



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 339 306**

51 Int. Cl.:

**A61K 31/15** (2006.01)

**A61K 31/155** (2006.01)

**C07C 233/05** (2006.01)

**C07C 281/18** (2006.01)

**A61P 37/02** (2006.01)

**A61P 31/18** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **97948263 .5**

96 Fecha de presentación : **14.11.1997**

97 Número de publicación de la solicitud: **0963197**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **15.12.1999**

54

Título: **Guanilhidrazonas útiles en el tratamiento de las enfermedades asociadas con la activación de las células T.**

30

Prioridad: **15.11.1996 US 31061 P**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**18.05.2010**

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**18.05.2010**

73

Titular/es: **Cytokine PharmaSciences, Inc.**  
**150 South Warner Road, Suite 420**  
**King of Prussia, Pennsylvania 19406, US**

72

Inventor/es: **Tracey, Kevin;**  
**Cohen, Pamela;**  
**Bukrinsky, Michael y**  
**Schmidtayerova, Helena**

74

Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 339 306 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

Guanilhidrazonas útiles en el tratamiento de las enfermedades asociadas con la activación de las células T.

5 **Campo técnico de la invención**

La presente invención proporciona un género de compuestos sustituidos con guanilhidrazona que son útiles para tratar varias enfermedades asociadas con la activación de las células T y la infección retroviral. La presente invención se basa en el descubrimiento mecánico de que la vía de señalización de la proteína quinasa activada por el mitógeno p38 (MAPK) es inhibida por los compuestos sustituidos con guanilhidrazona.

**Antecedentes de la invención**

El virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) ha sido implicado como la principal causa de la enfermedad lentamente degenerativa del sistema inmunológico denominado síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) (Barre-Sinoussi *et al.*, Science 220: 868-870, 1983; Gallo *et al.*, Science 224:500-503, 1984). En los seres humanos, la replicación de VIH ocurre predominantemente en poblaciones de linfocitos T CD4+ y la infección con VIH lleva a la reducción de este tipo celular y finalmente a la incompetencia inmune, infecciones oportunistas, disfunciones neurológicas, crecimiento neoplásico y por último a la muerte. VIH es un miembro de la familia lentivirus de los retrovirus (Teich *et al.*, ARN Tumor Viruses, 1984, Weiss *et al.*, eds., CSH-Press, pp. 949-956). Otros retrovirus incluyen, por ejemplo, virus oncogénicos tales como el virus de la leucemia de células T humanas (HTLV-I,-II,-III), y el virus de la leucemia felina.

La infección con VIH es pandémica y las enfermedades asociadas con VIH representan un importante problema de salud mundial. Si bien se ha puesto un considerable esfuerzo en el diseño de terapéuticas efectivas, en la actualidad no existen fármacos antirretrovirales curativos contra el SIDA. Por ejemplo, la transcriptasa inversa codificada en forma viral ha sido un foco del desarrollo farmacológico. Se han desarrollado numerosos fármacos dirigidos a la transcriptasa inversa, que incluyen análogos de 2',3'-didesoxinucleósidos tales como AZT, ddI, ddC, 3TC y d4T que han mostrado ser activos contra el VIH (Mitsuya *et al.*, Science 249:1533-1544, 1991). Si bien son beneficiosos, estos análogos nucleosídicos no son curativos (Lander *et al.*, Science 243:1731-1734, 1989). Además, los fármacos a menudo causan efectos secundarios tóxicos tales como supresión de médula ósea, vómitos y anomalías de la función hepática.

También se han sugerido las etapas tardías de la replicación del VIH, que involucran el procesamiento crucial específico del virus de ciertas proteínas codificadas virales, como posibles dianas para fármacos anti-VIH. El procesamiento de etapa tardía es dependiente de la actividad de una proteasa viral y se comercializan fármacos que inhiben esta proteasa (Erickson, Science 249:527-533, 1990). En consecuencia, si bien se ha dirigido un gran esfuerzo al diseño y análisis de fármacos antirretrovirales, aún se necesitan tratamientos efectivos y no tóxicos.

Las proteínas quinasas activadas por mitógeno (MAP) o mediadores importantes de la transducción de señales de la superficie celular al núcleo. Los subtipos de mamífero ERK1 y ERK2 de la familia de MAP quinasa han sido clonados. Se han descubierto dos subtipos adicionales, p38 MAP quinasa y c-jun quinasa (JNK) que se pueden activar en forma independiente y simultánea. La vía de ERK está activada por los factores de crecimiento o ésteres de forbol (Marshall, Cell 80:179-185, 1995). En contraste, las vías de la p38 MAP quinasa y JNK se activan por las citoquinas inflamatorias y estreses celulares tales como shock térmico, estrés osmótico o luz ultravioleta (Galcheva-Gargova *et al.*, Science 265:806-808, 1994; Kyriakis *et al.*, Nature 369:156-160, 1994; y Raingeaud *et al.*, J. Biol. Chem. 270:7420-7426, 1995).

La p38 MAP quinasa de mamífero se identificó en las células pre-B murinas transfectadas con el receptor del complejo LPS, CD14, y en macrófagos murinos donde se activa en respuesta al LPS (Han *et al.*, Science 265:808-811, 1994). p38 ha sido identificado como el homólogo de mamífero de la MAP quinasa osmosensible de levadura, HOG1 (Brewster *et al.*, Science 259:1760-1763, 1993), y la Xenopus quinasa Mpk2 (Rouse *et al.*, Cell 78:1027-1037, 1994). CSBP1 y CSBP2 se han identificado como homólogos humanos de la p38 MAP quinasa murina (Lee *et al.*, Nature 372:739-746, 1994). La activación de p38 MAPK también se ha identificado en linfocitos durante la señalización intratímica esencial para la diferenciación y selección del repertorio del desarrollo de células T maduras (Sen *et al.*, J. Immunol. 156:4535, 1996). Una vez activada por la fosforilación, la p38 MAPK actúa tanto en la transcripción como la translación para fosforilar blancos en forma descendente. Dichos blancos incluyen los factores de transcripción ATF-2, CHOP, HSP27, Max (Raingeaud *et al.*, J. Biol. Chem. 270:7420, 1995; Batchvarova *et al.*, EMBO J. 14:4654, 1995; Freshney *et al.*, Cell 78:1039, 1994; y Zervos *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:10531, 1995), y las proteína quinasas -2 y -3 activadas por la MAPK proteína quinasa (MAPKAP-K2 y-K3) (McLaughlin *et al.*, J. Biol. Chem. 271: 8488, 1996; y Beyaert *et al.*, EMBO J. 15:1914, 1996).

La p38 MAP quinasa se activa en células tratadas con TNF y cumple un papel selectivo en la inducción del gen, controlando, por ejemplo, la síntesis de IL-6 y el factor estimulante de colonia de macrófagos granulocíticos (GM-CSF) (Beyart *et al.*, EMBO J. 15: 1914-1923, 1996). El papel de p38 en la vía de señalización para las respuestas de citoquina se demostró adicionalmente en estudios usando sistemas modelo de inducción de citoquina de construcciones de expresión del gen de VIH para medir los efectos de la inhibición de p38. Usando una línea celular de laboratorio infectada crónicamente con VIH latente, se informó que ciertos inhibidores farmacéuticos de p38 MAPK bloquean la producción de VIH p24 inducida por citoquina (Shapiro *et al.*, Eur. Cytokine Netw. 7:557, 1996). También se informó

que los inhibidores de p38 bloquean la inducción específica de citoquina de la expresión dirigida por LTR del VIH de una molécula de indicador no relacionada en un sistema modelo de transfección (Kumar *et al.*, Eur. Cytokine Netw. 7:558, 1996).

5 En vista de la multitud de funciones cumplidas en la señalización intracelular por la p38 MAP quinasa, se necesita en la técnica hallar compuestos que inhiban las vías de señalización intracelular a través de la p38 MAP quinasa. Dichos inhibidores selectivos de esta vía de señalización inhibirán la activación de las células T y en consecuencia muestran utilidad terapéutica para tratar infecciones causadas por retrovirus (por ejemplo, VIH) y para varias enfermedades autoinmunes (por ejemplo, artritis reumatoidea, lupus, injerto versus huésped, huésped versus injerto, diabetes insulino dependiente y esclerosis múltiple).

### Sumario de la invención

15 La presente invención proporciona modalidades terapéuticas para el tratamiento de las enfermedades y los trastornos causados como resultado de la activación de las células T, en particular infección con VIH, en virtud de la vía de señalización celular p38 MAPK como blanco de intervención. La presente invención en forma específica proporciona compuestos sustituidos con guanilhidrazona para tratar trastornos y enfermedades relacionadas a la activación de las células T e infección con VIH. La presente invención también se refiere al uso de otros compuestos que inhiben la vía de la p38 MAP quinasa para el tratamiento de las enfermedades inmunes, y otras enfermedades o condiciones clínicas  
20 en las que los linfocitos T y citoquinas y/u otros mediadores liberados por los linfocitos T activados están implicados en la patología de la condición de la enfermedad.

La presente invención también se refiere a las modalidades terapéuticas para el tratamiento de los trastornos y enfermedades relacionados con la activación de las células T, en particular infección con VIH, por la administración de una cantidad efectiva de un inhibidor de la vía de la p38 MAPK en combinación con al menos otro agente terapéutico. Con preferencia el inhibidor de la vía de p38 MAPK se usa en terapia de combinación con un agente antiviral de otra clase (es decir, mecanismo de acción del tratamiento), tales como un inhibidor de transcriptasa inversa (por ejemplo, AZT, ddI, ddC, 3TC); un inhibidor de proteasa de VIH (por ejemplo, ABT-538); o un inhibidor del complejo de preintegración.

30 La invención se basa en el descubrimiento de que la vía de transducción de señales de p38 MAPK participa en la coestimulación de linfocitos T. Se halló que la actividad de p38 MAPK está aumentada en los linfocitos T humanos estimulados con un CD3 y un CD28. La inhibición de la vía de p38 MAPK, por la adición de un ejemplo de guanilhidrazona multivalente, CNI-1493, produjo la inhibición de la activación de los linfocitos T, medida por la síntesis de IL-2.

Las diversas modalidades del tratamiento descrito en la presente se diseñaron sobre la base del modelo propuesto. En particular, se pueden usar compuestos de guanilhidrazona multivalente, moléculas orgánicas pequeñas, moléculas antisentido, ribozimas y moléculas de triple hélice dirigidas a la vía de la p38 MAP quinasa para inhibir la activación de las células T y la infección con VIH. En una realización específica de la invención, se pueden usar compuestos de guanilhidrazona multivalente, tales como CNI-1493, para inhibir la infección con VIH. En aún otra realización de la invención, los componentes ascendentes y descendentes de la vía de la p38 MAP quinasa se pueden dirigir a inhibir la infección con VIH. Por ejemplo, la MAPKAP quinasa-2, que está en una ubicación descendente respecto de una p38 MAP quinasa, se puede dirigir por moléculas antisentido, ribozima o de triple hélice, para inhibir la infección con  
45 VIH.

La presente invención además se refiere a los ensayos de detección para identificar los compuestos que inhiben la vía de p38 MAP quinasa y se pueden usar enfermedades o trastornos relacionadas para la activación de las células T, en particular infección con VIH.

### Breve descripción de los dibujos

55 La Figura 1A representa el resultado de inmunotransferencia de proteína de los niveles de fosfo-p38 MAPK en las células T en ausencia (-) o presencia (+) de VIH en varios momentos predeterminados después de la infección. La Figura 1B muestra los resultados acumulativos de experimentos similares en tres donantes (media +/- error estándar). Estos datos muestran el aumento de fosforilación de p38 MAPK después de la infección primaria de las células T.

