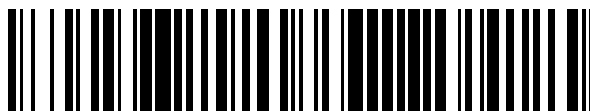


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 459 347**

51 Int. Cl.:

C07K 14/705 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

C12N 15/113 (2010.01)

C12N 15/12 (2006.01)

A61K 31/7105 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

G01N 33/566 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.12.2009 E 09765104 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.01.2014 EP 2376532**

54 Título: **Método de identificación de moduladores de la interacción entre ciertos oxisteroles y EBI2**

30 Prioridad:

09.12.2008 US 201326 P

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

09.05.2014

73 Titular/es:

NOVARTIS AG (33.3%)

Lichtstrasse 35

4056 Basel, CH;

THE SCRIPPS RESEARCH INSTITUTE (33.3%) y

IRM LLC (33.3%)

72 Inventor/es:

BAUMGARTEN, BIRGIT;

GESSIER, FRANÇOIS;

KATOPODIS, ANDREAS;

KNOCHENMUSS, RICHARD;

FALCHETTO, ROCCO;

ROGGO, SILVIO;

SAILER, ANDREAS;

SEUWEN, KLAUS;

SPANKA, CARSTEN;

ZHANG, JUAN;

HANNEDOUCHE, SÉBASTIEN;

NOËL, SOPHIE;

ROY, MARIE-ODILE;

CHEN, YU;

CHO, CHARLES Y.;

LI, WEI y

SHEN, WEIJUN

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 459 347 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

Método de identificación de moduladores de la interacción entre ciertos oxisteroles y EBI2

La presente invención se refiere a un método para la identificación de moduladores de la interacción entre colest-5-eno-3b,7a,25-triol (7a,25-dihidroxicolesterol) ("7a,25DHC") y / o colest-5-eno-3b,7a,27-triol (7a,27-dihidroxicolesterol) ("7a,27DHC") y / o colest-5-eno-3b,7b,25-triol (7b,25-dihidroxicolesterol) ("7b,25DHC") y / o colest-5-eno-3b,7b,27-triol (7b,27-dihidroxicolesterol) ("7b,27DHC") y / o colest-5-eno-3b,7a-diol (7a-hidroxicolesterol) ("7aHC") y / o colest-5-eno-3b,7b-diol (7b-hidroxicolesterol) ("7bHC"), 25-diol (25-hidroxicolesterol) ("25HC") y el receptor 2 inducido por el virus de Epstein-Barr ("EBI2"). Otros aspectos, objetivos y ventajas de la presente invención serán evidentes a partir de la descripción que se suministra a continuación.

El gen 2 del EBI2 inducido por el virus de Epstein-Barr (VEB), también llamado GPR183, codifica para un receptor que pertenece a la superfamilia de los receptores 7TM del tipo Rodopsina (siete receptores del segmento transmembrana), también conocidos como receptores acoplados a la proteína G (GPCR). EBI2, es un receptor huérfano acoplado a la proteína G para el que no se conoce ningún ligando. EBI2 fue clonado en 1993 como uno de los genes más sobreexpresados hasta (> 200 veces) en células de linfoma de Burkitt infectadas por el virus de Epstein-Barr (VEB) (Birkenbach, M., et al. (1993). Epstein-Barr virus-induced genes: first lymphocyte-specific G protein-coupled peptide receptors. *J. Virol.* 67, 2209 - 2220). El gen EBI2 se localiza en el cromosoma 13q32.3. EBI2 comparte aproximativamente 35% de homología a nivel de aminoácidos con el virus de la viruela aviar FPV206, 30-32% con los receptores P2Y5 y P2Y9. EBI2 está también estrechamente relacionado con el receptor 7TM huérfano GPR18 y los dos receptores de lípidos, los receptores 1 y 2 de cisteinil leucotrieno (CysLT1, y 2) (25% y 28% de homología, respectivamente).

La PCR en tiempo real de las células infectadas por el VEB mostraron alta expresión de EBI2 durante la replicación viral latente así como la lítica (Rosenkilde, et al. (2006) Molecular pharmacological phenotyping of EBI2 - An orphan seven-transmembrane receptor with constitutive activity. *Journal of Biological Chemistry* 281[19], 13199 - 13208). Se reportó una expresión muy alta del gen EBI2 en células mononucleares de sangre periférica (PBMC), en tejido linfóide (bazo y ganglios linfáticos) y tejido pulmonar (Birkenbach, M., et al. (1993); Rosenkilde, M. M. et al. (2006)). La expresión de EBI2 demostró ser más alta en los linfocitos B, seguido por los linfocitos T, las células NK y la más bajo en monocitos (Rosenkilde, M. M. et al. (2006), Cahir-McFarland, E. D. et al. (2004). Role of NF-kappa B in cell survival and transcription of latent membrane protein 1-expressing or Epstein-Barr virus latency III-infected cells. *J. Virol.* 78, 4108 - 4119). El perfil de expresión de EBI2 sugiere un papel en la modulación del sistema inmune. Por último, también se demostró la señalización constitutiva a través de Gai y la localización en la superficie de la célula de EBI2 (Rosenkilde, M. M. et al. (2006)).

La patente europea EP1286165 da a conocer la identificación de un receptor huérfano acoplado a la proteína G de EBI2 (y variantes del mismo) como un receptor de neuropéptidos de la familia de CRF, y el uso de tales péptidos, por ejemplo, urotensina I o sauvagina (y análogos o miméticos de cualquiera de los dos) como moduladores para EBI2. También se refiere a métodos de selección para identificar agonistas y antagonistas de este receptor neuropéptido.

Costagliola et al. (*J. Immunol* 1998 160 (3): 1458 - 1465) reporta la inmunización genética como un método eficiente de generar anticuerpos que reconocen la estructura nativa del hTSHR y una nueva forma de la inducción de tiroiditis en ratones.

Un objetivo de la presente invención es la de identificar ligandos para EBI2.

La presente invención se basa, al menos en parte, en la búsqueda de que 7,25DHC y 7,27DHC y 7HC y 25HC son ligandos para EBI2.

De acuerdo con un primer aspecto de la presente invención, se proporciona un método para identificar un modulador (por ejemplo, inhibidor) de la interacción entre el 7,25DHC y / o 7,27DHC y / o 7HC y / o 25HC (es decir, el ligando) y EBI2 (por ejemplo, EBI2 humano), preferiblemente entre 7a,25DHC y / o 7b,25DHC y / o 7a,27DHC y / o 7b,27DHC y / o 7aHC y / o 7bHC y / o 25HC y EBI2 (por ejemplo EBI2 humano), especialmente 7a,25DHC y EBI2 (por ejemplo EBI2 humano).

En otras formas de realización de este aspecto, el modulador se enlaza con 7,25DHC y / o 7,27DHC y / o 7HC y / o 25HC y / o EBI2, preferiblemente con 7a,25DHC y / o 7b,25DHC y / o 7a,27DHC y / o 7b,27DHC y / o 7aHC y / o 7bHC y / o 25HC y / o EBI2, más preferiblemente con 7a,25DHC y / o EBI2, e inhibe la interacción entre el ligando y EBI2. El inhibidor puede ser una proteína terapéutica, tal como un anticuerpo o fragmento de anticuerpo, o una entidad química de una molécula pequeña molécula.

5 En otras formas de realización de este aspecto, el modulador modula (por ejemplo inhibe) la producción endógena de 7,25DHC y / o 7,27DHC y / o 7HC y / o la producción de 25HC, preferiblemente el modulador modula (por ejemplo, inhibe) la producción endógena de 7a,25DHC y / o 7b,25DHC y / o 7a,27DHC y / o 7b,27DHC y / o 7aHC y / o 7bHC y / o 25HC, por ejemplo, mediante la inhibición de la producción endógena mediada enzimáticamente de 7,25DHC y / o 7,27DHC y / o 7HC y / o la producción de 25HC, preferentemente el modulador inhibe la producción endógena mediada enzimáticamente de 7a,25DHC y / o 7b,25DHC y / o 7a,27DHC y / o 7b,27DHC y / o 7aHC y / o 7bHC y / o 25HC. El modulador puede inhibir la enzima responsable de la conversión del precursor inmediato de 7,25DHC y / o 7,27DHC y / o 7HC y / o 25HC, preferiblemente de precursores del precursor inmediato de 7a,25DHC y / o 7b,25DHC a 7a,25DHC y / o 7b,25DHC, respectivamente.

10 En algunas otras formas de realización de este aspecto, el modulador se selecciona del grupo que consiste en: una entidad química pequeña, anticuerpo, Adnectina, Anquirina, Maxybody/Avimer, Affibody, Anticalina, Afilina, oligonucleótido antisentido, ARN corto de interferencia (ARNci). El modulador puede ser un anticuerpo o fragmento de anticuerpo. Cuando el modulador es un anticuerpo, puede comprender la región constante humana y / o puede tener un isotipo de IgG (por ejemplo, IgG1 o IgG4) y / o puede ser un anticuerpo quimérico, humano o humanizado.

15 Cuando el modulador es un fragmento de anticuerpo, el fragmento de anticuerpo se selecciona del grupo que consiste en: Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, ScFv, el dominio VH, el dominio VHH.

20 En otras formas de realización adicionales de este aspecto, el modulador es un inhibidor de la expresión de EBI2. Tales inhibidores pueden ser un oligonucleótido antisentido que comprende o que consiste esencialmente en una secuencia (a) capaz de formar un tríplex estable con una porción del gen del EBI2, o (b) capaz de formar un dúplex estable con una porción de un transcrito de ARNm del gen del EBI2 en condiciones fisiológicas. Alternativamente, o además, el inhibidor puede ser una molécula de oligonucleótido antisentido o un ARN corto de interferencia (ARNci) que inhibe la expresión de la proteína del EBI2 (por ejemplo, es capaz de interferir con la traducción del transcrito del EBI2).

25 El modulador identificado en el método de la invención puede ser usado en una composición farmacéutica que comprende un modulador del primer aspecto más arriba junto con un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable.

La composición farmacéutica puede comprender instrucciones de uso.

30 El modulador identificado en el método de la invención puede ser usado en un método de tratamiento de un paciente mamífero, particularmente un paciente humano afectado con una enfermedad o trastorno sensible a la modulación de la interacción entre 7,25DHC y / o 7,27DHC y / o 7HC y / o 25HC y EBI2, preferiblemente entre 7a,25DHC y / o 7b,25DHC y / o 7a,27DHC y / o 7b,27DHC y / o 7aHC y / o 7bHC y / o 25HC y EBI2, en donde el método comprende administrar una cantidad terapéuticamente efectiva del aspecto farmacéutico del segundo aspecto más arriba.

35 El modulador identificado en el método de la invención puede ser usado en un método profiláctico para el tratamiento de un paciente mamífero, particularmente un paciente humano afectado con una enfermedad o trastorno sensible a la modulación de la interacción entre 7,25DHC y / o 7,27DHC y / o 7HC y / o 25HC y EBI2, preferiblemente entre 7a,25DHC y / o 7b,25DHC y / o 7a,27DHC y / o 7b,27DHC y / o 7aHC y / o 7bHC y / o 25HC y EBI2, en donde el método comprende administrar una cantidad terapéuticamente efectiva del aspecto farmacéutico del segundo aspecto supra.

