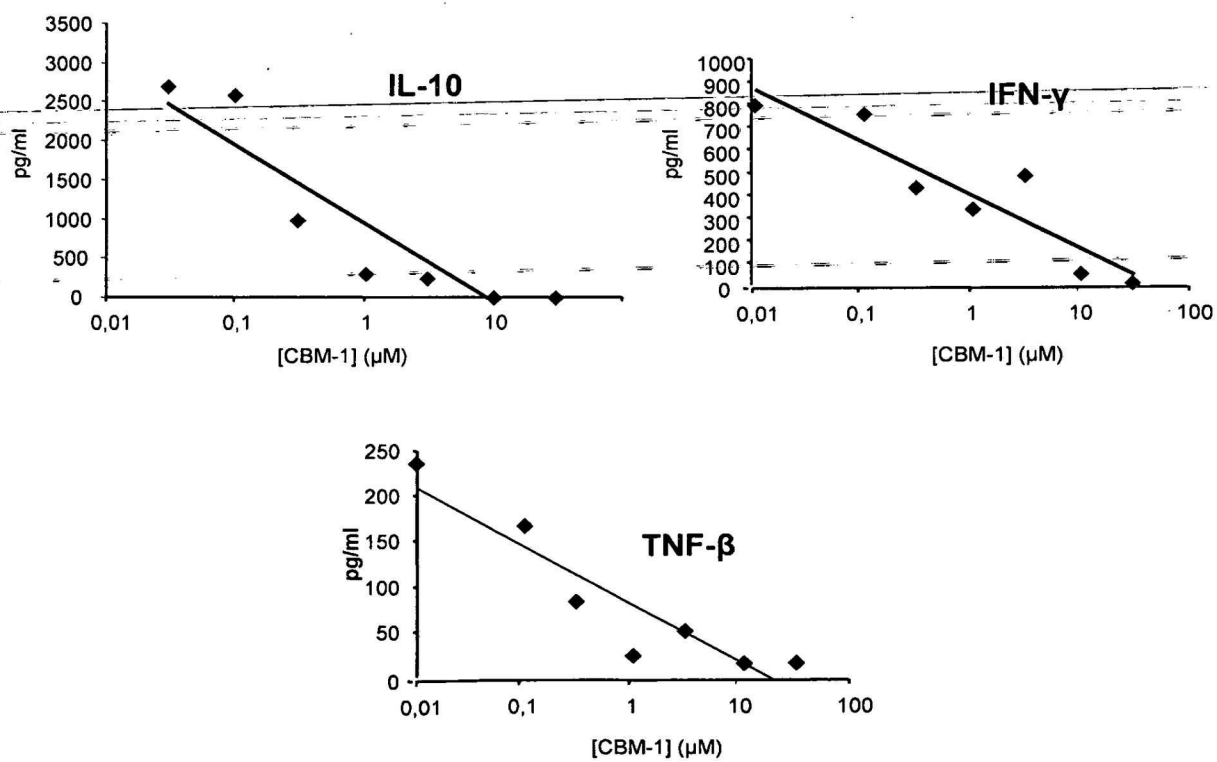


FIG. 4

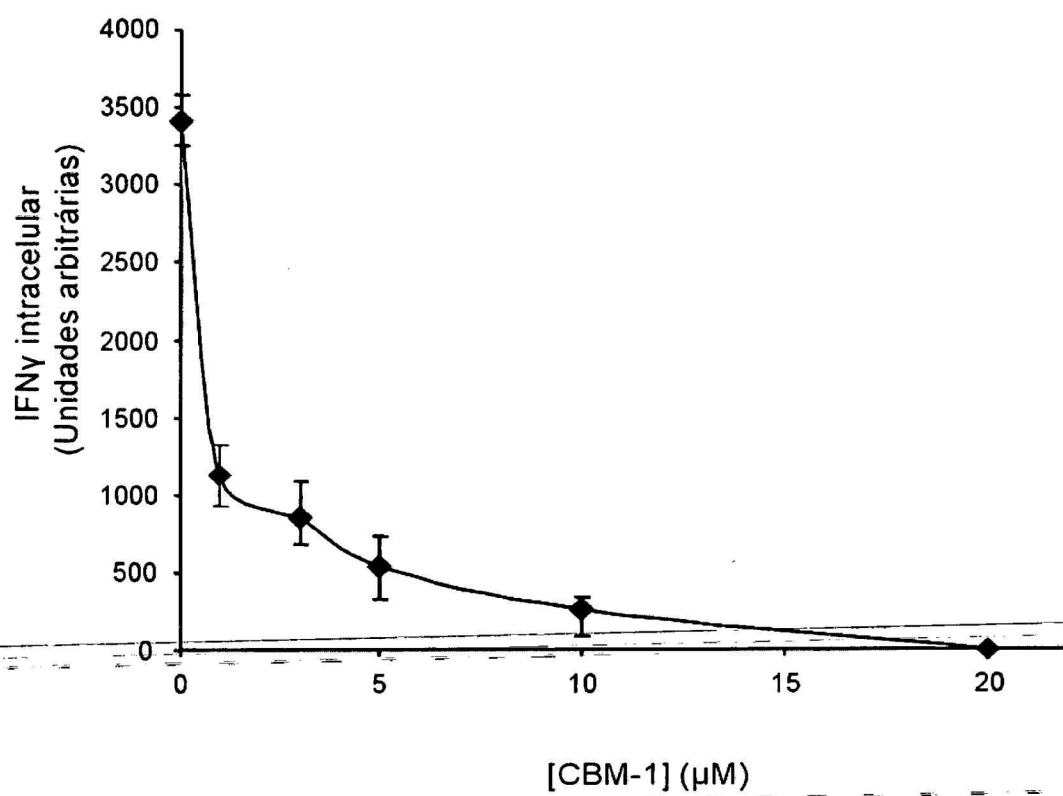


FIG. 5

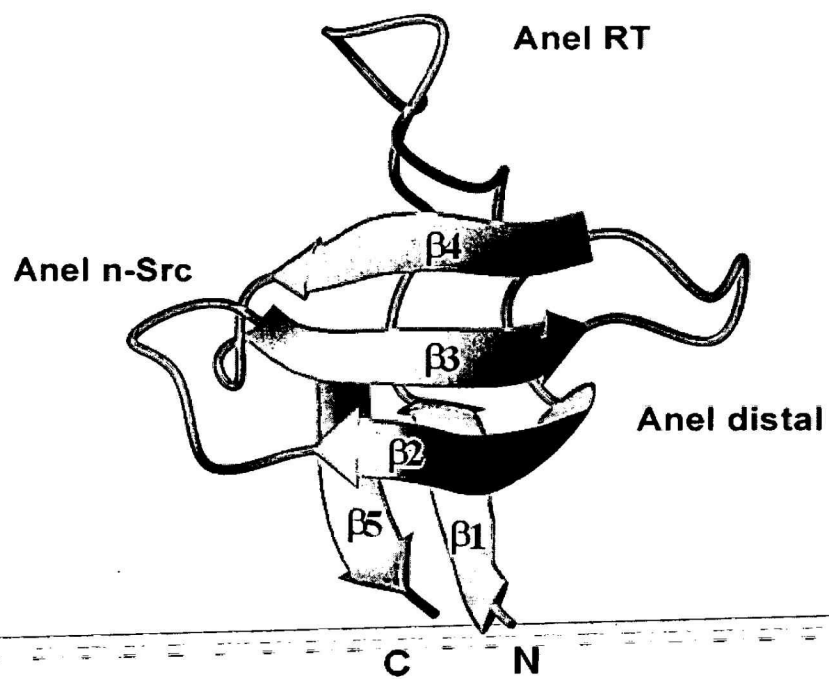


FIG. 6A

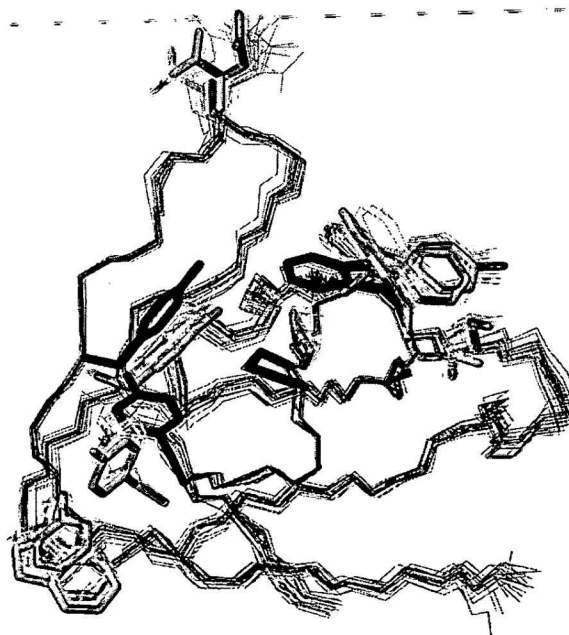


FIG. 6B

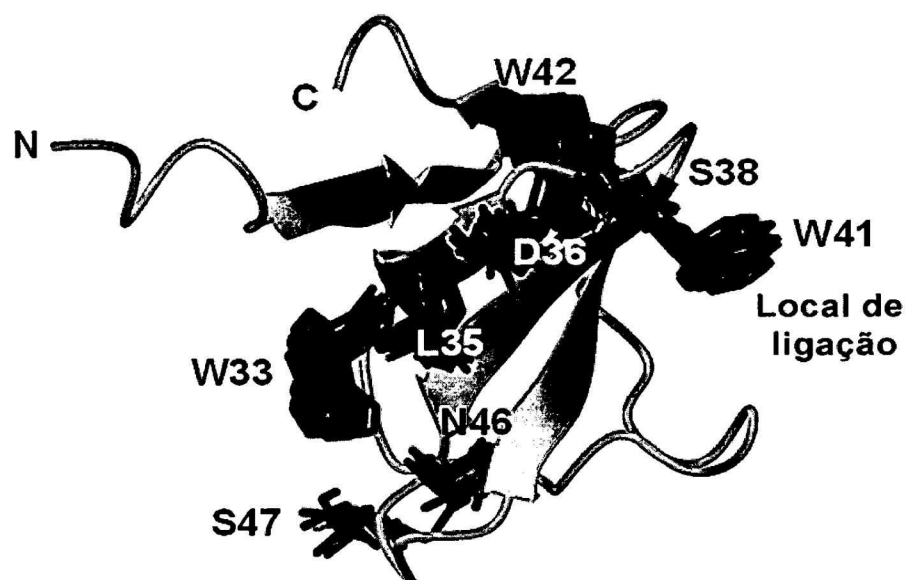


FIG. 7