60 La Figura 2A muestra que las células RAW 264,7 se pretrataron con/sin varias concentraciones de CNI-1493 una hora antes de la adición de LPS (*Escherichia coli* 0111:B4100 ng/ml; Sigma Chemical Co. St. Louis, MO). Los lisados celulares se prepararon para inmunoprecipitación e inmunotransferencia 15 minutos después de la administración de LPS. En las figuras 2B, 2C y 2D las células T activadas por PHA se pretrataron con diluyente control o varias concentraciones de CNI-1493 durante una hora, se infectaron con VIH 1-LAV como en la Figura 1 y se cultivaron durante 10 días. La Figura 2B es un gráfico de inhibición dependiente de la dosis por CNI-1493 de la infección con VIH evaluada por la acumulación de transcriptasa inversa (RT) en el día 6 del cultivo. La Figura 2C es un gráfico de inhibición de VIH por 1 mM de CNI-1493 durante el tiempo. La Figura 2D es una inmunotransferencia de la expresión de fosfo-p38 MAPK en células infectadas con VIH-1 en el día 6 después del cultivo tratado con/sin 1 mM de CNI-1493. Estos datos muestran la inhibición de replicación del VIH por el ejemplo del compuesto sustituido con guanilhidrazona CNI-1493.

## ES 2 339 306 T3

La Figura 3 muestra que los oligonucleótidos fosforilados de 18-mer que codifican los pb 324-341 en dirección de sentido (5'-GCAGGAGCTGAACAAGAC-3' SEQ. ID. NO.:1) o antisentido (5'-GTCTTGTTTCAGCTCCTGC-3' SEQ. ID. NO.:2) se usaron sobre la base de la secuencia para la p38 MAPK humana (Han *et al.*, 1995 Biochem. Biophys. Acta 1265: 224). Las células T se infectaron con HIV1-LAV en presencia de 1 mM de 18-mer, las células se volvieron a alimentar cada 3-4 días con el medio que contiene oligómero fresco y sobrenadantes recolectados en varios momentos predeterminados para el ensayo de RT. De forma simultánea, las células también se sembraron, se trataron de modo similar y se recolectaron para los niveles de fosfo-p38 MAPK analizados por inmunoprecipitación guanilhidrazona sustituido compuesto medido por el ensayo RT. En esta figura se muestra el efecto de la adición de oligonucleótido sentido y antisentido p38 MAPK en los niveles de fosfo-p38 y su correlación con la replicación del VIH, medido por RT. Estos datos muestran que los fosforilados de oligonucleótido antisentido p38 MAPK inhiben la replicación del VIH en las células T. La Figura 4 muestra los resultados de un experimento en el que las células T, preparadas e infectadas con VIH1-LAV (como se describió anteriormente), se cultivaron y se recolectaron los sobrenadantes y se analizaron para determinar los niveles de MIP-1 $\alpha$  y MIP-1 por ELISA sándwich (Schmidtmayero *et al.*, 1996, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:700)). Los ensayos se realizaron por triplicado y las barras de error representan el desvío estándar de la media. Los datos mostrados aquí son el resultado de un experimento de dador individual, que muestra que la secreción de quimiocinas de las células T no se modifica o aumenta ligeramente durante la inhibición de replicación del VIH causada por CNI-1493.

### Descripción detallada de la invención

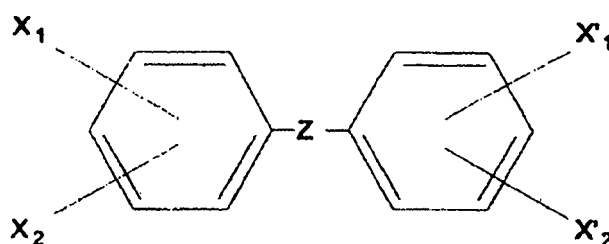
#### Definiciones

“p38 MAP quinasa” se refiere al homólogo relacionado o análogo perteneciente a la familia de mamífero de actividad de p38 quinasa, que incluye, por ejemplo, los miembros humanos de la familia, CSBP1 y CSBP2.

“Vía de señalización de p38 MAPK” o “vía de p38 MAPK” se refiere a los componentes ascendentes y descendentes de la cascada de señalización.

#### Compuestos terapéuticos sustituidos con guanilhidrazona

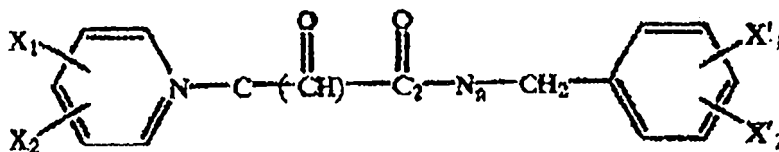
La presente invención proporciona un procedimiento para tratar infección causada por retrovirus y enfermedades autoinmunes, que comprenden la administración de una cantidad efectiva de un compuesto de guanilhidrazona. El género de los compuestos de guanilhidrazona incluido en la presente invención se describe en la presente. La síntesis de los compuestos de guanilhidrazona también se proporciona por la presente invención y también se describe en la patente U.S. 5.599.984. Los términos “GhyCH” significarán NH<sub>2</sub>(CNH)-NH-N=CH-y “GhyCCH<sub>3</sub>” significará NH<sub>2</sub>(CNH)-NH-N=CCH<sub>3</sub>-. Los compuestos sustituidos con guanilhidrazona incluirán la fórmula 1:



en la que X<sub>2</sub> = GhyCH-, GhyCCH<sub>3</sub>-o H-; X<sub>1</sub>, X'<sub>1</sub> y X'<sub>2</sub> independientemente = GhyCH- o GhyCCH<sub>3</sub>-; Z = -NH(CO)<sub>n</sub>H-, -(C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>)-, -(C<sub>5</sub>NH<sub>3</sub>)- o -A-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-A-, n = 2-10, que está no sustituido, mono-o di-C-sustituido con metilo, o uno de sus derivados mono o di-insaturados; y A, independientemente, = -NH(CO)-, -(CO)<sub>n</sub>H-, -NH(CO)<sub>n</sub>H-, -NH-u -O- y sus sales. Para facilitar la síntesis, una realización preferida incluye los compuestos en los que A es una sola funcionalidad. También se incluyen los compuestos que tienen la misma fórmula 1 en la que X<sub>1</sub> y X<sub>2</sub> = H; X'<sub>1</sub> y X'<sub>2</sub> independientemente = GhyCH- o GhyCCH<sub>3</sub>-; Z = -A-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-A-, n = 3-8; y A = -NH(CO)-, -(CO)<sub>n</sub>H- o -NH(CO)<sub>n</sub>H- y sus sales. También se incluyen los compuestos en los que X<sub>1</sub> y X<sub>2</sub> = H; X'<sub>1</sub> y X'<sub>2</sub> independientemente = GhyCH- o GhyCCH<sub>3</sub>- y Z = -O-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-O-.

Otros ejemplos de género incluyen: El género en el que: X<sub>2</sub> = GhyCH-, GhyCCH<sub>3</sub>-o H-; X<sub>1</sub>, X'<sub>1</sub> y X'<sub>2</sub> = GhyCH-o GhyCCH<sub>3</sub>-; y Z = -O-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-O-, n = 2-10 y sus sales; y los géneros relacionados en el que, cuando X<sub>2</sub> es diferente de H, X<sub>2</sub> es meta o para a X<sub>1</sub> y en el que X'<sub>2</sub> es meta o para a X'<sub>1</sub>. Un compuesto que tiene la fórmula anterior en el que: X<sub>2</sub> = GhyCH, GhyCCH<sub>3</sub> o H; X<sub>1</sub>, X'<sub>1</sub> y X'<sub>2</sub>, = GhyCH-o GhyCCH<sub>3</sub>-; y Z = -NH-(C=O)-NH- y sus sales; y el género relacionado en el que, cuando X<sub>2</sub> es diferente de H, X<sub>2</sub> es meta o para a X<sub>1</sub> y en el que X'<sub>2</sub> es meta o para a X'<sub>1</sub>.

También se incluyen compuestos que tienen una fórmula 2:



en la que:  $n = 3-8$ ;  $X_2$  y  $X'_2 = \text{GhyCH-}$ ,  $\text{GhyCCH}_3\text{-}$  o  $\text{H-}$ ;  $X_1$  y  $X'_1 = \text{GhyCH-}$  o  $\text{GhyCCH}_3\text{-}$ ; y sus sales; y el género relacionado en el que, cuando  $X_2$  o  $X'_2$  o ambos son diferentes de H, entonces  $X_2$  o  $X'_2$  son meta o para a  $X_1$  o  $X'_1$ , respectivamente.

Los compuestos de la presente invención se pueden sintetizar por medio de dos reacciones fundamentales. Se pueden sintetizar numerosas variantes por medio de estas reacciones y que estas variantes tienen propiedades en común con los compuestos en la presente.

La reacción 1 consiste en la reacción de un aromático sustituido que tiene una amina primaria o secundaria, por ejemplo, 3,5-diacetilnilina, y a dicloruro de diofílo, por ejemplo, bicloruro de glutarilo, para producir la correspondiente N, N'-difenilalcanodiamida. También se pueden preparar diamidas "invertidas". Se pueden preparar ácido acetyl y diacetilbenzoico por reacción de los toluenos sustituidos correspondientes y  $\text{KMnO}_4$ . Los ácidos luego se pueden activar por técnicas estándares y reaccionar con las  $\alpha,\omega$ -alcanodiaminas para producir "diamidas" inversas. Las diamidas delanteras e inversas mixtas se pueden sintetizar por los procedimientos bien conocidos en el campo de la síntesis de péptidos. En consecuencia, un N-t-butiloxicarbonil aminoácido puede reaccionar con una anilina sustituida, seguido por la desprotección y reacción del grupo amino con un ácido benzoico sustituido activado. Cuando se usa en la presente, el símbolo " $-\text{NH}(\text{CO})-$ ", a menos que se indique de otro modo, incluye el isómero  $-(\text{CO})_n\text{H-}$ .

El procedimiento no se limita a los dicloruros de diofílo. Los derivados de tricloruro de los compuestos trifílo se pueden usar para sintetizar trifenil alcanotriamidas en un modo similar. Los triácidos adecuados incluyen ácidos cíclicos, por ejemplo, ácido 1,3,5-ciclohexantricarboxílico (Aldrich Chem. Co.), ácido 1,3,5-trimetil-1,3,5-ciclohexantricarboxílico (Kemp's triacid, Kemp y Petrakis, 1981, J. Org. Chem. 46: 5140), ácido 1,3,5-bencintricarboxílico (Aldrich Chem. Co.) y ácidos tricarboxílicos lineales tales como el ácido 1,2,3-propantricarboxílico (Sigma Chem. Co.). Se puede realizar una reacción idéntica en la que el cloruro de diofílo se reemplaza con cloroformiato de triclorometilo para producir un producto de condensación de difenilurea. Una alternativa a la Reacción 1 se puede realizar para producir un 1,n-(n-alcanodioxi)diarileno por reacción del 1,n-dibromoalcano, por ejemplo 1,2-dibromoetano, y un monohidroxilarileno, por ejemplo 3-hidroxiacetofenona.

Otras realizaciones de la invención incluyen el uso de las triaminas de la forma  $\text{H}_2\text{N}-(\text{CH}_2)_n-\text{NH}-(\text{CH}_2)_q-\text{NH}_2$  en las que  $(n, q = 2-6)$  y de la forma  $\text{Y}-(\text{CH}_2)_n-\text{NH}_2)_3$  en la que Y puede ser uno de N ( $n = 2-6$ ), C ( $\text{NO}_2$ ) ( $n=3$ ), un C-alcano ( $n=1$ ), 1,3,5-adamantantrifílo ( $n=3$ ) o 1,3,5-bencintrifílo ( $n=1-3$ ).

En dos realizaciones adicionales, isocianato de acetyl-o diacetilarilo reacciona con una alcanodiamina o, alternativamente, una acetyl-o diacetilarilamina con un diisocianato de alcanodiofílo para producir intermediarios bis-ureido que pueden reaccionar con aminoguanidina para formar los productos finales de guanilhidrazona. Los isocianatos requeridos están disponibles en el comercio o se pueden sintetizar a partir de las correspondientes aminas por la reacción con fósgeno, cloroformiato de triclorometilo, o bis(triclorometil)carbonato en tolueno o xileno a temperatura elevada.