40 La enfermedad o los trastornos se seleccionan del grupo que consiste en: hipertensión, angina de pecho, aterosclerosis, insuficiencia cardíaca congestiva, accidente cerebrovascular, obesidad, síndrome metabólico, enfermedades autoinmunes tales como artritis, (especialmente artritis reumatoide) y lupus, afecciones atópicas tales como asma y dermatitis atópica, EPOC, hipertensión pulmonar, infecciones virales tales como EBV, VIH, hepatitis (A o C), enfermedad del hígado graso, cirrosis hepática (particularmente cirrosis hepática inducida por alcohol), cáncer, dislipidemia, diabetes (especialmente de tipo II), rechazo de trasplante, síndrome de intestino irritable, enfermedad inflamatoria del intestino, enfermedades de inflamación crónica, alergia, psoriasis, fibrosis quística, hipercolesterolemia, enfermedad renal, esclerosis múltiple.

45 En la presente invención se describen un proceso para la fabricación de un modulador identificado en un método de la invención y una composición farmacéutica que comprende dicho modulador.

50 La invención, proporciona por lo tanto un método de identificación de un modulador, en particular un inhibidor de la interacción entre 7,25DHC y / o 7HC y / o 25HC y EBI2, preferiblemente entre 7a,25DHC y / o 7,27DHC y / o 7b,25DHC y / o 7a,27DHC y / o 7b,27DHC y / o 7aHC y / o 7bHC y / o 25HC y EBI2 en donde el método comprende poner en contacto 7,25DHC y / o 7HC y / o EBI2, preferiblemente entre 7a,25DHC y / o 7b,25DHC y / o 7a,27DHC y / o 7b,27DHC y / o 7aHC y / o 7bHC y / o 25HC y EBI2, con un modulador candidato y observar una modulación de la interacción entre el ligando y el receptor.

- A lo largo de esta memoria descriptiva, los términos "7,25DHC", "7,27DHC", "25HC" y "7HC" incluyen todos los enantiómeros, estereoisómeros, mezclas de racematos y formas isómeras ópticamente puras de los mismos. Por lo tanto a lo largo de toda esta memoria descriptiva, las realizaciones de la invención que mencionan "7,25DHC" y / o "7,27DHC" y / o "7HC" y / o "25HC" se deben interpretar como una referencia a realizaciones individuales de una mezcla de racematos del ligando indicado, así como a formas de realización individuales de formas isómeras ópticamente puras del ligando indicado. Los términos "7a,25DHC" y "7a,27DHC" a lo largo de esta memoria descriptiva indican únicamente las formas isómeras ópticamente puras o sustancialmente ópticamente puras. Por lo tanto, los términos "7a,25DHC" y "7a,27DHC" se deben interpretar como una referencia a realizaciones individuales de formas isómeras ópticamente puras de los ligandos indicados. Del mismo modo, los términos "7b,25DHC", "7b,27DHC", "7aHC", "7bHC" y "25HC" también se deben interpretar como una referencia a realizaciones individuales de formas isómeras ópticamente puras de los ligandos indicados. Las proteínas terapéuticas, polinucleótidos y oligonucleótidos, como se describe en la presente memoria están en forma aislada. La referencia en la sección 4 de esta memoria a "EBI2" se refiere a EBI2 humano a menos que se especifique lo contrario. Del mismo modo, la referencia a enfermedades o trastornos se refiere a enfermedades o trastornos humanos.
- 15 Una proteína terapéutica identificada en el método de la presente invención puede ser un anticuerpo, Adnectina, Anquirina, Maxybody / Avimer y Affiboy, anticalina o Afilina.

Anticuerpos

- Los anticuerpos identificados en el método de la presente invención pueden estar en cualquiera entre una cantidad de formatos bien conocidos por la persona capacitada en la técnica. Estos formatos incluyen anticuerpos intactos, diversos fragmentos de anticuerpos y otros formatos modificados por ingeniería genética como se describe a continuación. En formas preferidas, los anticuerpos de la presente invención se suministran como una población monoclonal.

Anticuerpos intactos

- Los anticuerpos intactos incluyen glicoproteínas heteromultiméricas que comprenden al menos dos cadenas pesadas y dos cadenas livianas. Aparte de IgM, los anticuerpos intactos son generalmente glicoproteínas heterotetraméricas de aproximadamente 150 KDa, compuestas por dos cadenas livianas (L) idénticas y dos cadenas pesadas (H) idénticas. Típicamente, cada cadena liviana está unida a una cadena pesada por un enlace disulfuro covalente, mientras que el número de enlaces disulfuro entre las cadenas pesadas de diferentes isotipos de inmunoglobulina varía. Cada cadena pesada y liviana tienen también puentes disulfuro. Cada cadena pesada tiene en un extremo un dominio variable (VH) seguido por una cantidad de regiones constantes. Cada cadena liviana tiene un dominio variable (VL) y una región constante en su otro extremo; la región constante de la cadena liviana está alineada con la primera región constante de la cadena pesada y el dominio variable de la cadena liviana está alineado con el dominio variable de la cadena pesada. Las cadenas livianas de los anticuerpos de la mayoría de las especies de vertebrados pueden asignarse a uno de dos tipos denominados kappa o lambda con base en la secuencia de aminoácidos de la región constante. Dependiendo de la secuencia de aminoácidos de la región constante de sus cadenas pesadas, los anticuerpos humanos pueden asignarse a cinco clases diferentes, IgA, IgD, IgE, IgG e IgM. IgG e IgA pueden subdividirse además en subclases, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4; e IgA1 e IgA2. Existen variantes de especies teniendo el ratón y la rata por lo menos IgG2a, IgG2b. El dominio variable del anticuerpo confiere especificidad de enlazamiento al anticuerpo con ciertas regiones que muestran una variabilidad particular llamadas regiones determinantes de complementariedad (CDR). Las porciones más conservadas de la región variable se denominan regiones marco (FR). Los dominios variables de las cadenas intactas pesada y liviana comprenden cada uno cuatro FR conectadas por tres CDR. Las CDR en cada cadena se mantienen juntas en estrecha proximidad por medio de las regiones FR y con las CDR de otra cadena contribuyen a la formación del sitio de enlazamiento del antígeno de los anticuerpos. Las regiones constantes no están implicadas directamente en el enlazamiento del anticuerpo con el antígeno, pero presentan diversas funciones efectoras tales como la participación en la citotoxicidad mediada por células dependientes del anticuerpo (ADCC), la fagocitosis a través del enlazamiento con el receptor Fcγ, la relación vida media / eliminación a través del receptor Fc neonatal (FcRn) y la citotoxicidad dependiente del complemento a través del componente C1q de la cascada del complemento.

- Por lo tanto, en un aspecto, se contempla un anticuerpo terapéutico intacto capaz de enlazar a 7,25DHC y / o 7,27DHC y / o 7HC y / o 25HC y / o EBI2 y de inhibir la interacción entre 7,25DHC y / o 7,27DHC y / o 7HC y / o 25HC y EBI2. El anticuerpo terapéutico intacto puede enlazar 7a,25DHC y / o 7b,25DHC y / o 7a,27DHC y / o 7b,27DHC y / o 7aHC y / o 7bHC y / o 25HC y / o EBI2 e inhibe la interacción entre 7a,25DHC y / o 7b,25DHC y / o 7a,27DHC y / o 7b,27DHC y / o 7aHC y / o 7bHC y / o 25HC y EBI2. Tales anticuerpos tienen típicamente una región constante humana de un isotipo de IgG tal como IgG1 o IgG4 y puede ser humano, humanizado o quimérico.

- 55 Anticuerpos humanos

Los anticuerpos humanos pueden ser producidos por medio de una cantidad de métodos conocidos por aquellos

capacitados en la técnica. Los anticuerpos humanos se pueden elaborar por medio del método del hibridoma usando mieloma humano o líneas de células de heteromioma de ratón-humano. Véase Kozbor J. *Immunol* 133, 3001, (1984) y Brodeur, *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, páginas 51 - 63 (Marcel Dekker Inc., 1987). Los métodos alternativos incluyen el uso de bibliotecas de fagos o ratones transgénicos ambos de los cuales utilizan repertorios de la región V humana (véase Winter G, (1994), *Annu. Rev. Immunol.* 12, 433 - 455, Green LL (1999), *J. Immunol. Methods* 231, 11 - 23).

Varias cepas de ratones transgénicos están ahora disponibles en las que sus loci de inmunoglobulina de ratón han sido reemplazados con segmentos de genes de inmunoglobulina humana (véase Tomizuka K, (2000) *PNAS* 97, 722 - 727; Fishwild DM (1996) *Nature Biotechnol.* 14, 845 - 851. Méndez MJ, 1997, *Nature Genetics*, 15, 146 - 156). Después de la exposición al antígeno dichos ratones son capaces de producir un repertorio de anticuerpos humanos a partir de los cuales se pueden seleccionar los anticuerpos de interés. De particular interés es el sistema Trimer^{MR} (véase Eren R et al., (1988) *Immunology* 93: 154 - 161) donde se trasplantan linfocitos humanos en ratones irradiados, el Sistema de Anticuerpos de Linfocitos Seleccionados (SLAM, véase Babcook et al, *PNAS* (1996) 93: 7843 - 7848) donde linfocitos humanos (o de otras especies) se someten efectivamente a un procedimiento de generación de anticuerpos *in vitro* reunidos en forma masiva seguido por un procedimiento de dilución y selección limitante y de desconvolución y el Xenomouse^{MR} (Abgenix Inc.). Un enfoque alternativo está disponible a través de Morphotek Inc. utilizando la tecnología Morphodoma^{MR}.

La tecnología de despliegue en fagos se puede utilizar para producir anticuerpos humanos (y fragmentos de los mismos), véase McCafferty, *Nature*, 348, 552 - 553 (1990) y Griffiths AD et al (1994) *EMBO* 13: 3245 - 3260. De acuerdo con esta técnica se clonan en el marco los genes del dominio V del anticuerpo ya sea en una capa mayor o menor del gen de la proteína de un bacteriófago filamentosos tal como M13 o fd y se despliegan (por lo general con la ayuda de un fago auxiliar) en función de fragmentos de anticuerpo sobre la superficie de la partícula del fago. Las selecciones basadas en las propiedades funcionales del anticuerpo dan como resultado la selección del gen que codifica el anticuerpo que exhibe estas propiedades. La técnica de despliegue en fagos puede utilizarse para seleccionar anticuerpos específicos de antígeno a partir de bibliotecas elaboradas a partir de células B humanas tomadas de individuos que padecen una enfermedad o trastorno descrito anteriormente o, alternativamente, a partir de donantes humanos no inmunizados (véase Marks, *J Mol Bio* 222, 581 - 591, 1991). Cuando se desea un anticuerpo humano intacto que contenga un dominio Fc, es necesario clonar nuevamente el fragmento derivado desplegado en fago en vectores de expresión de mamífero que contienen las regiones constantes deseadas y estableciendo líneas celulares de expresión estable.

La técnica de maduración por afinidad (Marks, *Bio/Technol* 10, 779 - 783 (1992)) se puede utilizar para proporcionar afinidad de enlazamiento en donde la afinidad del anticuerpo humano primario se mejora reemplazando en forma secuencial las regiones V de la cadena L y H con variantes de origen natural y selección con base en afinidades de enlazamiento mejoradas. También se encuentran disponibles ahora variantes de esta técnica tales como "impresión del epítipo", véase la publicación internacional WO 93/06213. Véase también Waterhouse; *Nucl Acids Res.* 21, 2265 - 2266 (1993).