Toxicidade 48 h

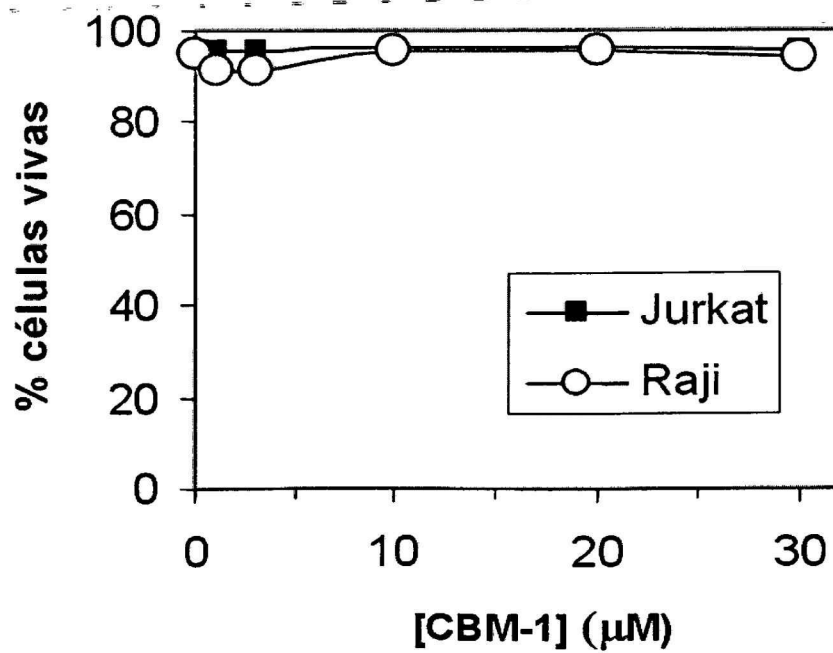


FIG. 8

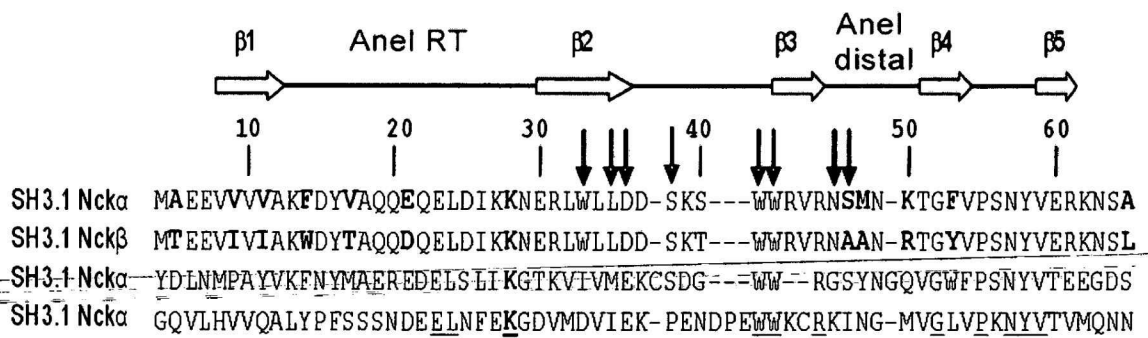


FIG. 9

RESUMO

COMPOSTO DE FÓRMULA (I) E QUALQUER UM DOS SEUS DERIVADOS, USO DO COMPOSTO, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, E, USO DA COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA

5 A presente invenção refere-se a um composto de fórmula estrutural (I) e seus derivados, para uso como medicamento. Preferivelmente como agente imunossupressor com base na interrupção da interação entre TCR-Nck.