La reacción 2 consiste en la reacción de un residuo tipo acetofenona o benzaldehído y una aminoguanidina para producir el producto de condensación en el que una aminoguanidina unida a imino ( $\text{N}=\text{C}$ ) reemplaza el residuo cetona o carbonilo del amileno de este modo forma una guanilhidrazona y acompañado por la liberación de una molécula de agua.

#### Vía de la P38 MAP quinasa

La presente invención se refiere a modalidades terapéuticas y composiciones farmacéuticas que se dirigen a la vía de p38 MAP quinasa para el tratamiento de las enfermedades y los trastornos relacionados con la activación de las células T, en particular infección con VIH. La presente invención se refiere a una variedad de técnicas y composiciones que se pueden utilizar para inhibir la activación de las células T y la infección con VIH. Dichas técnicas pueden incluir, procedimientos de terapia génica, fármacos, moléculas orgánicas pequeñas identificadas que inhiben la vía de p38 MAP quinasa.

Sin estar limitado por ninguna teoría respecto del modo de acción de las guanilhidrazonas multivalentes, estos compuestos pueden actuar por la alteración de la vía de p38 MAPK. La vía de p38 MAP quinasa cumple un papel crítico en la activación de los linfocitos T humanos y esta vía se inhibe con los compuestos de guanilhidrazona multivalente. Además, el tratamiento de los cultivos de células T con los compuestos de guanilhidrazona multivalente inhibió la infección con VIH, como lo hizo la inhibición de la vía de p38 MAPK por las moléculas antisentido dirigidas a la

## ES 2 339 306 T3

5 secuencia de p38 MAPK. La vía de p38 MAP quinasa se activa cuando los linfocitos T están estimulados con un anticuerpo para CD3 o un anticuerpo para CD28, y significativamente activado cuando los linfocitos T se coestimularon con ambos anticuerpos. La activación de la vía de p38 MAP quinasa se inhibió por la adición de una guanilhidrazona multivalente para los linfocitos T estimulados. Además, la estimulación de los linfocitos T también fue inhibida por la adición de la guanilhidrazona multivalente, medida por la secreción de IL-2.

10 La necesidad de activación de la p38 MAP quinasa en la infección con VIH de las células T se determinó a partir de experimentos en los que la actividad de p38 MAPK se bloqueó por la adición de inhibidores específicos de la expresión de p38 MAPK, los oligonucleótidos antisentido de p38 MAPK. La necesidad de activación de la vía de p38 MAPK para mantener la infección con VIH se demostró adicionalmente por la capacidad del inhibidor de la vía de p38 MAPK, CNI-1493, una guanilhidrazona multivalente, para inhibir la infección con VIH en células T primarias. Estos resultados muestran que la vía de p38 MAP quinasa cumple un papel crítico en la activación de las células T y en la capacidad de las células T para mantener la infección con VIH.

15 Entre los compuestos útiles para alterar la actividad de p38 MAP quinasa y los otros componentes de sus vías de señalización están las moléculas antisentido, ribozima y de triple hélice. Tales moléculas se diseñan para inhibir la expresión de los genes diana, la p38 MAP quinasa o los otros componentes de su vía de señalización.

20 Las moléculas de ARN y ADN antisentido actúan para bloquear directamente la traducción de ARNm por la hibridación de ARNm dirigido y evitar la traducción de proteínas. Con respecto al ADN antisentido, se mencionan los oligodesoxirribonucleótidos derivados del sitio de inicio de la traducción, es decir, entre las regiones -10 y +10 de la secuencia de nucleótidos del gen blanco de interés.

25 Las moléculas de ARN y ADN antisentido, ribozima y de triple hélice de la invención se pueden preparar por cualquier procedimiento conocido en la técnica para la síntesis de moléculas de ADN y ARN. Estos incluyen técnicas para sintetizar químicamente oligodesoxirribonucleótidos y oligorribonucleótidos bien conocidas en la técnica tales como por ejemplo, síntesis química de fosforamídita en fase sólida. Alternativamente, las moléculas de ARN se pueden generar por la transcripción *in vitro* e *in vivo* de secuencias de ADN que codifican la molécula de ARN antisentido. Dichas secuencias de ADN se pueden incorporar en una amplia variedad de vectores que incorporan promotores de ARN polimerasa tales como los promotores de polimerasa T7 o SP6. En forma alternativa, las construcciones de ADNc antisentido que sintetizan ARN antisentido en forma constitutiva o inducible, según el promotor usado, se pueden identificar en forma estable en las líneas celulares.

35 Se pueden introducir diversas modificaciones bien conocidas a las moléculas de ADN como medio de aumentar la estabilidad intracelular y la semivida. Las modificaciones posibles incluyen la adición de secuencias flanqueantes de ribo- o desoxinucleótidos en los extremos 5' y/o 3' de la molécula o el uso de fosforotioato o 2' O-metilo más que las uniones de fosfodiesterasa dentro del esqueleto del oligodesoxirribonucleótido.

### 40 *Tratamiento de enfermedades autoinmunes caracterizadas por la activación de células T*

La presente invención se refiere al uso de los compuestos que inhiben la activación de las células T y/o que inhiben la vía de p38 MAP quinasa en la preparación de un medicamento contra los trastornos relacionados con la activación de las células T. En particular, la invención se refiere al uso de los compuestos de guanilhidrazona multivalente y las moléculas antisentido en la preparación de un medicamento contra los trastornos relacionados con la activación de las células T. Los compuestos de la presente invención tienen utilidad en la preparación de un medicamento contra los trastornos que provienen más de una respuesta inmune inapropiada que de una respuesta insuficiente. Los ejemplos de dichos trastornos, incluyen afecciones atópicas (afecciones alérgicas mediadas por IgE), tales como asma, alergia, que incluye rinitis alérgica, dermatitis, que incluye psoriasis, sensibilidades a los patógenos, enfermedad inflamatoria crónica, autoinmunidad específica de órgano que incluye esclerosis múltiple, tiroiditis de Hashimoto y enfermedad de Grave, rechazo de injerto y enfermedad de injerto versus huésped. Otros trastornos inmunes que involucran la activación de las células T incluyen enfermedades y trastornos inflamatorios crónicos, tales como enfermedad de Crohn, lupus eritematoso sistémico, miastenia gravis, tiroiditis, artritis reactiva, que incluye enfermedad de Lyme, diabetes insulino dependiente, dermatitis por contacto, alergias gastrointestinales, que incluyen alergias alimentarias, eosinofilia, conjuntivitis, nefritis glomerular, ciertas sensibilidades a los patógenos tales como helmíntica (leishmaniasis), shock inducido por superantígeno grampositivo y ciertas infecciones virales, que incluyen VIH, e infecciones bacterianas, que incluyen tuberculosis y lepra lepromatosa.

60 Como se describió anteriormente, debido a sus propiedades farmacéuticas, los compuestos de la presente invención se pueden usar especialmente como agentes para tratar pacientes que sufren de trastornos relacionados con la activación de las células T. Dichos compuestos se pueden administrar a un paciente solos o en composiciones farmacéuticas donde se mezclan con vehículos o excipientes adecuados.

### 65 *Ensayo de detección*

Los siguientes ensayos se diseñan para identificar compuestos que interfieren o inhiben la vía de señalización de p38 MAP quinasa y, como resultado, inhiben la activación de las células T. Los compuestos pueden incluir compuestos

## ES 2 339 306 T3

sustituídos con guanilhidrazona de acuerdo con la fórmula 1 o fórmula 2 en la presente, y oligonucleótidos antisentido anti-p38 MAPK. Estos compuestos identificados como inhibidores de la vía de p38 MAP quinasa serían de utilidad en el tratamiento de las enfermedades o trastornos relacionados con la activación de las células T.

5 El ensayo identifica compuestos que inhiben la vía de p38 MAP quinasa y, como resultado, la activación de las células T. Los ensayos de la presente invención pueden incluir ensayos de quinasa *in vitro* que miden los efectos de los compuestos de ensayo sobre los componentes individuales de la vía de señalización de p38 MAP quinasa. Por ejemplo, estos ensayos pueden involucrar medir los efectos de un compuesto de ensayo sobre una mezcla de reacción que contiene el compuesto de ensayo y un lisado celular preparado a partir de las células T activadas y una cantidad de tiempo suficiente para que los componentes interactúen. La p38 MAP quinasa u otro componente de la vía, tal como MAPKAP-K2, se inmunoprecipita del lisado celular y se mide su actividad de quinasa usando un sustrato conocido de la quinasa, es decir, los factores de transcripción AFT-2, CHOP, HSP27 y Max. La actividad del componente p38 MAP quinasa se determinará como una medida del estado fosforilado del sustrato. A fin de analizar un compuesto para determinar la actividad inhibitoria, la mezcla de reacción se prepara en presencia y ausencia del compuesto de ensayo.

Las mezclas de reacción de control se incuban sin el compuesto de ensayo o con un placebo. La falta de fosforilación del sustrato indica que la MAP quinasa está inhibida para interactuar o fosforilar su sustrato.

20 En una realización particular, el sustrato blanco se puede preparar para la inmovilización usando técnicas de ADN recombinante usadas de rutina en la materia. Por ejemplo, la región codificadora del gen blanco se puede fusionar a un gen de glutatión-S-transferasa (GST) usando un vector de fusión, tal como pGEX-5X-1, de tal manera que su conformación se mantiene en la proteína de fusión resultante. En dicho ensayo, la proteína de fusión del gen blanco GST se puede anclar a las perlas de glutatión-agarosa. El lisado de células T activadas se puede añadir en presencia o ausencia del compuesto de ensayo de manera de permitir que la reacción de quinasa ocurra en presencia de <sup>32</sup>P-ATP. Al final del período de reacción, el material no unido se puede lavar, y el sustrato se puede analizar para determinar su estado fosforilado. La interacción entre la proteína del gen blanco y el componente de la vía de p38 MAP quinasa se puede detectar por la medición de la cantidad de radiactividad que queda asociada con las perlas de glutatión-agarosa. Una inhibición de la interacción exitosa por el compuesto de ensayo dará como resultado una reducción de la radiactividad medida.

25 En forma alternativa, la proteína de fusión del gen blanco GST y el extracto celular interactivo se pueden mezclar en un tampón de quinasa en presencia de <sup>32</sup>P-ATP, pero en ausencia de las perlas sólidas de glutatión-agarosa. El compuesto de ensayo se puede añadir tanto durante como después de permitir que las especies interactúen. Esta mezcla luego se puede añadir a las perlas de glutatión-agarosa y el material no unido se elimina. Nuevamente, se puede detectar el grado de inhibición de la reacción de quinasa entre el producto del gen blanco como sustrato y el componente de la vía de p38 MAP quinasa por la medición de la radiactividad asociada con las perlas.

30 Además, los ensayos de la presente invención pueden incluir otros ensayos *in vivo* para medir los efectos de los compuestos de ensayo sobre la activación de las células T. Por ejemplo, los compuestos de ensayo se pueden analizar en cuanto a su capacidad de inhibir la activación de las células T. En dichos ensayos, los compuestos de ensayo se pueden añadir a las células T coestimuladas con un  $\alpha$ -CD3 y  $\alpha$ -CD28. La estimulación de las células T debería producir la síntesis y secreción de las citoquinas, tales como IL-2. La inhibición de la secreción o síntesis de dichas citoquinas indica que el compuesto de ensayo inhibe la activación de las células T.

### 45 *Terapia de combinación antirretroviral*

De acuerdo con la presente invención, los compuestos de guanilhidrazona multivalente y los inhibidores de la vía de p38 MAPK se pueden usar en la terapia combinada para el tratamiento de las infecciones retrovirales, en particular la infección con VIH. Los compuestos sustituidos con guanilhidrazona se usan en combinación con otro agente antiviral o múltiples agentes antivirales para mejorar el efecto antiviral total. Dichos agentes antivirales adicionales que se pueden usar con los compuestos de guanilhidrazona multivalentes y los inhibidores de la vía de p38 MAPK que incluyen a aquellos que actúan sobre una molécula blanco diferente involucrada en la replicación viral, tal como, inhibidores de transcriptasa inversa, inhibidores de proteasa viral, inhibidores del complejo de preintegración e inhibidores de la glicosilación.