En consecuencia, en un aspecto, se contempla un anticuerpo terapéutico intacto (humano) capaz de enlazar 7,25DHC y/o 7,27DHC y/o 7HC y/o 25HC y/o EBI2 y de inhibir la interacción entre 7,25DHC y/o 7,27DHC y/o 7HC y/o 25HC y EBI2. En un aspecto preferido, el anticuerpo terapéutico humano intacto enlaza 7a,25DHC y/o 7b,25DHC y/o 7a,27DHC y/o 7b,27DHC y/o 7aHC y/o 7bHC y/o 25HC y/o EBI2 e inhibe la interacción entre 7a,25DHC y/o 7b,25DHC y/o 7a,27DHC y/o 7b,27DHC y/o 7aHC y/o 7bHC y/o 25HC y EBI2. En realizaciones típicas, el anticuerpo humano terapéutico intacto comprende una región constante de un isotipo de IgG, por ejemplo, IgG1 o IgG4.

Anticuerpos quimérico y humanizados

El uso de anticuerpos no humanos intactos en el tratamiento de enfermedades o trastornos humanos lleva consigo el potencial para los problemas ahora bien establecidos de inmunogenicidad, es decir el sistema inmune del paciente puede reconocer el anticuerpo intacto no humano como no propio y montar una respuesta neutralizante. Esto es particularmente evidente tras la administración múltiple del anticuerpo no humano a un paciente humano. Diversas técnicas se han desarrollado durante los años para superar estos problemas y generalmente implican la reducción de la composición de secuencias de aminoácidos no humanos en el anticuerpo intacto mientras se conserva la relativa facilidad en la obtención de anticuerpos no humanos a partir de un animal inmunizado, por ejemplo, un ratón, una rata o un conejo. En términos generales se han utilizado dos enfoques para lograr esto. La primera son anticuerpos quiméricos, que generalmente comprenden un dominio variable no humano (por ejemplo, de roedor tal como un ratón) fusionado a una región constante humana. Debido a que el sitio de enlazamiento del antígeno de un anticuerpo se localiza dentro de las regiones variables, el anticuerpo quimérico mantiene su afinidad de enlazamiento por el antígeno, pero adquiere las funciones efectoras de la región constante humana y, por tanto, es capaz de realizar funciones efectoras tales como se ha descrito anteriormente. Los anticuerpos quiméricos producen típicamente usando métodos de ADN recombinante. El ADN que codifica los anticuerpos (por ejemplo,

ADNc) se aísla y se secuencia utilizando procedimientos convencionales (por ejemplo, mediante el uso de sondas de oligonucleótidos que son capaces de enlazarse específicamente con genes que codifican las cadenas H y L del anticuerpo, por ejemplo, ADN que codifica las SEQ ID NOs: 1, 2, 3, 4, 5 y 6 descritas más arriba). Las células de hibridoma sirven como fuente típica de este ADN. Una vez aislado, se coloca el ADN en vectores de expresión que luego son transfectados en células huésped tales como *E. coli*, células COS, células CHO o células de mieloma que de otro modo no producen proteína inmunoglobulina para obtener la síntesis del anticuerpo. El ADN puede ser modificado mediante la sustitución de la secuencia de codificación para las cadenas L y H humanas para las regiones constantes H y L no humanas (por ejemplo, de murino) correspondientes, véase, por ejemplo Morrison, PNAS 81, 6851 (1984).

El segundo enfoque implica la generación de anticuerpos humanizados en el que el contenido no humano del anticuerpo se reduce por la humanización de las regiones variables. Dos técnicas de humanización han ganado popularidad. La primera es la humanización mediante injerto de CDR. Las CDR construyen bucles cerca del terminal N del anticuerpo, donde forman una superficie montada en un andamiaje proporcionado por la región marco. La especificidad de enlazamiento al antígeno del anticuerpo se define principalmente por la topografía y por las características químicas de su superficie de CDR. Estas características a su vez son determinadas por la conformación de las CDR individuales, por la disposición relativa de las CDR, y por la naturaleza y disposición de las cadenas laterales de los residuos que comprenden las CDR. Se puede lograr una gran disminución de la inmunogenicidad mediante el injerto solamente de las CDR de anticuerpos no humanos (por ejemplo, de murinos) (anticuerpos "donantes") sobre el marco humano ("marco aceptor") y regiones constantes (véase Jones et al (1986) Nature 321, 522 - 525 y Verhoeven M et al (1988) Science 239, 1534 - 1536). Sin embargo, el injerto de CDR por sí mismo puede no resultar en la retención completa de las propiedades de enlazamiento al antígeno y se encuentra frecuentemente que algunos residuos del marco (a veces denominados 'retromutaciones') del anticuerpo donante deben ser preservadas en el compuesto humanizado si se debe recuperar una afinidad de enlazamiento significativa con el antígeno (véase Queen C et al (1989) PNAS 86, 10.029 - 10.033, Co, M et al (1991) Nature 351, 501 - 502). En este caso, las regiones V humanas que muestran la mayor homología de secuencia con el anticuerpo donante no humano se escogen a partir de una base de datos con el fin de proporcionar el marco humano (FR). La selección de los FR humanos se puede hacer ya sea a partir de anticuerpos de consenso humanos o anticuerpos humanos individuales. Cuando se sustituyen residuos clave necesarios del anticuerpo donante en el marco aceptor humano para conservar las conformaciones de la CDR. Se puede utilizar modelación por ordenador del anticuerpo para ayudar a identificar este tipo de residuos estructuralmente importantes, véase la publicación internacional WO99/48523.

Alternativamente, se puede lograr la humanización mediante un proceso de 'recubrimiento'. Un análisis estadístico de regiones variables de la cadena ligera y pesada única de la inmunoglobulina murina y humana reveló que los patrones precisos de residuos expuestos son diferentes en anticuerpos humanos y de murino, y la mayoría de las posiciones individuales de la superficie tienen una fuerte preferencia por un pequeño número de residuos diferentes (véase Padlan EA, et al, (1991) Mol Immunol 28, 489 - 498 y Pedersen JT et al (1994) J Mol Biol. 235: 959 - 973). Por lo tanto, es posible reducir la inmunogenicidad de un Fv no humano reemplazando residuos expuestos en sus regiones marco que difieren de las que normalmente se encuentran en los anticuerpos humanos. Debido a que la antigenicidad de la proteína puede correlacionarse con la accesibilidad a la superficie, el reemplazo de los residuos en la superficie puede ser suficiente para volver la región variable de ratón 'invisible' al sistema inmune humano (véase también Mark GE et al (1994) en Handbook of Experimental Pharmacology Vol. 113: The pharmacology of monoclonal antibodies, Springer-Verlag, páginas 105 - 134). Este procedimiento de humanización se denomina como "recubrimiento", porque sólo la superficie del anticuerpo se altera, los residuos de soporte permanecen inalterados.

De este modo, en un aspecto, se contempla un anticuerpo humanizado terapéutico intacto capaz de enlazar 7,25DHC y / o 7,27DHC y / o 7HC y / o 25HC y / o EBI2 y la inhibición de la interacción entre 7,25DHC y / o 7,27DHC y / o 7HC y / o 25HC y EBI2. En un aspecto preferido, el anticuerpo humanizado terapéutico intacto enlaza 7a,25DHC y / o 7b,25DHC y / o 7a,27DHC y / o 7b,27DHC y / o 7aHC y / o 7bHC y / o 25HC y / o EBI2 e inhibe la interacción entre 7a,25DHC y / o 7b,25DHC y / o 7a,27DHC y / o 7b,27DHC y / o 7aHC y / o 7bHC y / o 25HC y EBI2. En forma típica, el anticuerpo humano terapéutico intacto comprende una región constante de un isotipo IgG, por ejemplo, IgG1 o IgG4.

Anticuerpos biespecíficos

Un anticuerpo biespecífico es un anticuerpo que tiene especificidades de enlazamiento por al menos dos epítopos diferentes. Los métodos de elaboración de tales anticuerpos son conocidos en la técnica. Tradicionalmente, la producción recombinante de anticuerpos biespecíficos se basa en la coexpresión de dos pares de cadena H - cadena L de inmunoglobulina, en donde las dos cadenas H tienen diferentes especificidades de enlazamiento, (véase Millstein et al, Nature 305, 537 - 539 (1983), la publicación internacional WO 93 / 08829 y Trauncker et al, EMBO, 10, 1991, 3655 - 3659). Debido a la variedad aleatoria de cadenas H y L, se produce una mezcla potencial de diez estructuras diferentes de anticuerpo de las cuales sólo una tiene la especificidad de enlazamiento deseada.

Un enfoque alternativo implica la fusión de los dominios variables con las especificidades de enlazamiento deseadas a la región constante de cadena pesada que comprende al menos parte de la región bisagra, las regiones CH2 y CH3. Se prefiere tener la región CH1 que contiene el sitio necesario para el enlazamiento de cadena ligera presente en al menos una de las fusiones. El ADN que codifica estas fusiones y, si se desea, la cadena L se insertan en vectores de expresión separados y son los contranfectados en un organismo huésped adecuado. Es posible, sin embargo insertar las secuencias de codificación para dos o las tres cadenas en un vector de expresión. En un enfoque preferido, el anticuerpo biespecífico se compone de una cadena H con una primera especificidad de enlazamiento en un brazo y un par de cadena H-L, proporcionando una segunda especificidad de enlazamiento en el otro brazo, véase la publicación internacional WO94/04690. Véase también Suresh et al, *Methods in Enzymology* 121, 210, 1986.

En un aspecto, se contempla un anticuerpo terapéutico biespecífico en el que al menos una especificidad de enlazamiento de dicho anticuerpo es para 7₂₅DHC o 7₂₇DHC o 7HC o 25HC y la segunda especificidad es para EBI2. En aspectos preferidos, el anticuerpo terapéutico biespecífico tiene al menos una especificidad de enlazamiento para 7a₂₅DHC y / o 7b₂₅DHC y / o 7a₂₇DHC y / o 7b₂₇DHC y / o 7aHC y / o 7bHC y / o 25HC y la segunda especificidad para EBI2 e inhibe la interacción entre 7a₂₅DHC y / o 7b₂₅DHC y / o 7a₂₇DHC y / o 7b₂₇DHC y / o 7aHC y / o 7bHC y / o 25HC y EBI2. En formas preferidas, el anticuerpo biespecífico comprende un anticuerpo de primate, por ejemplo, un anticuerpo humano de un isotipo de IgG (por ejemplo, el isotipo IgG1 o IgG4).

Fragmentos de anticuerpo

En ciertos aspectos, se contemplan fragmentos de anticuerpo terapéuticos que modulan (por ejemplo, inhiben) la interacción entre 7₂₅DHC y / o 7₂₇DHC y / o 7HC y EBI2. Tales fragmentos pueden ser fragmentos de enlazamiento funcionales de antígeno de anticuerpos quiméricos intactos y / o humanizados tales como Fab, Fab', F(ab₁)₂, Fv, fragmentos ScFv de los anticuerpos descritos anteriormente.