50 Los inhibidores de la vía de p38 MAPK o uno de sus derivados farmacéuticamente aceptables también se pueden usar en combinación con los inhibidores de retrovirus, tales como inhibidores de transcriptasa inversa, inhibidores de proteasa de VIH e inhibidores del complejo de preintegración. Los inhibidores de transcriptasa inversa incluyen 3'azido-3'-timidina (AZT) y dideoxiinosina (ddI), 2',3'-dideoxiadenosina (ddA); 2',3'-dideoxiguanosina (ddG); 2',3'-dideoxiinosina (ddI); 2',3'-didesoxicidina (ddC); 2',3'-didesoxitimidina (ddT); 2',3'-dideoxi-didesoxitimidina (d4T) y 3TC (comercializado con el nombre comercial de Epivir®); 2',3'-dideoxi-2'-fluronucleósidos; 2',3'-dideoxi-2'-fluoroadenosina; 2',3'-dideoxi-2'-fluorinosina; 2',3'-dideoxi-2'-fluorotimidina; 2',3'-dideoxi-2'-fluorocitosina; y 2',3'-dideoxi-2',3'-dideshidro-2'-fluronucleósidos; y 2',3'-dideoxi-2',3'-dideshidro-2'-fluorotimidina (Fd4T). Con preferencia, los 2',3'-dideoxi-2'-fluronucleósidos de la invención son aquellos en los que la unión al fluor está en la configuración beta, que incluye 2',3'-dideoxi-2'-beta-fluoroadenosina (F-ddA), 2',3'-dideoxi-2'-beta-fluorinosina (F-ddI), y 2',3'-dideoxi-2'-beta-fluorocitosina (F-ddC). Dichas combinaciones permiten usar una dosis más baja del derivado de nucleósido en consecuencia se reduce la toxicidad asociada con este agente,

sin pérdida de actividad antiviral debido al uso del inhibidor de la vía de p38 MAPK. Más aún, dicha combinación reduce o evita la resistencia viral, ya que la célula huésped, más que el virus, es el blanco de los inhibidores de p38 MAPK de la presente invención.

5 Las combinaciones preferidas de los inhibidores de la vía de p38 MAP quinasa y los derivados de nucleósidos dentro del alcance de la presente invención incluyen una cantidad efectiva de un compuesto sustituido con guanilhidrazona multivalente y una cantidad efectiva de AZT para tratar la infección con VIH; y una cantidad efectiva de un compuesto de guanilhidrazona multivalente y una cantidad efectiva de ddI, o una cantidad efectiva de un inhibidor del complejo de preintegración, tales como los que se describen en la Patente de Estados Unidos 5.574.040.

10 Los inhibidores de la vía de p38 MAP quinasa también se pueden usar en combinación con los inhibidores de uridina fosforilasa, que incluyen compuestos de aciclouridina, que incluyen bencilacilouridina (BAU); benciloxibencilacilouridina (BBAU); aminometil-bencilacilouridina (AMBAU); aminometil-benciloxibencilacilouridina (AMBBAU); hidroximetilbencilacilouridina (HMBAU); e hidroximetil-benciloxibencilacilouridina (HMBBAU).

15 De acuerdo con la presente invención, los inhibidores de vía de p38 MAPK o uno de sus derivados farmacéuticamente aceptables también se pueden usar en combinación con citoquinas o inhibidores de citoquina, que incluye rIFN  $\alpha$ , rIFN  $\beta$ , rIFN  $\gamma$ , IL-2, inhibidores de TNF $\alpha$ , y MNX-160. rIFN- $\alpha$ A (>108 UI/mg) y rIFN $\gamma$  humanas (1,4 x 108 UI/mg) se pueden obtener de Hoffman LaRoche. La rIFN  $\beta$  Ser 17 humana (1,0 x 108 UI/mg) se obtienen de Berlex Biosciences. IL-2 (interleuquina-2) se puede obtener comercialmente de Chiron. Los estándares de referencia se obtienen de la Organización Mundial de la Salud (IFN $\alpha$  humana WHO estándar B,69,19 e IFN  $\beta$  humana, WHO no. G-023-902-527, o el National Institute of Allergy and Infectious Disease, National Institute of Health no. G-023-901-530.

25 Los inhibidores de vía de p38 MAPK se pueden usar en combinación con los inhibidores de la proteasa viral, que incluye, MK-639 (Merck), Invirase (saquinavir, Roche), ABT-538 (Abbott, CAS Reg. No. 155213-67-5), AG1343, VX0478 (Burroughs Wellcome/Glaxo, CAS Reg. No. 161814-49-9), DMP450, SC-52151 (Telinavir). Se consideran generalmente que los inhibidores de proteasa actúan principalmente durante o después del ensamblaje (es decir, brote viral) para inhibir la maduración de los viriones a un estado infeccioso maduro. Por ejemplo, ABT-538 ha demostrado que tiene potente actividad antiviral *in vitro* y perfiles farmacocinéticos y de seguridad favorables *in vivo* (Ho *et al.*, Nature 373:123-126,1995). La administración de ABT-538 a los pacientes con SIDA produce que los niveles de VIH plasmáticos disminuyan exponencialmente y los recuentos de linfocitos CD4 aumentan sustancialmente. La reducción exponencial de la viremia plasmática después del tratamiento con ABT-538 refleja la eliminación de los viriones libres y la pérdida de células productoras de VIH-1 ya que el fármaco bloquea sustancialmente nuevas rondas de infección. El tratamiento con ABT-538 reduce la destrucción de los linfocitos CD4 mediada por virus. La combinación de este tratamiento con los inhibidores de la vía de la p38 MAP quinasa, que inhibe en una etapa diferente de la infección con VIH, tendría probablemente efectos sinérgicos y tendría una acción clínica significativa.

30 Los inhibidores de la vía de p38 MAPK o uno de sus derivados farmacéuticamente aceptables también se puede usar en combinación con una clase de fármacos anti-VIH que interfieren en el procesamiento de 5'-ARNm, por ejemplo ribavirina. (Ribavirina (Virazole) de Viratel Inc.). Si bien el mecanismo de acción de la ribavirina no es claro, se piensa que este fármaco compite con guanosina en la formación de estructuras terminales de ARNm y/o interfieren en la metilación funcional de estas moléculas. Además, los inhibidores de vía de p38 MAPK se pueden usar en combinación con agentes terapéuticos, tales como anfotericina B (Fungizona, obtenida de Gibco) un antibiótico antifúngico micrólido polieno que interactúa con esteroides y se une a ellos en forma irreversible. La anfotericina B representa una clase única de agentes que son activos contra una variedad de virus encapsulados por lípidos, que incluye VIH. Si bien la anfotericina B exhibe toxicidades graves *in vivo*, la forma de éster metílico de este fármaco también exhibe actividad anti-VIH y tiene un perfil de toxicidad celular bajo *in vitro*. En consecuencia, la anfotericina B o su éster metílico se pueden usar en la terapia de combinación con los inhibidores de vía de p38 MAPK.

35 Los inhibidores de la vía de p38 MAPK también se pueden usar en combinación con los inhibidores del procesamiento de glicoproteína, tal como castanospermina (Boehringer Mannheim). La castanospermina es un alcaloide vegetal que inhibe el procesamiento de glicoproteínas, y actúa como un anti-VIH ya que el VIH contiene dos proteínas fuertemente glicosiladas, gp120 y gp41. La glicosilación de proteínas cumple un papel importante en la interacción gp120 con CD4. En condiciones de infección por los viriones de la progenie sintetizada en presencia de castanospermina, se atenuó la infectividad de VIH.

40 Las combinaciones preferidas usadas en los procedimientos de tratamiento de VIH incluyen el uso de una cantidad efectiva de un compuesto sustituido con guanilhidrazona multivalente y una cantidad efectiva de ddI; el uso de una cantidad efectiva de un compuesto de guanilhidrazona multivalente y una cantidad efectiva de 3TC; y el uso de una cantidad efectiva de un compuesto sustituido con guanilhidrazona multivalente y una cantidad efectiva de ribavirina.

#### *Usos terapéuticos, vías de administración y formulaciones*

45 Los inhibidores de la vía de p38 MAPK se pueden usar para lograr efectos antivirales contra la infección viral diferente de VIH, tal como HBV, EBV, CMV y otras infecciones oportunistas que incluyen TB. Las dosis efectivas de la terapia de combinación que se describen a continuación se pueden formular en portadores farmacológicos adecuados y se pueden administrar por cualquiera de los medios apropiados, que incluye inyección (intravenosa, intraperitoneal,

## ES 2 339 306 T3

intramuscular, subcutáneo), por la absorción a través de los revestimientos epiteliales o mucocutáneos (revestimientos de la mucosa oral, rectal y epitelio vaginal, mucosa nasofaríngea, mucosa intestinal); oral, transdérmico o cualquier otro medio disponible en las artes farmacéuticas.

5 Un compuesto se puede administrar a un paciente humano por sí mismo en composiciones farmacéuticas donde se mezcla con vehículos o excipientes adecuados en dosis para tratar o mejorar varias enfermedades que involucran la activación de las células T y la infección viral. Una dosis terapéuticamente efectiva además se refiere a la cantidad del compuesto suficiente para inhibir la activación de las células T y/o la infección con VIH. Las dosis terapéuticamente efectivas se pueden administrar solas o como terapia adyuvante en combinación con otros tratamientos para la  
10 infección con VIH o enfermedades asociadas. Las técnicas para la formulación y administración de los compuestos de la presente solicitud se pueden hallar en "Remington's Pharmaceutical Sciences" Mack Publishing Co., Easton, PA, última edición.

15 Las vías adecuadas de administración, por ejemplo, pueden incluir administración oral, rectal, transmucosa o intestinal; administración parenteral, que incluye inyecciones intramuscular, subcutánea, intramedular, así como inyecciones intratecal, intraventricular directa, intravenosa, intraperitoneal, intranasal o intraocular y opcionalmente en una formulación con acción de depósito o de liberación sostenida.

20 Además, se puede administrar el agente de la presente invención en un sistema de administración dirigida de fármacos, por ejemplo en un liposoma recubierto con un anticuerpo anti-CD4. Los liposomas serán dirigidos y captados selectivamente por las células que expresan CD4.

25 Las composiciones farmacéuticas se pueden fabricar por medio de procesos convencionales de mezclado, disolución, preparación de grageas, levigación, emulsificación, encapsulado, atrapamiento o liofilización. Las composiciones farmacéuticas para usar de acuerdo con la invención se pueden formular de manera convencional usando uno o más vehículos fisiológicamente aceptables que comprenden excipientes y auxiliares que facilitan el procesamiento de los principios activos en las preparaciones que se pueden usar en forma farmacéutica. La formulación apropiada es dependiente de la vía de administración elegida.

30 Para la inyección, los agentes de la invención se pueden formular en las soluciones acuosas, con preferencia en tampones fisiológicamente aceptables, tales como solución de Hank, solución de Ringer o tampón de solución salina fisiológica. Para la administración transmucosa, se usan penetrantes apropiados para permear la barrera en la formulación. Tales penetrantes son usualmente conocidos en la técnica.

35 Para la administración oral, los compuestos se pueden formular por la combinación de los compuestos activos con vehículos farmacéuticamente aceptables. Dichos vehículos permiten formular los compuestos como comprimidos, pastillas, grageas, cápsulas, líquidos, geles, jarabes, emulsiones, suspensiones y similares, para ingestión oral por un paciente tratado. Las preparaciones farmacéuticas para uso oral se pueden obtener en un excipiente sólido, opcionalmente por molienda de una mezcla resultante y procesamiento de la mezcla de los gránulos, después de añadir  
40 auxiliares adecuados, según corresponda, para obtener núcleos de comprimidos o grageas. Los excipientes adecuados en particular, rellenos tales como azúcares, que incluye lactosa, sacarosa, manitol o sorbitol; preparaciones de celulosa tales como, por ejemplo, almidón de maíz, almidón de trigo, almidón de arroz, almidón de papa, gelatina, goma de tragacanto, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, carboximetilcelulosa sódica y/o polivinilpirrolidona (PVP). Si se desea, se pueden añadir agentes desintegrantes, tales como polivinilpirrolidona entrecruzada, agar, o ácido algínico  
45 o una de sus sales tales como alginato de sodio.

50 Se proporcionan núcleos de grageas con cubiertas adecuadas. Para este fin, se pueden usar soluciones concentradas de azúcar, que pueden contener opcionalmente goma arábiga, talco, polivinilpirrolidona, gel de carbopol, polietilenglicol y/o dióxido de titanio, soluciones de laca y disolventes orgánicos adecuados y mezclas de disolventes. Se pueden añadir colorantes o pigmentos a las cubiertas de comprimidos o grageas para la identificación o para caracterizar diferentes combinaciones de dosis de principio activo.

55 Las preparaciones farmacéuticas que se pueden usar en forma oral incluyen cápsulas duras hechas de gelatina, así como cápsulas selladas blandas hechas de gelatina y un plastificante, tales como glicerol o sorbitol. Las cápsulas duras pueden contener los ingredientes activos en mezcla con relleno tales como lactosa, aglutinantes tales como almidones y/o lubricantes tales como talco o estearato de magnesio y, opcionalmente, estabilizantes. En las cápsulas blandas, los compuestos activos se pueden disolver o suspender en líquidos adecuados, tales como aceites grasos, parafina líquida o glicoles de polietilenglicoles. Además, se pueden añadir estabilizantes. Todas las formulaciones para la administración oral deben estar en dosis adecuadas para dicha administración.  
60

65 Para la administración bucal, las composiciones pueden adoptar la forma de comprimidos o pastillas formuladas en forma convencional. Para la administración por inhalación, los compuestos para uso de acuerdo con la invención se administran en la presentación en spray aerosol a partir de envases presurizados o un nebulizador, con el uso de un propelente adecuado, tal como, diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano, dióxido de carbono u otro gas adecuado. En el caso de un aerosol, se puede determinar la unidad de dosis por la provisión de una válvula para administrar una cantidad medida. Las cápsulas y los cartuchos de gelatina para uso en un inhalador o insuflador se pueden formular con una mezcla de polvo del compuesto y una base de polvo adecuado tales como lactosa o almidón.

## ES 2 339 306 T3

Los compuestos se pueden formular para administración parenteral por inyección, tales como, por inyección en bolo o infusión continua. Las formulaciones para inyección se pueden presentar en forma de dosis unitarias, por ejemplo, en ampollas o en envases multidosis, con el agregado de un conservante. Las composiciones pueden adoptar formas tales como suspensiones, soluciones o emulsiones en vehículos oleosos o acuosos, y pueden contener agentes de formulación tales como agentes de suspensión, estabilizantes y/o de dispersión.

Las formulaciones farmacéuticas para administración parenteral incluyen soluciones acuosas de los principios activos en forma hidrosoluble. En forma adicional, las suspensiones de los principios activos se pueden preparar como suspensiones de inyección oleosas apropiadas. Los disolventes o vehículos lipofílicos adecuados incluyen aceites grasos tales como aceite de sésamo, o ésteres de ácidos grasos sintéticos, tales como oleato de etilo o triglicéridos o liposomas. Las suspensiones inyectables acuosas pueden contener sustancias que aumentan la viscosidad de la suspensión, tales como carboximetilcelulosa sódica, sorbitol o dextrano. Opcionalmente, la suspensión también puede contener estabilizantes adecuados o agentes que aumentan la solubilidad de los compuestos para permitir la preparación de soluciones altamente concentradas. En forma alternativa, el ingrediente activo puede estar en forma de polvo para la reconstitución con un vehículo adecuado antes de la inyección, tal como, agua estéril libre de pirógenos.

Los liposomas y las emulsiones son ejemplos conocidos de vehículos o portadores de administración para los fármacos hidrofóbos. También se pueden emplear ciertos disolventes orgánicos tales como dimetilsulfóxido, aunque usualmente al costo de mayor toxicidad. En forma adicional, los compuestos se pueden administrar usando un sistema de liberación sostenida, tales como matrices semipermeables de polímeros hidrofóbos sólidos que contienen el agente terapéutico. Se han establecido varios materiales de liberación sostenida y son bien conocidas por los expertos en la técnica. Las cápsulas de liberación sostenida, de acuerdo con su naturaleza química, pueden liberar los compuestos durante unas pocas semanas hasta más de 100 días. De acuerdo con la naturaleza química y la estabilidad biológica del reactivo terapéutico, se pueden emplear estrategias adicionales para la estabilización de proteínas.

Las composiciones farmacéuticas también pueden comprender vehículos o excipientes en fase sólida o gel adecuados. Los ejemplos de dichos vehículos o excipientes incluyen carbonato de calcio, fosfato de calcio, varios azúcares, almidones, derivados de celulosa, gelatina y polímeros tales como polietilenglicoles.

Muchos de los compuestos de la invención identificados como inhibidores de la vía de señalización p38 MAPK se pueden proporcionar como sales con contraiones farmacéuticamente compatibles. Las sales farmacéuticamente compatibles se pueden formar con muchos ácidos, que incluyen clorhídrico, sulfúrico, acético, láctico, tartárico, málico, succínico, etc.; o con bases. Las sales tienden a ser más solubles en disolventes acuosos u otros protónicos que son las correspondientes formas de base libre. Los ejemplos de sales, vehículos o excipientes farmacéuticamente aceptables son bien conocidos en la técnica y se pueden hallar, por ejemplo, en Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Edición, A.R. Gennaro, Ed., Mack Publishing Co., Easton, PA, 1990. Tales sales incluyen sales de sodio, potasio, litio, calcio, magnesio, hierro, zinc, hidrócloruro, hidrobromuro, hidroyoduro, acetato, citrato, tartrato, malato y similares.

Las composiciones farmacéuticas adecuadas para uso en la presente invención incluyen composiciones en el que los ingredientes activos están contenidos en una cantidad efectiva para lograr su propósito deseado. En forma más específica, una cantidad terapéuticamente efectiva significa una cantidad efectiva para evitar el desarrollo o aliviar los síntomas existentes del sujeto tratado. La determinación de las cantidades efectivas está bien dentro de la capacidad de los expertos en la técnica, especialmente a la luz de la descripción detallada provista en la presente.

Para cualquier compuesto usado en el procedimiento de la invención, la dosis terapéuticamente efectiva se puede estimar inicialmente a partir de los ensayos de cultivo celular. Tal información se puede usar para determinar más precisamente las dosis útiles en los seres humanos.

Una dosis terapéuticamente efectiva se refiere a que la cantidad del compuesto que origina una reducción de la intensidad de la infección o la mejoría de los síntomas o una prolongación de los síntomas o una prolongación de la supervivencia de un paciente. La toxicidad y eficacia terapéutica de tales compuestos se pueden determinar por procedimientos farmacéuticos, farmacológicos y toxicológicos estándares en los cultivos celulares o animales experimentales para determinar la  $DL_{50}$  (la dosis letal a 50% de la población) y la  $DE_{50}$  (la dosis terapéuticamente efectiva en el 50% de la población). La relación de dosis entre los efectos tóxico y terapéutico es el índice terapéutico y se puede expresar como la relación entre  $DL_{50}$  y  $DE_{50}$ . Se prefieren los compuestos que exhiben índices terapéuticos altos. Los datos obtenidos de los ensayos de cultivos celulares o estudios de animales se pueden usar para formular un intervalo de dosis para uso en seres humanos. La dosis de dichos compuestos con preferencia se halla en un intervalo de concentraciones que incluye la  $DE_{50}$  con poca o ninguna toxicidad. La dosis puede variar dentro de este intervalo que depende de la forma de dosis empleada y la vía de administración utilizada.

La cantidad y el intervalo de dosis se pueden ajustar en forma individual para proporcionar los niveles plasmáticos del residuo activo que son suficientes para mantener los efectos de modulación deseados o concentración efectiva mínima (MEC). La MEC variará para cada compuesto pero se puede estimar a partir de los datos *in vitro*; tales como, la concentración necesaria para obtener un 50-90% de inhibición de la infección con VIH usando los ensayos descritos en la presente. Las dosis necesarias para obtener la MEC dependerán de las características individuales y la vía de administración. Sin embargo, los ensayos de HPLC, bioensayos o inmunoensayos se pueden usar para determinar las concentraciones plasmáticas.

## ES 2 339 306 T3

La cantidad de composición administrada dependerá del sujeto tratado, del peso del sujeto, la gravedad de la afección, la manera de administración y el criterio del médico de prescripción.

### Ejemplo 1

Este ejemplo ilustra un experimento que muestra que un ejemplo de compuesto sustituido con guanilhidrazona, CNI-1493 (tetrahidrocloreuro de N,N'-bis(3,5-diacetilfenil)-decanodiamidatetrakis-(amidinohidrazona)) inhibió la vía de la p38 MAP quinasa. Se ha demostrado que CNI-1493 inhibe la producción de TNF por los macrófagos activados por LPS. CNI-1493 bloqueó la síntesis de una forma de TNF de membrana de 26 kDA, lo que indica que se inhibió la traducción de proteínas. Otra evidencia para el mecanismo de supresión de la traducción fue dada por los experimentos que usan las construcciones en las que la 5'UTR y la 3'UTR de TNF para dirigir la expresión de una molécula indicadora. Las regiones 5'UTR y 3'UTR del gen de TNF fueron necesarias para inducir la supresión de traducción máxima por CNI-1493. Después se determinó que el efecto de CNI-1493 sobre p38 MAPK ya que p38 MAPK ha sido implicada en la regulación de la traducción de TNF. El pretratamiento de los PBMC humanos con CNI-1493, produjo la supresión de la actividad de p38 MAPK después de la adición de LPS. Estos resultados indican que CNI-1493 inhibe en forma específica la activación de la vía de transducción de señales de la p38 MAPK en la producción de TNF mediada por LPS.

### Ejemplo 2

Este ejemplo ilustra un experimento que muestra que la vía de la p38 MAP quinasa participa en la coestimulación de los linfocitos T. La coestimulación de los linfocitos T ocurre cuando dos señales independientes se aplican a las células T, tales como  $\alpha$ -CD3 inmovilizado y  $\alpha$ -CD28 soluble, lo que produce la activación de las células T y, entre otras manifestaciones, la producción de IL-2. Dos miembros de la familia MAPK de las moléculas de transducción de señales, ERK y JNK, han estado implicadas previamente en la coestimulación de las células T. Se ha demostrado que p38 cumple un papel durante la activación de los monocitos y macrófagos, sin embargo se sabe poco acerca del papel de p38 MAPK en las células T.

Para los estudios de células T humanas, se obtuvieron las capas leucocitarias por elutriación de dadores humanos normales a Long Island Blood Bank Services. Se aislaron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) mediante centrifugación por gradiente de densidad a través de Ficoll-Hypaque (Hypaque, Pharmacia); normalmente una preparación produjo  $200 \times 10^6$  células. Las células T se aislaron por el paso a través de una columna de células T (R&D) según las instrucciones del fabricante. Las células Jurkat se obtuvieron de ATCC y se mantuvieron en DMEM que contiene 10% de suero bovino fetal inactivado por calor, antibióticos y L-glutamina.

Un anticuerpo policlonal de conejo contra p38, y el plásmido recombinante GST-AFT2 fueron un obsequio del Dr. Roger Davis (Howard Hughes Institute, Worcester, MA). Una proteína de fusión GST-AFT2 se purificó por cromatografía de afinidad usando glutatión-agarosa, según las instrucciones del fabricante (Pharmacia, Inc.). El anticuerpo monoclonal anti-CD3 humano se adquirió en Pharmingen y se adquirió un anticuerpo monoclonal anti-CD28 humano.