Tradicionalmente, tales fragmentos se producen por la digestión proteolítica de anticuerpos intactos mediante digestión por ejemplo, con papaína (véase por ejemplo la publicación internacional WO 94/29348) pero pueden producirse directamente a partir de células huésped transformadas de manera recombinante. Para la producción de ScFv, véase Bird et al; (1988), *Science*, 242, 423 - 426. Además, los fragmentos de anticuerpos se pueden producir usando una variedad de técnicas de ingeniería genética como se describe a continuación.

Fragmentos Fv parecen tener menor energía de interacción de sus dos cadenas que los fragmentos Fab. Para estabilizar la asociación de los dominios VH y VL, han sido enlazados con péptidos (Bird et al, (1988), *Science*, 242, 423 - 426, Huston et al, *PNAS*, 85, 5879 - 5883), puentes disulfuro (Glockshuber et al, (1990) *Biochemistry*, 29, 1362 - 1367) y mutaciones 'botón en ojal' (Zhu et al (1997), *Protein Sci.*, 6, 781 - 788). Los fragmentos ScFv pueden ser producidos por métodos bien conocidos por aquellos capacitados en la técnica (véase Whitlow et al (1991), *Methods companion Methods Enzymol*, 2, 97 - 105 y Huston et al (1993) *Int. Rev. Immunol* 10, 195 - 217. Los ScFv pueden ser producidos en células bacterianas tales como *E. coli* pero se producen más preferiblemente en células eucariotas. Una desventaja de ScFv es la monovalencia del producto, que imposibilita un aumento de la avidéz debido al enlazamiento polivalente, y su corta vida media. Los intentos para superar estos problemas incluyen (ScFv)₂ bivalente producido a partir de ScFv que contiene una cisteína adicional en el terminal C por medio de acoplamiento químico (Adams et al., (1993) *Can Res* 53, 4026 - 4034 y McCartney et al., (1995) *Protein Eng.*, 8, 301 - 314) o por medio de dimerización espontánea específica del sitio de ScFv que contiene un residuo de cisteína desapareado en el terminal C (véase Kipriyanov et al., (1995) *Cel. Biophys* 26, 187 - 204). Alternativamente, ScFv puede ser forzado para formar multímeros por medio del acortamiento del lazador peptídico hasta 3 y 12 residuos para formar "diacuerpos" (véase Holliger et al., *PNAS* (1993), 90, 6444 - 6448). La reducción del enlazador puede resultar incluso además en trímeros de ScFv ('triacuerpos', véase Kortt et al., (1997) *Protein Eng.*, 10, 423 - 433) y tetrámeros ('tetracuerpos', véase Le Gall et al., (1999) *FEBS Lett*, 453, 164 - 168). La construcción de compuestos bivalentes ScFv puede ser lograr también por medio de fusión genética con motivos de dimerización de proteína para formar "minianticuerpos" (véase Pack et al., (1992) *Biochemistry* 31, 1579 - 1584) y "minicuerpos" (véase Hu et al., (1996), *cancer Res.*, 56, 3055 - 3061). También se pueden producir tandems de ScFv-ScFv ((ScFC)₂) por medio de enlazamiento de dos unidades de ScFv por medio de un tercer enlazador de péptido, (véase Kurucz et al., (1995) *J Immunol*, 154, 4576 - 4582). Los diacuerpos biespecíficos se pueden producir a través de la asociación no covalente de dos productos de fusión de una sola cadena que consisten de un dominio VH de un anticuerpo conectado por medio de un enlazador corto al dominio VL de otro anticuerpo, (véase Kipriyanov et al., (1998), *Int. J. Can.* 77, 763 - 772). La estabilidad de tales diacuerpos biespecíficos se puede mejorar por medio de la introducción de puentes disulfuro o mutaciones 'Botón en ojal' como se describe más arriba o por medio de la formación de diacuerpos de una sola cadena (ScDb) en donde dos fragmentos ScFv híbridos se conectan a través de un enlazador peptídico (véase Kontermann et al., (1999) *J. Immunol Methods* 226, 179 - 188). Los compuestos biespecíficos tetravalente se encuentran disponibles por ejemplo por medio de la fusión un fragmento ScFv con el dominio CH3 de un compuesto IgG o con un fragmento Fab a través de la región bisagra (véase Coloma et al., (1997) *Nature Biotechnol*, 15, 159 - 163). Alternativamente, los compuestos biespecíficos tetravalentes han sido creados por medio de la fusión de diacuerpos biespecíficos de una sola cadena (véase Alt et al., (1999) *FEBS Lett*

454, 90 - 94). También se pueden formar compuestos biespecíficos tetravalentes más pequeños por medio de la dimerización ya sea por tándems ScFv-ScFv con un enlazador que contiene un motivo de hélice-bucle-hélice (minianticuerpos DiBi, véase Muller et al., (1998) FEBS Lett 432, 45 - 49) o un compuesto de una sola cadena que comprende cuatro dominios variables de anticuerpos (VH y VL) en una orientación que evita el apareamiento intramolecular (diacuerpo en tándem, véase Kipriyanov et al., (1999) J. Mol. Biol. 293, 41 - 56). Los fragmentos biespecíficos $F(ab')_2$ pueden ser creados por acoplamiento químico de fragmentos Fab' o por medio de heterodimerización a través de cremalleras de leucina (véase Shalaby et al., (1992) J. Exp. Med. 175, 217 - 225 y Kostelny et al., (1992), J Immunol 148 1547 - 1553). También están disponibles dominios VH y VL aislados (Domantis plc), véanse las patentes de los Estados Unidos Nos., 6,248,516; 6,291,158; 6,172,197 y los anticuerpos aislados de dominio VHH (nanocuerpos). Estos dominios y los nanocuerpos pueden ser doblemente específicos que tiene una especificidad dirigida a una proteína que extiende la vida media, tal como albúmina de suero humano (HSA). Tal dominio y los nanocuerpos tanto monoespecíficos para una proteína NRG1 como específicos duales adicionales para una proteína que extiende la vida media, tal como HSA son específicamente contemplados aquí.

En un aspecto, se contempla un fragmento terapéutico de anticuerpo (por ejemplo, ScFv, Fab, Fab', $F(ab')_2$) o un fragmento de anticuerpo modificado por ingeniería genética como se describe más arriba que se enlaza con 7,25DHC y / o 7,27DHC y / o 7HC y / o 25HC y / o EBI2 e inhibe la interacción entre el ligando y el receptor. En aspectos preferidos, el fragmento de anticuerpo terapéutico o el fragmento de anticuerpo modificado por ingeniería genética enlaza 7a,25DHC y / o 7b,25DHC y / o 7a,27DHC y / o 7b,27DHC y / o 7aHC y / o 7bHC y / o 25HC y / o EBI2 e inhibe la interacción entre 7a,25DHC y / o 7b,25DHC y / o 7a,27DHC y / o 7b,27DHC y / o 7aHC y / o 7bHC y / o 25HC y EBI2.

Anticuerpos heteroconjugados

También se contemplan aquí los anticuerpos heteroconjugados. Los anticuerpos heteroconjugados están compuestos de dos anticuerpos unidos en forma covalente formados usando cualquier método de entrecruzamiento conveniente. Véase, por ejemplo, a patente de los Estados Unidos No. 4.676.980.

25 Otras modificaciones

La interacción entre la región Fc de un anticuerpo y diversos receptores Fc (FcγR) se cree que media las funciones efectoras del anticuerpo, que incluyen citotoxicidad celular dependiente del anticuerpo (ADCC), fijación de complemento, fagocitosis, y vida media / eliminación del anticuerpo. Se pueden llevar a cabo diferentes modificaciones a la región Fc dependiendo de la propiedad deseada. Por ejemplo, mutaciones específicas en la región Fc para volver un anticuerpo lítico, en uno no lítico, se detalla en el documento EP 0 629 240B1 y EP 0 307 434B2 o e puede incorporar un epítipo de enlazamiento del receptor salvaje en el anticuerpo para incrementar la vida media en suero, véase La patente de los Estados Unidos No. 5.739.277. Existen cinco fracciones humanas actualmente reconocidas Fcγ, FcγR (I), FCγRIIb, FcγRIIIa y FcRn neonatal. Shields et al., (2001) J. Biol. Chem. 276, 6591 - 6604 demostraron que un grupo común de residuos de IgG1 está involucrado en el enlazamiento de todas las FcγR, mientras que FCγRII y FcγRIII utilizan distintos sitios fuera de este grupo común. Un grupo de residuos de IgG1 redujo el enlazamiento con todas las FcγR cuando se alteró con alanina: Pro-238, Asp-265, Asp-270, Asn-297 y Pro-239. Todos están en el dominio CH2 de IgG y agrupados cerca de la bisagra que une CH1 y CH2. Mientras que FcγRI utiliza únicamente el grupo común de residuos de IgG1 para enlazamiento, FcγRII y FcγRIII (por ejemplo, Glu-293). Algunas variantes mostraron un enlazamiento mejorado con FcγRII o FcγRIII pero no afectaron el enlazamiento con el otro receptor (por ejemplo, Ser-267Ala mejoró el enlazamiento con FcγRII pero o se afectó el enlazamiento con FcγRIII). Otras variantes exhibieron mejor enlazamiento con FCγRII o FcγRIII con reducción en el enlazamiento con el otro receptor (por ejemplo, Ser298Ala mejoró el enlazamiento con FcγRIII y redujo el enlazamiento con FcγRII). Para FcγRIIIa, el mejor enlazamiento de variantes de IgG1 tenía sustituciones combinadas de alanina en Ser-298, Glu-333 y Ls-334. El receptor FcRn neonatal se cree que esta involucrado tanto en la eliminación del anticuerpos como la transcitosis a través de los tejidos (véase Junghans RP (1997) Immunol Res. 16, 2957 y Ghetie et al., (2000) Annu Rev Immunol 18, 739 - 766). Los residuos de IgG1 humano determinaron interactuar directamente con FcRn humana incluida Ile253, Ser254, Lys288, Thr307, Gln311, Asn434 y His435. El cambio en cualquiera de estas posiciones descritas en esta sección pueden permitir mejores propiedades efectoras de vida media y / o alteradas en suero de los anticuerpos contemplados aquí.

Otras modificaciones incluyen variantes de glicosilación de los anticuerpos contemplados aquí. La glicosilación de anticuerpos en posiciones conservadas en sus regiones constantes se sabe que tiene un efecto profundo sobre la función del anticuerpo, particularmente el efector que actúa tal como aquellos descritos anteriormente, véase, por ejemplo, Boyd et al., (1996), Mol Immunol 32, 1311 - 1318. Se contemplan variantes de glicosilación de los anticuerpos terapéuticos o fragmentos de enlazamiento de antígeno de los mismos en donde se añaden, sustituyen, suprimen o modifican una o más fracciones de carbohidrato. La introducción de un motivo de asparagina-X-serina o asparagina-X-treonina crea un lado potencial para unión enzimática de fracciones de carbohidrato y puede por lo tanto ser usado para manipular la glicosilación de un anticuerpo. En Raju et al., (2001) Biochemistry 40, 8868 - 8876 el terminal de sialización de una inmunoadhesina TNFR-IgG se incrementó a través de un proceso de

regalactosilación y / o resialización usando beta-1,4-galactosiltransferasa y / o alfa-2,3-Sialiltransferasa. El incremento en la sialización terminal se cree que aumentar la vida media de la inmunoglobulina. Los anticuerpos, en común con la mayoría de las glicoproteínas, se producen típicamente como una mezcla de glicofomas. Esta mezcla es particularmente evidente cuando los anticuerpos se producen en células eucariotas, particularmente en células de mamífero. Se han desarrollado una variedad de métodos para la fabricación de glicofomas definidas, véase Zhang et al., Science (2004), 303, 371; Sears et al., Science (2001), 291, 2344; Wacker et al., (2002), Science 298, 1790; Davis et al., (2002), Chem. Rev. 102, 579; Hang et al., (2001), Acc Chem. Res. 34, 727. Por lo tanto se contemplan aquí una pluralidad de anticuerpos terapéuticos (monoclonales) (que pueden ser del isotipo IgG, por ejemplo IgG1) que comprenden una cantidad definida de glicofoma(s) (por ejemplo, 7 o menos, por ejemplo 5 o menos, tal como dos o una sola) o dichos anticuerpos o fragmentos de enlazamiento de antígeno de los mismos.