Se prepararon lisados de células enteras usando tampón de lisis de quinasa, que contiene una concentración final 20 mM de Tris, pH 7,5, 10% de glicerol, 1% de Triton X-100, 0,137 M de NaCl, 25 mM de B-glicerofosfato, 2 mM de EDTA, 1 mM de ortovanadato, 2 mM de pirofosfato, 10  $\mu$ g/ml de Leupeptina, 1 mM de PMSF. Las proteínas se fraccionaron en un gel de 12% de SDS-PAGE, se transfirieron por electroforesis a membranas de PVDF (Biorad, Inc.) y se probaron con una dilución 1:1000 de un anticuerpo policlonal de conejo que reconoce en forma inmunoespecífica p38 MAPK fosforilada humana (Santa Cruz Biotechnology, Inc.). La unión al anticuerpo se detectó usando quimioluminiscencia mejorada (Amersham Internacional PLC).

Se lisaron  $2-5 \times 10^6$  células después del pretratamiento apropiado en 500-1000  $\mu$ l de tampón de lisis de quinasa y se centrifugaron a 14.000 x g durante 15 minutos a 4°C. El p38 endógeno se inmunoprecipitó con anticuerpo policlonal p38 preunido a proteína-A agarosa durante una hora a temperatura ambiente. Las perlas de agarosa con proteína p38 MAPK inmunoprecipitada se lavaron dos veces con el tampón de lisis descrito anteriormente y se realizaron los ensayos de quinasa por lavado dos veces con tampón de quinasa (25 mM de Hepes, pH 7,4, 25 mM de B-glicerofosfato, 25 mM de MgCl<sub>2</sub>, 2 mM de ditiotretol, 0,1 mM de ortovanadato), y la incubación con 5  $\mu$ g de proteína sustrato (GST-ATF2), y 50  $\mu$ M ( $\gamma$ -<sup>32</sup>P) de ATP (10 Ci/mmol) en un volumen final de 30  $\mu$ l. Las reacciones se detuvieron después de 30 minutos por ebullición en un volumen equivalente de tampón de muestra 2X Laemmli. El sustrato fosforilado se visualizó usando SDS-PAGE por autorradiografía y análisis phosphorImager (Amersham, Inc.).

La coestimulación de células T produjo actividad de la p38 quinasa sinérgica. Para analizar si p38 MAP quinasa fue estimulada durante la coestimulación de las células T, los anticuerpos para CD3 y CD28 se usaron en forma individual y en combinación contra las células Jurkat *in vitro*. Las células Jurkat se trataron con anti-CD3 inmovilizado, CD28 soluble o ambos durante media hora, se recolectaron y ensayaron para determinar actividad de p38 MAP por la medición de la fosforilación de un blanco de p38 MAPK conocido, el factor de transcripción ATF2. La adición de CD3 solo estimuló la actividad de p38 MAPK 3 veces, mientras que la adición de anti-CD28 solo estimuló la actividad de p38 MAPK 5 veces. La coestimulación por adición de los anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 produjo actividad de p38 MAPK sinérgica, que aumenta 12 veces. La coestimulación por adición de los anticuerpos anti-CD3 y anti-CD produjo actividad de p38 MAPK sinérgica, que aumenta 12 veces respecto de los niveles basales, medido en forma densitométrica. La activación de p38 MAPK fue inhibida por CNI-1493 en monocitos y macrófagos después

## ES 2 339 306 T3

de la estimulación con lipopolisacáridos, aunque no está claro si p38 MAPK o sus activadores ascendentes son el blanco directo del fármaco. Se añadió CNI-1493 a las células Jurkat expuestas a anti-CD3, anti-CD28 o ambos anti-CD3+anti-CD28 para analizar si este agente podía inhibir la actividad de p38 MAPK inducida por la coestimulación. La inhibición de la actividad de p38 MAP quinasa observada por CNI-1493 fue dependiente de la dosis. Si bien la estimulación de anti-CD3 no fue afectada por CNI-1493, la estimulación de p38 MAPK fue inhibida aproximadamente en 50%, y la coestimulación con anti-CD3 y anti-28 fue inhibida completamente a una dosis de anti-CD28 1,5  $\mu$ M. En consecuencia, CNI-1493 inhibió la actividad de p38 MAP quinasa estimulada durante la coactivación de las células T.

### Ejemplo 3

Este ejemplo ilustra una función de la vía de p38 MAP quinasa en la infección con VIH-1 de las células T primarias, en forma específica referida a la hipótesis de que se requiere la activación de p38 MAPK para la infección con VIH-1 de las los linfocitos T primarios. En los estudios de células T humanas, se obtuvieron capas leucocitarias por elutriación de dadores humanos normales a Long Island Blood Bank Services. Se aislaron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) mediante centrifugación por gradiente de densidad a través de Ficoll-Hypaque (Hypaque, Pharmacia). Normalmente una preparación produjo  $200 \times 10^6$  células. Las células T se aislaron por el paso a través de una columna de células T (R&D) según las instrucciones del fabricante. Las células Jurkat se obtuvieron de ATCC y se mantuvieron en DMEM que contiene 10% de suero bovino fetal inactivado por calor, antibióticos y L-glutamina.

Las células T se prepararon por separación de Ficoll-Hypaque, exclusión de adherencia de monocitos y activación con PHA (5  $\mu$ g/ml) durante 3 días en RPMI 1640 + 10% de FCS + L-glutamina + antibióticos (PS). Después de preparar los patrones de VIH 1-LAV y titular en las células CEM, las células T se lavaron e incubaron con 1000 unidades infecciosas de cultivo de tejido (TCIU) del virus durante 2 horas a 37 grados C, se lavaron y se agregó medio fresco que contiene IL-2 20 U/ml. En varios momentos predeterminados después de la infección, se prepararon lisados celulares.

Un anticuerpo policlonal de conejo contra p38, y el plásmido recombinante GST-AFT2 fueron un obsequio del Dr. Roger Davis (Howard Hughes Institute, Worcester, MA). Una proteína de fusión GST-AFT2 se purificó por cromatografía de afinidad usando glutatión-agarosa, según las instrucciones del fabricante (Pharmacia, Inc.). El anticuerpo monoclonal anti-CD3 humano se adquirió en Pharmingen y se adquirió un anticuerpo monoclonal anti-CD28 humano.

Se prepararon lisados de células enteras usando tampón de lisis de quinasa, que contiene una concentración final de 20 mM Tris pH 7,5, 10% de glicerol, 1% de Triton X-100, 0,137 M de NaCl, 25 mM de B-glicerofosfato, 2 mM de EDTA, 1 mM de ortovanadato, 2 mM de pirofosfato, 10  $\mu$ g/ml de Leupeptina, 1 mM de PMSF. Las proteínas se fraccionaron en un gel de 12% de SDS-PAGE, se transfirieron por electroforesis a membranas de PVDF (Biorad, Inc.) y se probaron con una dilución 1:1000 de un anticuerpo policlonal de conejo que reconoce en forma inmunoespecífica p38 MAPK fosforilada humana (Santa Cruz Biotechnology, Inc.). La unión al anticuerpo se detectó usando quimioluminiscencia mejorada (Amersham Internacional PLC).

Se lisaron  $2-5 \times 10^6$  células después del pretratamiento apropiado en 500-1000  $\mu$ l de tampón de lisis de quinasa y se centrifugaron a 14.000 x g durante 15 minutos a 4°C. El p38 endógeno se inmunoprecipitó con anticuerpo policlonal p38 preunido a proteína-A agarosa durante un hora a temperatura ambiente. Las perlas de agarosa con proteína p38 MAPK inmunoprecipitada se lavaron dos veces con el tampón de lisis descrito anteriormente y se realizaron los ensayos de quinasa por lavado dos veces con tampón de quinasa (25 mM de Hepes pH 7,4, 25 mM de B-glicerofosfato, 25 mM de MgCl<sub>2</sub>, 2 mM de ditiotreitól, 0,1 mM de ortovanadato), y la incubación con 5  $\mu$ g de proteína sustrato (GST-ATF2), y 50  $\mu$ M ( $\gamma$ -<sup>32</sup>P) de ATP (10 Ci/mmol) en un volumen final de 30  $\mu$ l. Las reacciones se detuvieron después de 30 minutos por ebullición en un volumen equivalente de tampón de muestra 2X Laemmli. El sustrato fosforilado se visualizó usando SDS-PAGE por autorradiografía y análisis phosphorimager (Amersham, Inc.).

Para los experimentos antisentido, se usaron fosfotiorato de octadecaoligonucleótidos que codifican para los pb 324-341 tanto homosentido (5' GCAGGAGCTGAACAAGAC3' SEQ ID NO.:1) como antisentido (5' GTCTTGTT-CAGTCCTGC3' SEQ ID NO.:2), sobre la base de la secuencia para p38 MAPK humana (Han *et al.*, Biochem Biophys. Acta 1265:224, 1995). Las células T se infectaron con HIV1-LAV en presencia de octadecaoligonucleótido 1  $\mu$ M, las células se volvieron a alimentar cada 3-4 días con el medio que contiene oligómero fresco y sobrenadantes recolectados en varios momentos predeterminados para el ensayo de RT. De forma simultánea, las células también se sembraron, se trataron de modo similar y se recolectaron para los niveles de fosfo-p38 MAPK analizados por inmunoprecipitación en variados momentos predeterminados. Las Figuras 1-3 muestran el efecto de la adición de oligonucleótidos sentido y antisentido p38 MAPK sobre los niveles de fosfo-p38 y su correlación con la replicación del VIH, medido por RT.

Los linfocitos primarios T se aislaron de donantes normales estimulados con PHA durante 2-3 días, y luego se infectaron con la cepa LAV del VIH. Apenas transcurridos 30 minutos de la posinfección, se observó un rápido aumento en la fosforilación de p38 MAP quinasa en las células infectadas con VIH, en comparación con las células no infectadas control (Figuras 1A y 1 B). Los niveles de la actividad de p38 MAP quinasa permanecieron elevados (450% de aumento en comparación con las células infectadas;  $p < 0,05$  durante hasta 2 horas después de la introducción del virus en las células T cultivadas. La magnitud de la activación de p38 en las células T como consecuencia de la infección con VIH correlacionó bien con el incrementos en la p38 MAPK observada en macrófagos después de la activación por estímulos conocidos de la p38 MAPK tales como UV, TNF y LPS (Raugeaud *et al.*, J. Biol. Chem.

## ES 2 339 306 T3

270:27395, 1995). Las cinéticas de la activación de p38 MAPK en los dos tipos celulares también fueron similares ya que permanecen elevadas durante hasta dos horas pero después retornan a los niveles basales en 6 horas.

5 Estos resultados sugieren la posibilidad de que la infección VIH-1 de las células T requiere activación de la vía de p38 MAPK. Las células T primarias activadas con PHA se pretrataron (o no) con CNI-1493 durante una hora, se infectaron con la cepa LAV del VIH, y la actividad de TR se midió en varios momentos predeterminados después de la infección, hasta 10 días. Como se muestra en la Figura 2B, CNI-1493 inhibió la replicación del VIH en las células T en una forma dependiente de la dosis, con una  $IC_{50}$  de aproximadamente  $0,5 \mu M$ . Un período de tiempo del efecto de CNI-1493 ( $1 \mu M$ ) sobre la replicación del VIH se muestra en la Figura 2B. El efecto de CNI-1493 sobre la supresión de la actividad de p38 MAP quinasa durante este período se correlacionó con su efecto supresor sobre la replicación del VIH (Figura 2C, 2D).

15 Evidencia adicional de la necesidad de activación de la p38 MAPK en una infección con VIH-1 de las células T se obtuvo de los experimentos en que se bloqueó la actividad de p38 MAP quinasa por la adición de oligonucleótidos antisentido. Los oligómeros p38 MAPK homosen sentido y antisentido fosforilados a las células T primarias infectadas con LAV se añadieron simultáneamente con el virus, y luego se volvieron a cargar cada tres días a partir de este momento hasta el día 10. Los oligonucleótidos antisentido de p38 MAP quinasa disminuyeron la replicación de VIH en forma proporcional a la disminución de la actividad de fosfo-p38 MAPK en el día 7 y día 10 después de la infección (Figura 3). En consecuencia, dos procedimientos independientes que suprimen la activación de p38 MAPK (CNI-1493 y oligonucleótidos antisentido), cada uno que inhibe la replicación del VIH, sugieren que la activación de p38 MAPK es necesaria para la replicación máxima del VIH.

25 Las quimioquinas CC MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$  y RANTES han demostrado recientemente que inhiben la replicación del VIH en las células T (Geng *et al.*, J. Immunol. 151:6692, 1993) y esto sugiere que estas moléculas pueden cumplir un papel en la defensa del huésped contra la infección viral. Debido a que las terapias anti-VIH no deberían interferir en la capacidad del huésped de montar su propia defensa, también se evaluó si la inhibición de la vía de transducción de señales de la p38 MAP quinasa inhibe la producción de quimioquinas en las células T. Los niveles de MIP-1 $\alpha$  y MIP-1 $\beta$  durante la infección con LAV de las células T primarias no se redujeron con CNI-1493 (Figura 4). Los niveles de MIP-1 $\alpha$  y MIP-1 $\beta$  descendieron ligeramente en forma tardía en la infección con VIH-1 (día 9). En presencia de CNI-1493, sin embargo, los niveles de quimioquina se elevaron ligeramente (día 6) o de manera normal (día 9). En consecuencia, la supresión de la actividad de p38 MAP quinasa durante la infección con VIH de las células T no afectó adversamente un mecanismo que contribuye a la inmunidad natural de las células frente al virus, en forma de expresión de quimioquina, a la vez que inhibe simultáneamente la replicación del VIH.

35 Cuando se consideran en conjunto, estos resultados identifican a la vía de transducción de señales de p38 MAP quinasa como crítica para la máxima infectividad *in vitro* de las células T primarias con el VIH-1. La estimulación de la actividad de p38 MAPK fue temprana (dentro de 30 minutos) después de la introducción del virus, y permaneció elevada hasta 9 días posinfección. La inhibición de la vía de p38 MAPK con CNI-1493, así como por los oligonucleótidos antisentido de p38 fue capaz de reducir la replicación del VIH, medida por TR. La secreción de quimioquinas, potentes moléculas inmunoinhibidoras naturales contra el VIH, no está afectada. Por consiguiente, la p38 MAPK quinasa representa un nuevo blanco terapéutico contra la infección primaria con VIH de las células T.

45

50

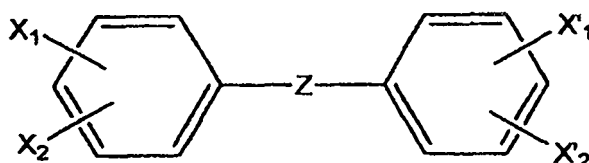
55

60

65

## REIVINDICACIONES

1. Uso de un compuesto que tiene la fórmula:



en la que:  $X_2 = \text{GhyCH-}$ ,  $\text{GhyCCH}_3\text{-}$  o  $\text{H-}$ ;  $X_1$ ,  $X'_1$  y  $X'_2$ , independientemente =  $\text{GhyCH-}$  o  $\text{GhyCCH}_3\text{-}$ ;  $Z = \text{-NH}(\text{CO})_n\text{H-}$ ,  $\text{-(C}_6\text{H}_4\text{)-}$ ,  $\text{-(C}_5\text{NH}_3\text{)-}$  o  $\text{-A-(CH}_2\text{)}_n\text{-A-}$ ,  $n=2\text{-}10$ , que es no sustituido, mono- o di-C-sustituido con metilo, o uno de sus derivados mono- o di-insaturado; y  $A =$  independientemente  $\text{-NH(CO)-}$ ,  $\text{-(CO)}_n\text{H-}$ ,  $\text{-NH(CO)NH-}$ ,  $\text{-NH-}$  u  $\text{-O-}$  y sus sales, en la preparación de un medicamento contra un trastorno o enfermedad seleccionada del grupo que consiste en enfermedad atópica, enfermedad alérgica mediada por IgE, asma, alergia, rinitis alérgica, dermatitis, psoriasis, sensibilidad a patógenos, esclerosis múltiple, tiroiditis de Hashimoto, enfermedad de Grave, enfermedad de Crohn, lupus eritematoso sistémico, miastenia gravis, tiroiditis, artritis reactiva, enfermedad de Lyme, diabetes insulino dependiente, dermatitis por contacto, alergias gastrointestinales, alergia alimentaria, eosinofilia, conjuntivitis, nefritis glomerular, helmíntica (leishmaniasis), shock inducido por superantígeno grampositivo, VIH, infección bacteriana, tuberculosis y lepra lepromatosa.

2. Uso de acuerdo con la reivindicación 1 en el que, cuando  $X_2$  es  $\text{GhyCH-}$  o  $\text{GhyCCH}_3\text{-}$ ,  $X_2$  es meta o para a  $X_1$  y  $X'_2$  es meta o para a  $X'_1$ .

3. Uso de acuerdo con la reivindicación 2 en el que el compuesto es tetrahidrocloruro de N,N'-bis(3,5-diacetilfenil) decanodiamidatetrakis(amidinohidrazona).

4. Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes en el que el trastorno es infección con VIH.

5. Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que la enfermedad es causada por una infección viral.

6. Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3 en el que la enfermedad es una enfermedad autoinmune seleccionada del grupo que consiste en lupus eritematoso sistémico, diabetes insulino dependiente, tiroiditis y psoriasis.

7. Uso de una molécula antisentido complementaria con p38 MAPK en la preparación de un medicamento contra un trastorno o enfermedad seleccionada del grupo que consiste en enfermedad atópica, enfermedad alérgica mediada por IgE, asma, alergia, rinitis alérgica, dermatitis, psoriasis, sensibilidad a patógenos, esclerosis múltiple, tiroiditis de Hashimoto, enfermedad de Grave, enfermedad de Crohn, lupus eritematoso sistémico, miastenia gravis, tiroiditis, artritis reactiva, enfermedad de Lyme, diabetes insulino dependiente, dermatitis por contacto, alergias gastrointestinales, alergia alimentaria, eosinofilia, conjuntivitis, nefritis glomerular, helmíntica (leishmaniasis), shock inducido por superantígeno grampositivo, VIH, infección bacteriana, tuberculosis y lepra lepromatosa.