Otros aspectos incluyen anticuerpos terapéuticos o fragmentos de enlazamiento de antígeno de los mismos acoplados a un polímero no proteínico tal como polietilén glicol (PEG), polipropilén glicol o polioxialquileno. La conjugación de proteínas con PEG es una técnica establecida para aumentar la vida media de las proteínas, así como para reducir la antigenicidad y la inmunogenicidad de las proteínas. El uso de PEGilación con diferentes pesos moleculares y estilos (lineales o ramificados) ha sido investigado con anticuerpos intactos así como fragmentos Fab' (véase Koumenis IL et al., (2000) Int J Pharmaceut 198: 83 - 95.

Adnectinas - Compuestos terapéuticos

Los andamios de adnectina se basan en el dominio tipo III de fibronectina (por ejemplo, el décimo módulo de la fibronectina tipo III (dominio 10 Fn3). El dominio tipo III de fibronectina tiene 7 u 8 cadenas beta que se distribuyen entre dos láminas beta, que se empacan entre ellas para formar el núcleo de la proteína, y que contienen además bucles (análogos a las CDR) que conectan las cadenas beta entre sí y se exponen al solvente. Existen al menos tres de tales bucles en cada borde del sándwich de lámina beta, en donde el borde es el límite de la proteína perpendicular a la dirección de las cadenas beta (la patente de los Estados Unidos No. 6.818.418).

Estos andamios a base de fibronectina no son una inmunoglobulina, aunque el plegamiento completo está muy relacionado con aquel del fragmento de anticuerpo funcional más pequeño, la región variable de la cadena pesada, que comprende la unidad completa de reconocimiento del antígeno en IgG de camello y de llama. Debido a esta estructura, el anticuerpo que no es de inmunoglobulina imita las propiedades de enlazamiento del antígeno que son similares en naturaleza y afinidad con aquellas de los anticuerpos. Estos andamios pueden ser usados en una estrategia de aleatorización y arrastre del bucle *in vitro* que es similar al proceso de maduración por afinidad de los anticuerpos *in vivo*. Estos compuestos a base de fibronectina pueden ser usados como andamios donde las regiones del bucle del compuesto pueden ser reemplazadas con las CDR usando técnicas estándar de clonación. Por lo tanto, en algunos aspectos se proporciona un compuesto adnectina que se enlaza con 7,25DHC y / o 7,27DHC y / o 7HC y / o 25HC y / o EBI2 e inhibe la interacción entre el ligando y el receptor. En particular, el compuesto de adnectina se enlaza con 7a,25DHC y / o 7b,25DHC y / o 7a,27DHC y / o 7b,27DHC y / o 7aHC y / o 7bHC y / o 25HC y / o EBI2 e inhibe la interacción entre el ligando y el receptor.

Anquirina - Socios Moleculares

Esta tecnología se basa en el uso de proteínas con módulos repetidos derivados de anquirina como andamios para soportar regiones variables que pueden ser usadas para enlazamiento con objetivos diferentes. El módulo repetido de anquirina es un polipéptido de 33 aminoácidos que consiste de dos hélices α y un giro β antiparalelo. El enlazamiento de las regiones variables se optimiza principalmente mediante el uso de un despliegue de ribosomas. Por lo tanto, en algunos aspectos, se proporciona un compuesto Anquirina que se enlaza con 7,25DHC y / o 7,27DHC y / o 7HC y / o 25HC y / o EBI2 e inhibe la interacción entre el ligando y el receptor. En particular, el compuesto de adnectina se enlaza con 7a,25DHC y / o 7b,25DHC y / o 7a,27DHC y / o 7b,27DHC y / o 7aHC y / o 7bHC y / o 25HC y / o EBI2 e inhibe la interacción entre el ligando y el receptor.

Maxybodyes / Avímeros - Avidia

Los avímeros se derivan de una proteína natural que contiene el dominio A tal como LRP-1. Estos dominios son utilizados por la naturaleza para las interacciones proteína-proteína y en los humano más de 250 proteínas se basan estructuralmente en los dominios A. Los avímeros consisten de una cantidad de monómeros diferentes "dominio A" (2 - 10) lazados a través de enlazadores de aminoácidos. Los avímeros pueden ser creados de tal manera que se puedan enlazar con el antígeno objetivo utilizando la metodología descrita, por ejemplo, en las solicitudes de patentes de los Estados Unidos Nos. 20040175756; 20050053973; 20050048512 y 20060008844. Por lo tanto, en algunos aspectos se proporciona un compuesto Maxybody que se enlaza con 7,25DHC y / o 7,27DHC y / o 7HC y / o 25HC y / o EBI2 e inhibe la interacción entre el ligando y el receptor. En particular, el compuesto Maxybody se enlaza con 7a,25DHC y / o 7b,25DHC y / o 7a,27DHC y / o 7b,27DHC y / o 7aHC y / o 7bHC y / o 25HC y / o EBI2 e inhibe la interacción entre el ligando y el receptor.

Proteína A - Affibody

Los ligandos de afinidad Affibody® son proteínas simples pequeñas, compuestas de un haz de tres hélice con base en el andamio de uno de los dominios de enlazamiento de IgG de la Proteína A. La Proteína A es una proteína de superficie de la bacteria *Staphylococcus aureus*. Este dominio de andamio consiste en 58 aminoácidos, 13 de los cuales se asignaron al azar para generar bibliotecas de Affibody® con una gran cantidad de variantes de ligando (Véase, por ejemplo, la patente de los Estados Unidos No. 5.831.012). Los compuesto Affibody® imitan anticuerpos, tienen un peso molecular de 6 kDa, comparado con el peso molecular de los anticuerpos, que es de 150 kDa. A pesar de su pequeño tamaño, el sitio de enlazamiento de los compuestos Affibody® es similar a aquel de un anticuerpo. Por lo tanto, en algunos aspectos se proporciona un compuesto Proteína A - Affibody que se enlaza con 7,25DHC y / o 7,27DHC y / o 7HC y / o 25HC y / o EBI2 e inhibe la interacción entre el ligando y el receptor. En particular, el compuesto Proteína A - Affibody se enlaza con 7a,25DHC y / o 7b,25DHC y / o 7a,27DHC y / o 7b,27DHC y / o 7aHC y / o 7bHC y / o 25HC y / o EBI2 y inhibe la interacción entre el ligando y el receptor.

Anticalinas - Pieris

Las Anticalinas® son productos desarrollados por la empresa Pieris ProteoLab AG. Se derivan de lipocalinas, un amplio grupo de proteínas pequeñas y robustas que por lo general están involucrados en el transporte fisiológico o almacenamiento de compuestos químicamente sensibles o insolubles. Varios lipocalinas naturales se presentan en tejidos humanos o líquidos corporales.

La arquitectura de la proteína es una reminiscencia de las inmunoglobulinas, con bucles hipervariables en la parte superior de un marco rígido. Sin embargo, en contraste con los anticuerpos o sus fragmentos recombinantes, las lipocalinas se componen de una sola cadena de polipéptido con 160 a 180 residuos aminoácidos, siendo sólo marginalmente mayor que un único dominio de inmunoglobulina.

Un grupo de cuatro bucles, que constituye el paquete de enlazamiento, muestra una plasticidad estructural pronunciada y tolera una variedad de cadenas laterales. El sitio de enlazamiento puede ser por lo tanto reconfigurado en un proceso patentado con el fin de reconocer los compuestos objetivo prescritos de diferente forma con alta afinidad y especificidad.

Una proteína de la familia de la lipocalina, la proteína de enlazamiento de la bilina (BBP) de *Pieris brassicae* a sido utilizada para desarrollar Anticalinas por medio de la mutación del grupo de los cuatro bucles. Un ejemplo de una solicitud de patente que describe "Anticalinas" es la PCT WO 199916873.

Por lo tanto, en algunos aspectos se proporciona un compuesto Anticalina que se enlaza con 7,25DHC y / o 7,27DHC y / o 7HC y / o 25HC y / o EBI2 e inhibe la interacción entre el ligando y el receptor. En particular, el compuesto de Anticalina se enlaza con 7a,25DHC y / o 7b,25DHC y / o 7a,27DHC y / o 7b,27DHC y / o 7aHC y / o 7bHC y / o 25HC y / o EBI2 e inhibe la interacción entre el ligando y el receptor.

Affilina - Proteínas Scil

Los compuestos de Affilina^{MR} son pequeñas proteínas no inmunoglobulinas que se diseñan para afinidades específicas hacia proteínas y compuestos pequeños. Los nuevos compuestos de AFFILINA^{MR} pueden ser muy rápidamente seleccionados de dos bibliotecas, cada una de las cuales se basa en una proteína diferente de andamio derivada humana. Los compuestos de Affilina no muestran ninguna homología estructural con las proteínas de la inmunoglobulina. Las Proteínas Scil emplea dos andamios de Affilina^{MR}, uno de los cuales es una proteína cristalina gamma del lente del ojo humano y la otra es una proteína de la superfamilia de la "ubiquitina". Ambos andamios humanos son muy pequeñas, muestran estabilidad a alta temperatura y son casi resistente a cambios de pH y a agentes desnaturizantes. Esta alta estabilidad es principalmente debida a la estructura expandida de lámina beta de las proteínas. Los ejemplos de proteínas cristalinas gamma derivadas se describen en la publicación internacional WO200104144 y los ejemplos de proteínas del tipo "ubiquitina" se describen en la publicación internacional WO2004106368. Por lo tanto, en algunos aspectos, se proporciona un compuesto de Affilina que se enlaza con 7,25DHC y / o 7,27DHC y / o 7HC y / o 25HC y / o EBI2 e inhibe la interacción entre el ligando y el receptor. En particular, el compuesto de Affilina se enlaza con 7a,25DHC y / o 7b,25DHC y / o 7a,27DHC y / o 7b,27DHC y / o 7aHC y / o 7bHC y / o 25HC y / o EBI2 e inhibe la interacción entre el ligando y el receptor.

Otras modalidades terapéuticas

Como se observó anteriormente, otras modalidades terapéuticas incluyen moduladores (particularmente inhibidores) de EBI2 que ejercen su efecto sobre su objetivo antes de la expresión de la proteína. Los ejemplos incluyen oligonucleótidos antisentido que comprenden (o consisten esencialmente de) una secuencia (a) capaz de formar un tríplex estable con una porción del gen del EBI2 (particularmente NRG1β1), o (b) capaz de formar un dúplex estable

con una porción de un transcrito de ARNm del gen del EBI2 bajo condiciones fisiológicas. Otros ejemplos incluyen moléculas que pueden participar en el fenómeno de "interferencia del ARN". La interferencia de ARN (ARNi) es particularmente útil para inhibir específicamente la producción de una proteína particular. Aunque sin desear estar limitado por la teoría, Waterhouse et al., (1998) han proporcionado un modelo para el mecanismo por medio del cual ARNbc (ARN dúplex) puede ser usado para reducir la producción de proteínas. Convenientemente, el ARNbc puede ser producido a partir de un único promotor en un vector recombinante o célula huésped, en donde las secuencias sentido y anti-sentido están flanqueadas por una secuencia no relacionada que permite que las secuencias sentido y antisentido hibriden para formar la molécula de ARNbc con la secuencia no relacionada que forma una estructura de bucle. El diseño y la producción de moléculas de ARNbc adecuadas para la presente invención está dentro de la capacidad de una persona capacitada en el arte, particularmente considerando a Waterhouse et al., (1998), Smith et al., (2000), las publicaciones internacionales WO 99/32619, WO 99/53050, WO 99/49029, y WO 01/34815.

En un ejemplo, se introduce un ADN que dirige la síntesis de al menos un producto(s) de ARN parcialmente bicatenario(s) con homología por el gen objetivo que va a ser inactivado.

Por consiguiente, el ADN comprende tanto secuencias sentido como antisentido que, cuando se transcriben en ARN, pueden hibridarse para formar la región de ARN bicatenario. En particular, las secuencias sentido y antisentido están separadas por una región espaciadora que comprende un intrón que, cuando se transcribe en ARN, se empalma fuera. Esta disposición se ha demostrado que resulta en una mayor eficiencia del silenciamiento génico. La región bicatenaria puede comprender una o dos moléculas de ARN, transcritas ya sea a partir de una o dos regiones de ADN. Se piensa que la presencia de la molécula bicatenaria desencadena una respuesta de un sistema endógeno de mamífero que destruye tanto el ARN bicatenario como también la transcripción homóloga de ARN del gen objetivo de mamífero, reduciendo o eliminando de manera eficiente la actividad del gen objetivo.

La longitud de las secuencias sentido y antisentido que se hibridan debe ser cada una al menos de 19 nucleótidos contiguos, preferiblemente al menos 30 o 50 nucleótidos, y más preferiblemente al menos 100, 200, 500 o 1000 nucleótidos. Se puede utilizar la secuencia de longitud completa correspondiente a la transcripción completa del gen. Las longitudes son más preferiblemente de 100 - 2000 nucleótidos. El grado de identidad de las secuencias sentido y antisentido con la transcripción específica debe ser de al menos 85%, preferiblemente al menos 90% y más preferiblemente del 95 - 100%. La molécula de ARN puede comprender por supuesto secuencias no relacionadas que pueden funcionar para estabilizar la molécula. La molécula de ARN puede ser expresada bajo el control de una ARN polimerasa II o un promotor HI de ARN polimerasa. Ejemplos de este último incluyen promotores de ARNt o ARNnp.

Las moléculas preferidas de ARN pequeño de interferencia ("ARNpi") comprenden una secuencia de nucleótidos que es idéntica a aproximadamente 19 - 21 nucleótidos contiguos del ARNm objetivo.

Preferiblemente, la secuencia de ARNpi comienza con el dinucleótido AA, comprende un contenido de GC de alrededor de 30 - 70% (preferiblemente, 30 - 60%, más preferiblemente 40 - 60% y más preferiblemente de aproximadamente 45% - 55%), y no tiene un alto porcentaje de identidad con ninguna secuencia de nucleótidos distinta de la objetivo en el genoma del mamífero en el cual se va a introducir, por ejemplo como se determina por medio de la búsqueda BLAST estándar.

La regulación de microARN es una rama claramente especializada de la ruta de silenciamiento del ARN que evolucionó hacia la regulación génica, apartándose del ARNi / PTGS convencional.

Los microARN son una clase específica de ARN pequeños que están codificados en elementos como genes organizados en una repetición invertida característica. Cuando se transcriben, los genes de microARN dan lugar a los ARN precursores con tallo en forma de bucle a partir de los que se procesan posteriormente los microARN. Los microARN son típicamente de aproximadamente 21 nucleótidos de longitud. Los microARN liberados se incorporan en los complejos tipo RISC que contienen un subconjunto particular de proteínas Argonauta que ejercen una represión génica específica de la secuencia (véase, por ejemplo, Millar y Waterhouse, 2005; Pasquinelli et al. 2005; Almeida y Allshire, 2005).

Métodos de producción

Se pueden producir proteínas terapéuticas, y particularmente anticuerpos como una población policlonal, pero se producen más preferiblemente como una población monoclonal (es decir, como una población sustancialmente homogénea de anticuerpos idénticos dirigidos contra un sitio de enlazamiento antigénico específico). Desde luego será evidente para aquellos capacitados en la técnica que una población implica más de una entidad de anticuerpo. Los anticuerpos se pueden producir en organismos transgénicos tales como cabras (véase Pollock et al (1999), J. Immunol. Methods 231: 147 - 157), pollos (véase Morrow KJJ (2000) Genet. Eng. News 20: 1 - 55, ratones (véase Pollock et al) o plantas (véase Doran PM, (2000) Curr. Opinion Biotechnol. 11, 199 - 204, Ma JK-C (1998), Nat. Med. 4: 601 - 606, Baez J et al, BioPharm (2000) 13: 50 - 54, Stoger E et al, (2000) Plant Mol. Biol. 42: 583 - 590). Los

anticuerpos también se pueden producir mediante síntesis química. Sin embargo, los anticuerpos y otras proteínas terapéuticas son típicamente producidos usando tecnología de cultivo de células recombinantes bien conocida por aquellos capacitados en la técnica. Se aísla un polinucleótido que codifica el anticuerpo y se inserta en un vector replicable tal como un plásmido para su posterior clonación (amplificación) o expresión. Un sistema de expresión útil es un sistema de glutamato sintetasa (tal como el vendido por Lonza Biologics), particularmente cuando la célula huésped es CHO o NSO (véase más abajo). El polinucleótido que codifica el anticuerpo se aísla fácilmente y se secuencia utilizando procedimientos convencionales (por ejemplo, sondas de oligonucleótido). Los vectores que se pueden usar incluyen plásmido, virus, fago, transposones, minicromosomas de los cuales los plásmidos son una forma de realización típica. Generalmente, tales vectores incluyen además una secuencia señal, origen de replicación, uno o más genes marcadores, un elemento potenciador, un promotor y secuencias de terminación de la transcripción operativamente enlazadas al polinucleótido de cadena pesada y / o ligera con el fin de facilitar la expresión. El polinucleótido que codifica las cadenas ligera y pesada puede ser insertado en vectores separados y transfectado en la misma célula huésped o, si se desea, tanto la cadena pesada como la cadena ligera puede ser insertadas en el mismo vector para transfección en la célula huésped. De este modo, de acuerdo con un aspecto de la presente invención, se proporciona un proceso para la construcción de un vector que codifica las cadenas ligera y / o pesada de un anticuerpo terapéutico o fragmento de enlazamiento de antígeno del mismo, cuyo método comprende la inserción en un vector, un polinucleótido que codifica ya sea una cadena ligera y / o una cadena pesada de un anticuerpo terapéutico.

Secuencias de señal

Los anticuerpos pueden ser producidos como una proteína de fusión con una secuencia de señal heteróloga que tiene un sitio de escisión específico en el terminal N de la proteína madura. La secuencia de señal debe ser reconocida y procesada por la célula huésped. Para las células huésped procariotas, la secuencia de señal puede ser una fosfatasa alcalina, penicilinas, o guías de enterotoxina II estable al calor. Para la secreción de levadura las secuencias de señal pueden ser una guía de invertasa de levadura, guía del factor [alfa] o guías de fosfatasa ácida, véase por ejemplo, la publicación internacional WO 90/13646. En los sistemas de células de mamíferos, están disponibles las guías secretoras virales tales como la señal gD del herpes simple y una secuencia de señal de inmunoglobulina nativa. Típicamente, la secuencia de señal se enlaza en el marco de lectura al ADN que codifica el anticuerpo.

Origen de replicación

El origen de las repeticiones es bien conocido en la técnica con pBR322 adecuado para la mayoría de las bacterias Gram negativas, un plásmido de 2 µm para la mayoría de levaduras y diversos orígenes virales tales como SV40, polioma, adenovirus, VSV o BPV para la mayoría de las células de mamíferos. Generalmente no se necesita el origen del componente de replicación para vectores de expresión de mamífero, pero se puede usar la de SV40, ya que contiene el promotor temprano.

Marcador de selección

Los genes de selección típicos codifican proteínas que (a) confieren resistencia a antibióticos u otras toxinas, por ejemplo, ampicilina, neomicina, metotrexato o tetraciclina o (b) complementan las deficiencias auxotróficas o suministran nutrientes no disponibles en el medio del complejo. El esquema de selección puede implicar detener el crecimiento de la célula huésped. Las células, que han sido transformadas con éxito con los genes que codifican el anticuerpo terapéutico, sobreviven debido a, por ejemplo, resistencia a los fármacos conferida por el marcador de selección. Otro ejemplo es el denominado marcador de selección de DHFR en el que los transformantes se cultivan en presencia de metotrexato. En aspectos típicos, las células se cultivan en presencia de cantidades crecientes de metotrexato para amplificar el número de copias del gen exógeno de interés. Las células CHO son una línea celular particularmente útil para la selección de DHFR. Un ejemplo adicional es el sistema de expresión de glutamato sintetasa (Lonza Biologies). Un gen de selección adecuado para su uso en levaduras es el gen *trp1*, véase Stinchcomb et al., Nature 282, 38, 1979.

Promotores

Los promotores adecuados para la expresión de anticuerpos se enlazan operativamente al ADN / polinucleótido que codifica el anticuerpo. Los promotores para huéspedes procariotas incluyen al promotor *phoA*, beta-lactamasa y los sistemas del promotor de lactosa, fosfatasa alcalina, triptófano y promotores híbridos tales como Tac. Los promotores adecuados para expresión en células de levadura incluyen 3-fosfoglicerato quinasa u otras enzimas glicolíticas, por ejemplo, enolasa, gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa, hexoquinasa, piruvato descarboxilasa, fosfofructoquinasa, glucosa 6 fosfato isomerasa, 3-fosfoglicerato mutasa y glucoquinasa. Los promotores de levadura inducibles incluyen alcohol deshidrogenasa 2, isocitocromo C, fosfatasa ácida, metalotioneína y enzimas responsables del metabolismo de nitrógeno o de la utilización de maltosa / galactosa.

Los promotores para la expresión en sistemas celulares de mamífero incluyen promotores virales tales como de polioma, de la viruela aviar y adenovirus (por ejemplo, adenovirus 2), virus del papiloma bovino, virus del sarcoma aviar, citomegalovirus (en particular el promotor del gen temprano inmediato), retrovirus, virus de la hepatitis B, actina, promotor del virus del sarcoma de Rous (RSV) y virus del simio 40 temprano o tardío. Por supuesto, la
5 elección del promotor se basa en la compatibilidad adecuada con la célula huésped usada para la expresión.