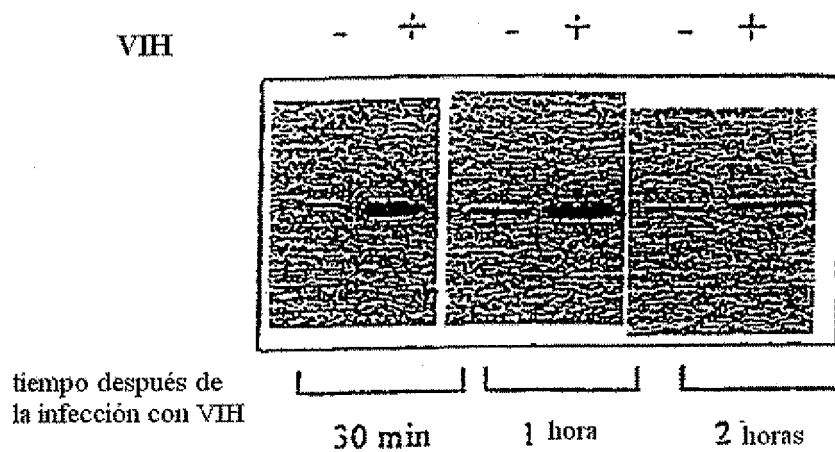


Figura 1A

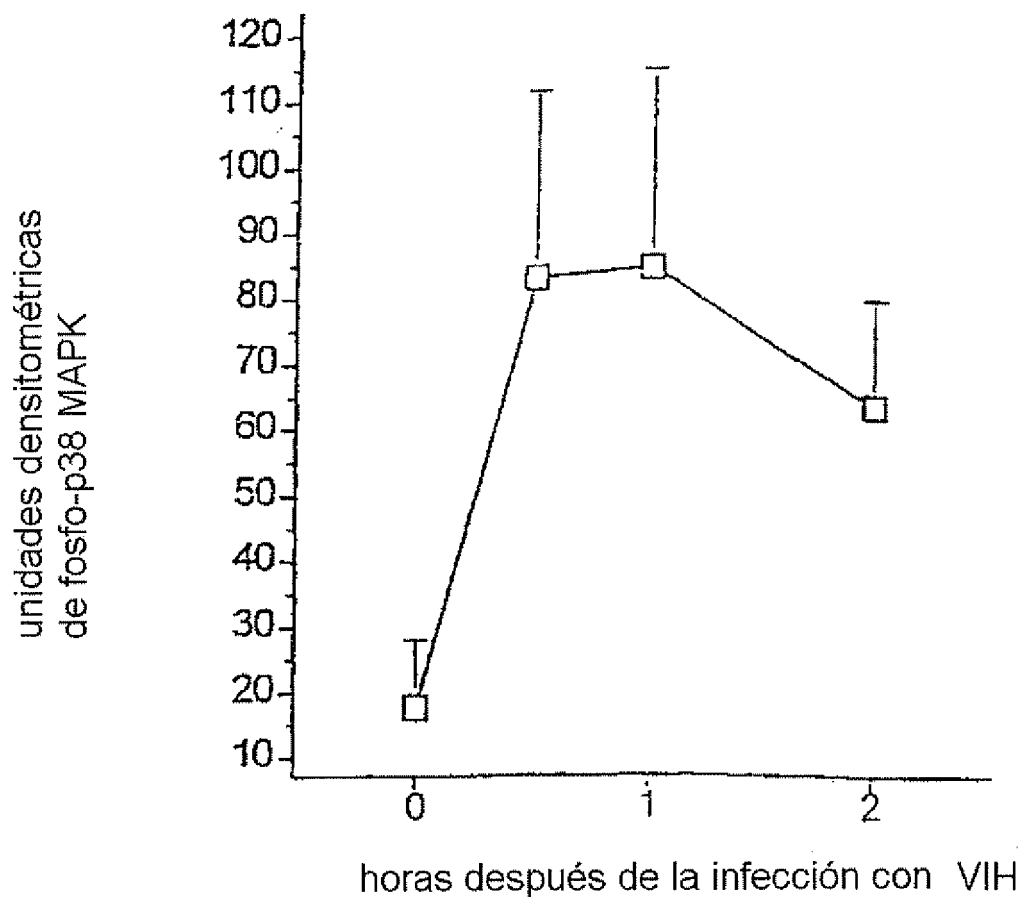


Figura 1B

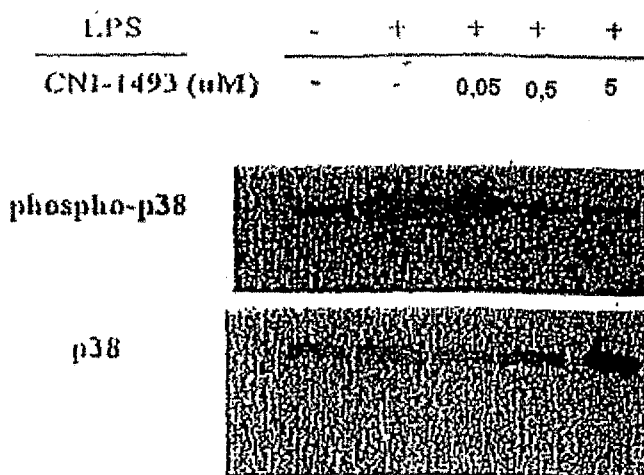


Figura 2A

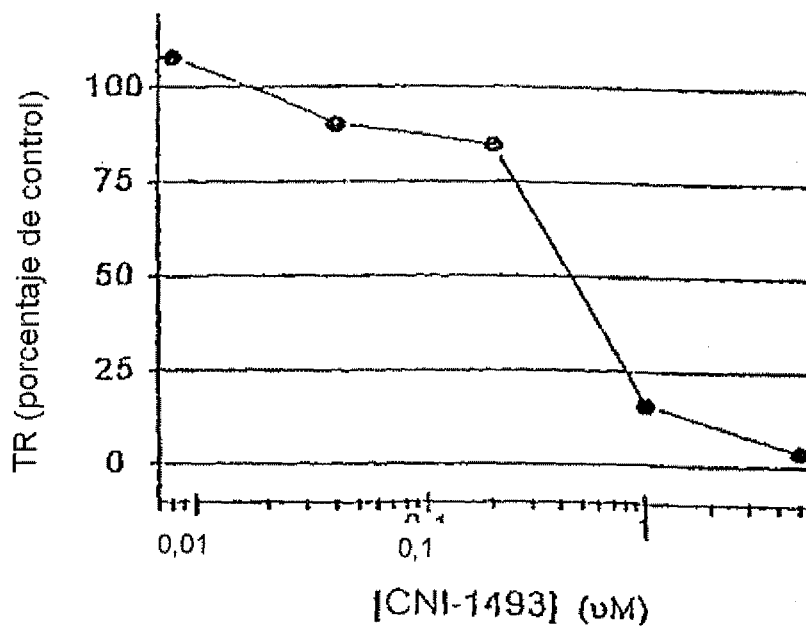


Figura 2B

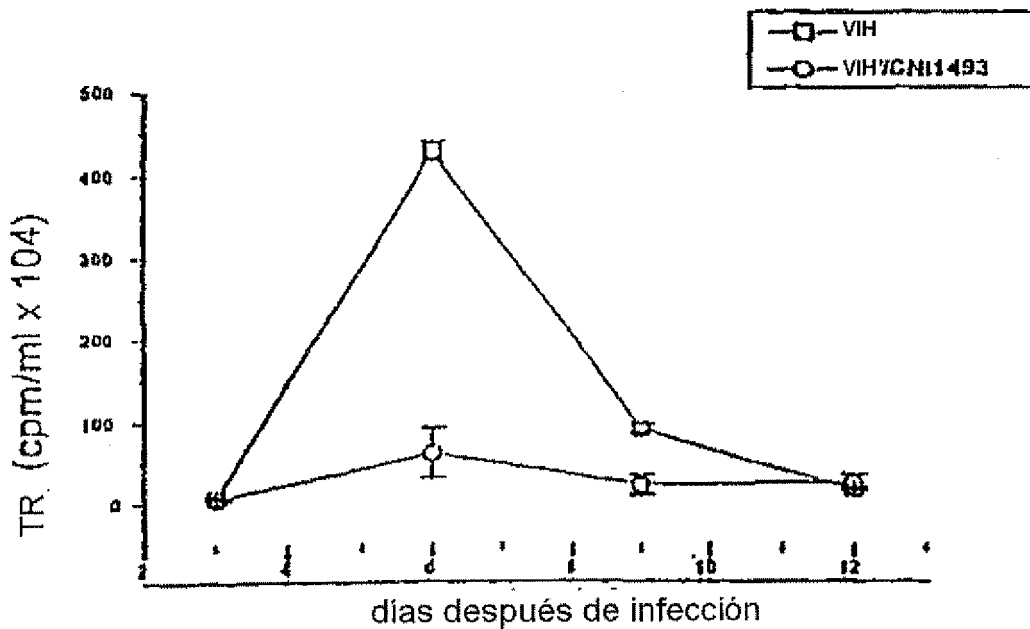


Figura 2C

CNI-1493	-	+
HIV	+	+

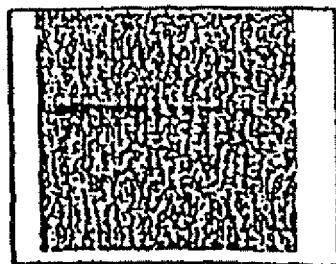


Figura 2 D

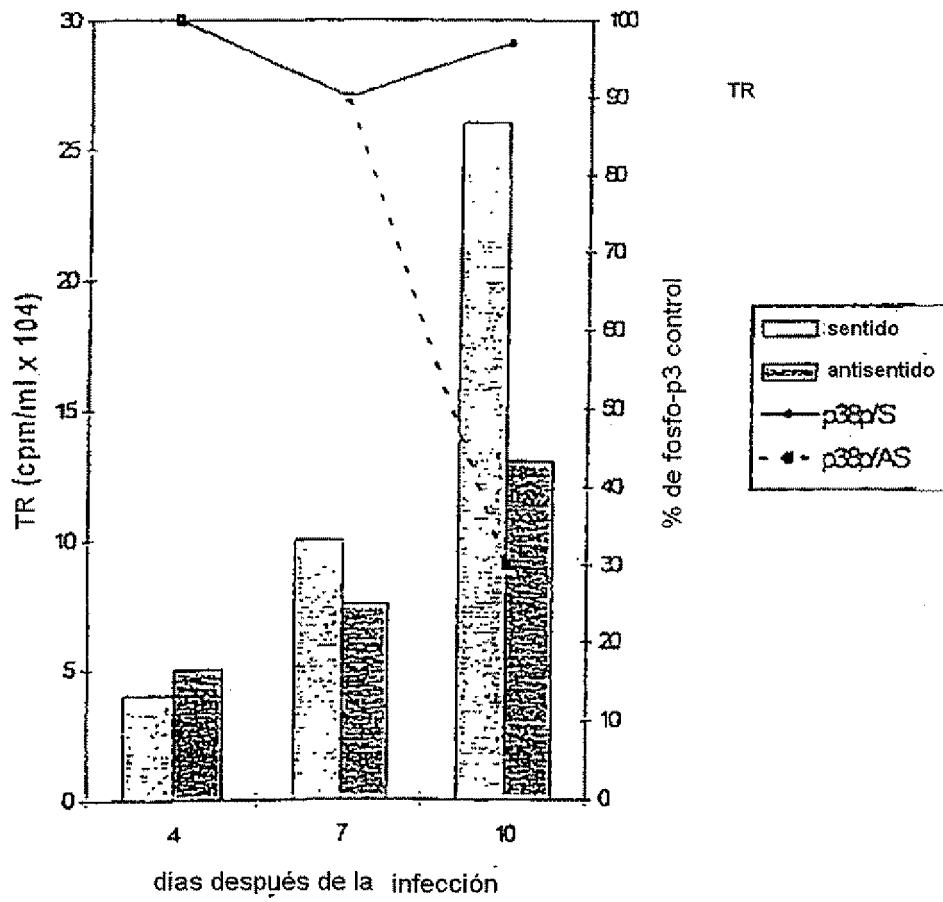


Figura 3

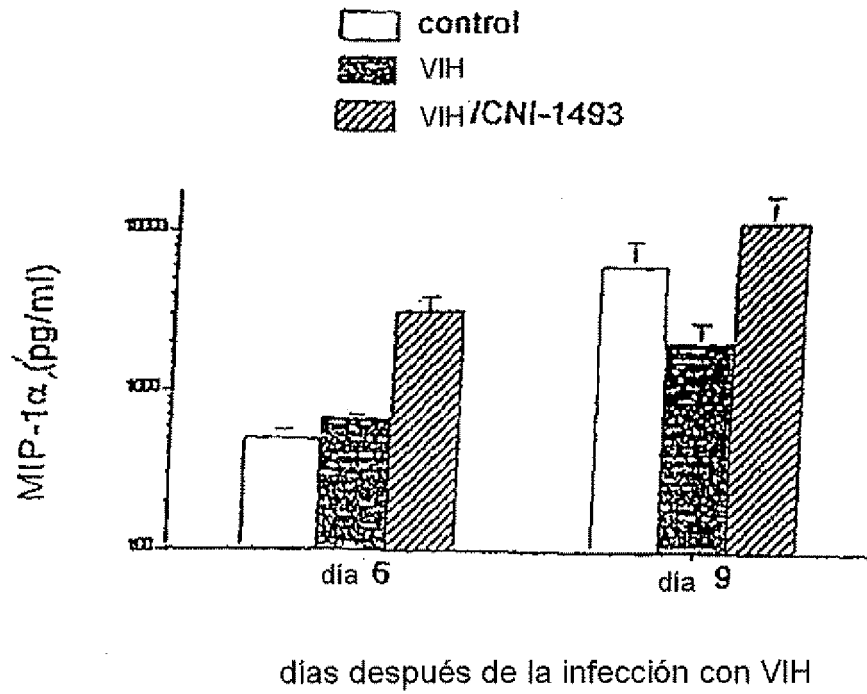


Figura 4A

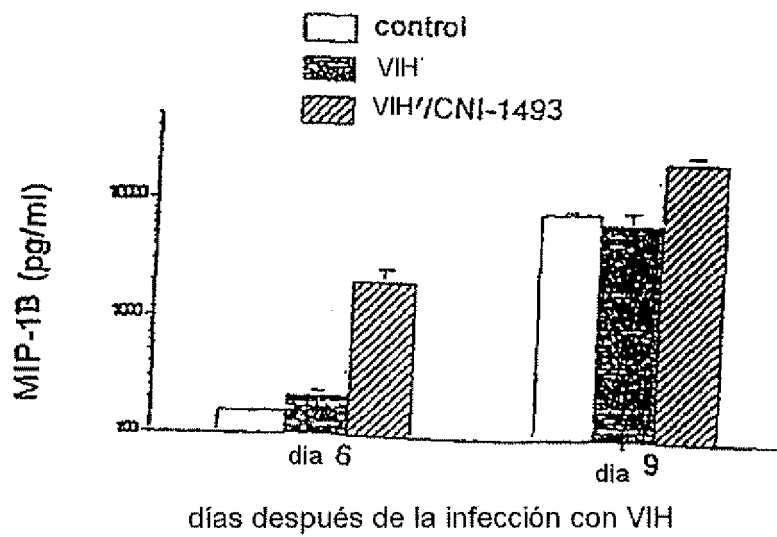


Figura 4B

# ES 2 339 306 T3

## LISTA DE SECUENCIAS

### (1) INFORMACIÓN GENERAL:

- 5 (i) SOLICITANTES: Tracey, Kevin *et al.*
- (ii) TÍTULO DE LA INVENCION: Guanilhidrazonas útiles para tratar enfermedades asociadas con la activación de las células T
- 10 (iii) NÚMERO DE SECUENCIAS: 2
- (iv) DIRECCIÓN DE CORRESPONDENCIA:
- (A) DESTINATARIO: THE PICOWER INSTITUTE FOR MEDICAL RESEARCH
  - 15 (B) CALLE: 350 Community Drive
  - (C) CIUDAD: Manhasset
  - (D) ESTADO: New York
  - (E) PAÍS: U.S.A.

20 (F) CÓDIGO POSTAL: 11030
- (v) FORMA LEGIBLE POR COMPUTADORA:
- 25 (A) TIPO DE MEDIO: Disquete
  - (B) COMPUTADORA: PC compatible
  - (C) SISTEMA OPERATIVO: Windows95
  - (D) PROGRAMA DE COMPUTACIÓN: Word
- 30 (vi) DATOS DE SOLICITUD ACTUALES:
- (A) NÚMERO DE SOLICITUD: por asignar
  - (B) FECHA DE PRESENTACIÓN:
  - 35 (C) CLASIFICACIÓN:
- (viii) INFORMACIÓN APODERADO/AGENTE:
- 40 (A) NOMBRE: Oster, Jeffrey B.
  - (B) NÚMERO DE REGISTRO: 32,585
  - (C) NÚMERO DE REFERENCIA/EXPEDIENTE: 0105
- (ix) INFORMACIÓN DE TELECOMUNICACIÓN:
- 45 (A) TELÉFONO: 516 562 9404
  - (B) TELEFAX: 516 365 7919

### (2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO:1:

- 50 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 18
  - (B) TIPO: ácido nucleico
  - 55 (C) CADENA: simple
  - (D) TOPOLOGÍA: desconocida
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: MAPKK homosenrido
- 60 (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEQ ID NO:1:  
5'-GCAGGAGCTGAACAAGAC-3'

18

### (2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO: 2:

- 65 (i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 18

## ES 2 339 306 T3

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: simple

(D) TOPOLOGÍA: desconocida

5

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: MAPKK antisentido

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEQ ID NO: 2:

10

5'-TCTTG TTCAGCTCCTGC-3'

18

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65