Elemento reforzador

Cuando sea apropiado, por ejemplo, para la expresión en eucariotas superiores, se puede usar un elemento reforzador operativamente enlazado al elemento promotor en un vector. Las secuencias reforzadoras adecuadas de mamífero incluyen elementos reforzadores de globina, elastasa, albúmina, fetoproteína e insulina. Alternativamente,
10 se puede usar un elemento reforzador de un virus de célula eucariota tal como un reforzador de SV40 (en el pb 100-270), el reforzador del promotor temprano de citomegalovirus, el reforzador de polioma, el reforzador de baculovirus o locus IgG2a de murino (véase la publicación internacional WO 04/009823). El reforzador se encuentra preferiblemente en el vector en un sitio más arriba hacia el promotor.

Células huésped

15 Las células huésped adecuadas para clonación o expresión de vectores que codifican anticuerpos son células procariotas, de levadura o eucariotas superiores. Las células procariotas adecuadas incluyen eubacterias, por ejemplo, enterobacterias tales como *Escherichia*, por ejemplo *E. coli* (por ejemplo ATCC 31446; 31537; 27325), *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella* *Proteus*, *Salmonella* por ejemplo, *Salmonella typhimurium*, *Serratia*, por ejemplo *Serratia marcescans* y *Shigella*, así como *Bacilli* tales como *B. subtilis* y *B. licheniformis* (véase DD 266 710),
20 *Pseudomonas* tales como *P. aeruginosa* y *Streptomyces*. De las células huésped de levadura, se contemplan también *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Kluyveromyces* (por ejemplo, ATCC 16045; 12424; 24178; 56500), *Yarrowia* (EP402226), *Pichia pastoris* (EP183070, véase también Peng et al., *J. Biotechnol.* 108 (2004) 185 - 192), *Candida*, *Thchoderma reesia* (EP244234) *Penicilina*, *Tolypocladium* y huéspedes de *Aspergillus* tales como *A. nidulans* y *A. niger*.

25 Aunque se contemplan específicamente aquí células huésped procariotas y de levadura, preferentemente sin embargo, las células huésped son células eucariotas superiores. Las células huésped eucariotas superiores adecuadas incluyen células de mamífero tales como COS-1 (ATCC No. CRL 1650), COS-7 (ATCC CRL 1651), línea de células de riñón embrionario humano 293, células de riñón de cría de hámster (BHK) (ATCC CRL 1632), BHK570 (ATCC No. CRL 10314), 293 (ATCC No. CRL 1573), células de ovario de hámster chino CHO (por ejemplo, CHO-K1, ATCC No. CCL 61, línea de células DHFR-CHO tal como DG44 (véase Urlaub et al., (1986) *Somatic Cell Mol. Genet.* 12, 555 - 556)), particularmente aquellas líneas de células CHO adaptadas para cultivo en suspensión, células Sertoli de ratón, células de riñón de mono, células de riñón de mono verde africano (ATCC CRL-1587), células HELA, células de riñón de canino (ATCC CCL 34), células de pulmón humano (ATCC CCL 75), células Hep G2 y de mieloma o de linfoma, por ejemplo, NSO (véase a patente de los Estados Unidos No. 5.807.715), Sp2 / 0, YO. Por lo tanto, en un aspecto se proporciona una célula huésped transformada en forma estable que comprende un vector que codifica una cadena pesada y / o un cadena ligera del anticuerpo terapéutico o fragmento de enlazamiento del antígeno del mismo como se describe aquí. Preferiblemente, tales células huésped comprenden un primer vector que codifica la cadena ligera y un segundo vector que codifica dicha cadena pesada.
30
35

Fermentación bacteriana

40 Se pueden usar sistemas bacterianos para la expresión de proteínas terapéuticas que no son inmunoglobulina descritas anteriormente. Los sistemas bacterianos son también particularmente adecuados para la expresión de fragmentos de anticuerpo. Tales fragmentos se localizan en forma intracelular o dentro del periplasma. Las proteínas periplásmicas insolubles se pueden extraer y volver a plegar para formar proteínas activas de acuerdo con métodos conocidos por aquellos capacitados en la técnica, véase Sánchez et al., (1999) *J. Biotechnol.* 72, 13 - 20 y Cu pit PM et al., (1999) *Lett Appl Microbiol*, 29, 273 - 277.
45

Métodos de cultivos de células

Las células huésped transformadas con vectores que codifican los anticuerpos terapéuticos o fragmentos de enlazamiento de antígeno de los mismo pueden ser cultivadas ' por cualquier método conocido por aquellos capacitados en la técnica. Las células huésped pueden ser cultivadas en matraces de agitación, botellas rotatorias o sistemas de fibra hueca, pero se prefiere para producción a gran escala utilizar reactores de tanque particularmente para cultivos en suspensión. Preferiblemente, los tanques agitados se adaptadas para aireación usando por ejemplo, rociadores, deflectores o impulsores de bajo cizallamiento. Para las columnas de burbujas y reactores con agitación de aire, se puede utilizar aireación directa con burbujas de aire u oxígeno. Cuando las células huésped se cultivan en un medio de cultivo libre de suero, se prefiere que el medio este complementado con un agente protector celular tal como Pluronic F-68 para ayudar a prevenir el daño en las células como resultado del proceso de aireación.
50
55

Dependiendo de las características de la célula huésped, se pueden usar ya sea microportadores como sustratos de crecimiento para líneas celulares que dependen de anclaje o se pueden adaptar las células para cultivo en suspensión (lo cual es típico). El cultivo de las células huésped, particularmente células huésped de invertebrado puede utilizar una variedad de modos operacionales, tales como alimentación por lotes, procesamiento repetido de lotes (véase Drapeau et al., (1994) *Cytotechnology* 15: 103 - 109), proceso extendido de lotes o cultivo por perfusión. Aunque se pueden cultivar células huésped de mamífero transformadas en forma recombinante en medio que contienen suero, tal como suero de ternera fetal (FCS), se prefiere que tales células huésped se cultiven en medio sintético libre de suero tal como se divulga en Keen et al., (1995) *Cytotechnology* 17: 153 - 163, o un medio comercialmente disponible tal como ProCHO-CDM o UltraCHO^{MR} (Cambrex NJ, EUA), complementado según sea necesario con una fuente energética tal como glucosa y factores de crecimiento sintéticos, tales como insulina recombinante. El cultivo libre de suero de células huésped puede requerir que aquellas células se adapten para crecer en condiciones libres de suero. Un enfoque de adaptación s cultivas dichas células huésped en medio que contiene suero e intercambiar repetidamente 80% del medio de cultivo por el medio libre de suero de tal manera que las células huésped aprendan a adaptarse en condiciones libres de suero (véase, por ejemplo Scharfenberg K et al., (1995) en *Animal Cell Technology: Developments towards the 21st century* (Beuvery E. G. et al., eds.), páginas 619 - 623, Kluwer Academic Publishers).

Los anticuerpos u otras proteínas terapéuticas secretadas en el medio pueden ser recuperadas y purificadas usando una variedad de técnicas para proporcionar un grado de purificación adecuado para el uso pretendido. Por ejemplo el uso de anticuerpos terapéuticos para el tratamiento de pacientes humanos típicamente exige al menos 95% de pureza, más típicamente 98% o 99% o una pureza superior (comparado con el medio de cultivo sin purificar). En el primer caso, los residuos celulares del medio de cultivo se remueven típicamente usando centrifugación seguida por una etapa de clarificación del sobrenadante usando, por ejemplo, microfiltración, ultrafiltración y / o filtración en profundidad. Se encuentran disponibles una variedad de otras técnicas tales como diálisis y electroforesis en gel y técnicas cromatográficas tales como cromatografía de afinidad en hidroxapatita (HA) (que implica opcionalmente un sistema de etiquetado de afinidad tal como polihistidina) y / o cromatografía de interacción hidrófoba (HIC, véase a patente de los Estados Unidos No. 5.429.746). En un aspecto, los anticuerpos de la invención, después de varias etapas de clarificación con capturados utilizando cromatografía de afinidad con proteína A o G seguido por etapas de cromatografía adicionales tales como cromatografía de intercambio iónico y / o en HA, de intercambio aniónico o catiónico, cromatografía de exclusión por tamaño y precipitación con sulfato de amonio. Típicamente, también se emplean diferentes etapas de remoción del virus (por ejemplo, nano filtración utilizando por ejemplo, un filtro DV-20). Después de estas diferentes etapas, se proporciona una preparación purificada (preferiblemente monoclonal) que contiene al menos 75 mg/mL o más, por ejemplo, 100 mg/mL o más del anticuerpo o del fragmento de enlazamiento del antígeno del mismo. Convenientemente, tales preparaciones están sustancialmente libres de formas agregadas de anticuerpos.

35 Métodos de selección

En una formas de realización de la invención, se proporciona un método de / para identificación de moduladores de la interacción entre 7,25DHC y / o 7,27DHC y / o 7HC y / o 25HC y EBI2. Tal método generalmente comprenden poner en contacto 7,25DHC y / o 7,27DHC y / o 7HC en presencia de un compuesto candidato y observar una modulación (tal como inhibición) de la interacción entre uno cualquiera o ambos ligandos 7,25DHC y / o 7,27DHC y / o 7HC y / o 25HC y EBI2 comparado con los mismos experimentos en ausencia del compuesto candidato. En formas de realización preferidas de la invención, los ligandos son 7a,25DHC y / o 7b,25DHC y / o 7a,27DHC y / o 7b,27DHC y / o 7aHC y / o 7bHC y / o 25HC. Los compuestos candidatos que exhiben características de inhibición puede ser adicionalmente modificados estructuralmente para mejorar IC50 contra de su entidad objetivo y / o mejorar el perfil de toxicidad antes de la formulación y administración a un paciente humano que requiera clínicamente de los mismos.

Composiciones farmacéuticas

Se contemplan además aquí composiciones farmacéuticas que comprenden la proteína terapéutica o entidades químicas de bajo peso molecular formuladas junto con un portador farmacéuticamente aceptable. Las composiciones pueden contener adicionalmente otros agentes terapéuticos que sean adecuados para tratar o prevenir una enfermedad o trastorno humano mencionado más adelante. Los portadores farmacéuticos mejoran o estabilizan la composición, o facilitan la preparación de la composición. Los portadores farmacéuticamente aceptables incluyen disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y contra hongos, agentes isotónicos y que retrasan la absorción, y similares que sean fisiológicamente compatibles.

Una composición farmacéutica puede ser administrar por una variedad de métodos conocidos en el arte. La ruta y / o el modo de administración varían dependiendo de los resultados deseados. Se prefiere que la administración sea intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, o subcutánea, o administrada cerca del sitio objetivo. El portador farmacéuticamente aceptable debe ser adecuado para administración intravenosa, intramuscular, subcutánea, parenteral, espinal o epidérmica (por ejemplo, por medio de inyección o infusión). Dependiendo de la ruta de

administración, el compuesto activo (particularmente entidades químicas de bajo peso molecular) puede estar recubierto con un material para proteger el compuesto de la acción de los ácidos y otras condiciones naturales que pueden inactivar el compuesto.

5 La composición debe ser estéril y fluida. La fluidez apropiada puede ser mantenida, por ejemplo, mediante el uso de recubrimientos tales como lecitina, mantenimiento el tamaño de partícula requerido en el caso de la dispersión y mediante el uso de tensoactivos. En muchos casos, es preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol o sorbitol, y cloruro de sodio en la composición. La absorción a largo plazo de las composiciones inyectables puede efectuarse mediante la inclusión en la composición de un agente que retrase la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio o gelatina.

10 Las composiciones farmacéuticas se pueden preparar de acuerdo con métodos bien conocidos y rutinariamente practicados en la técnica. Véase, por ejemplo, Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Mack Publishing Co., 20th ed., 2000; y Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J. R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1978. Las composiciones farmacéuticas son preferiblemente fabricadas bajo condiciones BPM. Típicamente, se emplea una dosis terapéuticamente efectiva o una dosis eficiente del modulador de NRG1 (por ejemplo, NRG1 β 1) tal como un anticuerpo NRG1 β 1 descrito aquí en las composiciones farmacéuticas. Por lo general se formulan en formas de dosificación farmacéuticamente aceptables por medio de métodos convencionales conocidos por aquellos capacitados en el arte. Los regímenes de dosificación se ajustan para proporcionar la respuesta óptima deseada (por ejemplo, una respuesta terapéutica). Por ejemplo, se puede administrar un único bolo, se pueden administrar varias dosis divididas en el tiempo o se puede reducir o aumentar proporcionalmente la dosis como se indica por medio de las exigencias de la situación terapéutica. Es especialmente conveniente formular composiciones parenterales en forma unitaria de dosificación por facilidad de administración y uniformidad de la dosis. Una forma unitaria de dosificación como se utiliza aquí se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosis unitarias para los individuos que están siendo tratados; cada unidad contiene una cantidad predeterminada de compuesto activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado junto con el portador farmacéutico requerido.

Los niveles de dosificación reales de los ingredientes activos en las composiciones farmacéuticas se pueden variar para obtener una cantidad del ingrediente activo que sea efectiva para lograr la respuesta terapéutica deseada para un paciente particular, composición, y modo de administración, sin ser tóxica para el paciente. El nivel de dosificación seleccionado depende de una variedad de factores farmacocinéticos que incluyen la actividad de las composiciones particulares empleadas, o el éster, o la sal o la amida de las mismas, la ruta de administración, el tiempo de administración, la velocidad de eliminación del compuesto particular que está siendo empleado, la duración del tratamiento, otros fármacos, compuestos y / o materiales utilizados en combinación con las composiciones particulares empleadas, la edad, el sexo, el peso, la condición, el estado general de salud y la historia médica previa del paciente que está siendo tratado, y factores similares.

35 Un médico o veterinario puede iniciar las dosis de los anticuerpos empleados en la composición farmacéutica en niveles menores que aquellos requeridos para lograr el efecto terapéutico deseado y gradualmente incrementar la dosis hasta lograr el efecto deseado. En general, las dosis efectivas de las composiciones, para el tratamiento de un trastorno inflamatorio alérgico descrito aquí, varían dependiendo de muchos factores diferentes, incluyendo el medio de administración, el sitio objetivo, el estado fisiológico del paciente, ya sea que el paciente sea un ser humano o un animal, otras medicaciones administradas, y ya sea que el tratamiento sea profiláctico o terapéutico. Las dosis de tratamiento deben ser valoradas para optimizar la seguridad y la eficacia. Para administración con un anticuerpo, la dosis está en el intervalo de aproximadamente 0,0001 hasta 100 mg / kg, y más usualmente de 0,01 a 5 mg / kg, del peso corporal del huésped. Por ejemplo, las dosis pueden ser de 1 mg / kg de peso corporal o 10 mg / kg de peso corporal o estar en el intervalo de 1 - 10 mg / kg. Un ejemplo de un régimen de tratamiento implica la administración una vez cada dos semanas o una vez al mes o una vez cada 3 a 6 meses.

Los anticuerpos y otros compuestos terapéuticos proteínicos se administran usualmente en múltiples ocasiones. Los intervalos entre dosis individuales pueden ser en forma semanal, mensual o anual. Los intervalos también pueden ser irregulares de acuerdo a lo indicado mediante la medición de los niveles en sangre de proteína terapéutica en el paciente. En algunos métodos, se ajusta la dosis para lograr una concentración de anticuerpo en plasma de 1 - 1000 μ g / mL y en algunos métodos 25 - 300 μ g / mL. Alternativamente, se puede administrar un anticuerpo u otros compuestos terapéuticos proteínicos como una formulación de liberación sostenida, en cuyo caso se requiere una administración menos frecuente. La dosis y la frecuencia varían dependiendo de la vida media del anticuerpo o de otro compuesto terapéutico proteínico en el paciente. En general, los anticuerpos humanizados muestran una vida media más larga que aquella de los anticuerpos quiméricos y anticuerpos no humanos. La dosis y la frecuencia de administración pueden variar dependiendo de si el tratamiento es profiláctico o terapéutico. En aplicaciones profilácticas, se administra una dosis relativamente baja a intervalos relativamente menos frecuentes durante un período de tiempo más largo. Algunos pacientes continúan recibiendo el tratamiento por el resto de sus vidas. En aplicaciones terapéuticas, se requiere algunas veces una dosis relativamente alta en intervalos relativamente cortos para reducir o terminar el avance de la enfermedad, y preferiblemente hasta que el paciente muestre una mejoría

parcial o completa de los síntomas de la enfermedad. Después de eso, se le puede administrar al paciente un régimen profiláctico.

5 De este modo, se contempla aquí una composición farmacéutica que comprende un modulador de la interacción entre 7,25DHC y / o 7,27DHC y / o 7HC y / o 25HC y EBI2 junto con un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable. En un aspecto preferido, una composición farmacéutica comprende un modulador de la interacción entre 7a,25DHC y / o 7b,25DHC y / o 7a,27DHC y / o 7b,27DHC y / o 7aHC y / o 7bHC y / o 25HC y EBI2. Típicamente, tales moduladores son inhibidores como se describió aquí anteriormente.

Usos clínicos

10 Las composiciones farmacéuticas comprenden moduladores, particularmente inhibidores de la interacción entre 7,25DHC y / o 7,27DHC y / o 7HC y / o 25HC y EBI2, preferiblemente inhibidores de la interacción entre 7a,25DHC y / o 7b,25DHC y / o 7a,27DHC y / o 7b,27DHC y / o 7aHC y / o 7bHC y / o 25HC y EBI2, pueden ser utilizadas en enfermedades o trastornos sensibles a la modulación de esta interacción. Los ejemplos de tales enfermedades incluyen hipertensión, angina de pecho, aterosclerosis, insuficiencia cardíaca congestiva, accidente cerebrovascular, obesidad, síndrome metabólico, enfermedades autoinmunes tales como artritis, (especialmente artritis reumatoide), esclerosis múltiple y lupus, así como condiciones atópicas como asma y dermatitis atópica, la EPOC, hipertensión pulmonar, infecciones virales tales como EBV, VIH, hepatitis (A o C), enfermedad de hígado graso, esclerosis hepática (esclerosis hepática particularmente inducida por alcohol), cáncer, dislipidemia, diabetes (particularmente tipo II), rechazo del trasplante, síndrome de intestino irritable, enfermedad inflamatoria del intestino, enfermedades de inflamación crónica, alergia, psoriasis, fibrosis quística, hipercolesterolemia, enfermedad renal.

20 5. Ejemplos

La presente invención ahora se describirá ahora a manera de ejemplo únicamente.

En las figuras:

Figura 1: análisis por citometría de flujo de la expresión en la membrana plasmática de hEBI2 en clones de hEBI2 CHO-Aeq versus CHO-Aeq de tipo silvestre.

25 Figura 2: disminución en la expresión en la membrana plasmática de hEBI2 en células CHO-Aeq después de transfección transitoria (Lipofectamina) de oligonucleótidos de ARNpi específicos de EBI2.

Figura 3: identificación de la "actividad" específica de EBI2 en un extracto de hígado séptico humano durante un cribado primario de aequerina. Eje X = número de la fracción, eje Y = % de ATP en divisiones crecientes del 10%.

30 Figura 4: disminución de la activación de hEBI2 con extracto de hígado humano, después de transfección transitoria de los ARNpi de EBI2 (las SEQ ID como se definen en la Tabla 2 más adelante) en células hEBI2-CHO-AeqGqi5. De izquierda a derecha:

1. Clon 7 de EBI2

2. Clon 7 de EBI2 + ARNpi 1

3. Clon 7 de EBI2 + ARNpi 2

35 4. Clon 7 de EBI2 + ARNpi 3

5. Clon 7 de EBI2 + ARNpi 4 (control)

6. Con 7 de EBI2 de control (lipo)

Figura 5: activación de hEBI2 (aequerina) con fracciones hepáticas activas tratadas o no tratadas con proteinasa K.

40 Figura 6: determinación del tamaño molecular del ligando EBI2 usando fracciones hepática activa y cromatografía de exclusión por tamaño.

Figura 7: purificación del ligando natural de hEBI2 partir del extracto de hígado séptico humano: procedimiento de cromatografía líquida en 5 etapas.

- Figura 8: cribado Aequerina del clon 7 de hEBi-CHO-AeqGqi5 sobre un extracto de hígado de un modelo de sepsis de oveja.
- Figura 9: purificación del ligando natural de hEBI2 partir de un extracto de hígado de séptico de ovejas con seis etapas sucesivas de cromatografía líquida. Eje X = tiempo (en minutos); eje Y = AU (unidades de absorción) (A) o mAUA (miliunidades de absorción) (B - F). La etapa 1 corresponde al panel (A); la etapa 2 a (B); la etapa 3 a (C); la etapa 4 a (D); la etapa 5 a (E) y la etapa 6 a (F). En las etapas 4 panel (D) se detecta la actividad entre 16,25 y 16,75 min (no mostrada en la figura). En s etapas 5 panel (E) se detecta la actividad entre 20,50 y 21,50 min (no mostrada en la figura). En las etapas 6 panel (F) se detecta la actividad entre 39 y 40 minutos (no mostrada en la figura).
- Figura 10: el análisis por MS de EBI2 fracciones activas y de control en modo de iones positivos y negativos (Nano ESI-FTMS, Orbitrap) (*) indica los picos detectados sólo en la fracción activa (versus la fracción de control), mientras que (**) indica picos comunes en dos fracciones activas recolectadas por diferentes métodos de LC.
- Figura 11: 7b,25DHC y 7bHC activan hEBI2 expresada de forma estable en una CHO-AeqGqi5 (aequerina).
- Figura 12: la activación de EBI2 humano expresada en forma estable en células CHO-AeqGqi5 con 7b,25DHC es específica (ensayo de aequerina).
- Figura 13: la activación de EBI2 humana y de ratón con 7b,25DHC confirmó en diferentes líneas de células de CHO-hEBI2 AeqGqi5 (ensayo de aequerina)
- Figura 14: la activación de EBI2 humana y de ratón expresada en forma establemente en células CHO-AeqGα16 con 7b,25DHC (ensayo aequerina).
- Figura 15: ensayo de Aequerina para medir la activación de hEBI2 por 7a,25DHC, y 7b,25DHC en células CHO-AeqGα16 transfectadas en forma estable.
- Figura 16: ensayo de cAMP para medir la activación de hEBI2 por 7a,25DHC y 7b,25DHC en células CHO-AeqGα16 transfectadas en forma estable.
- Figura 17: ensayo de Pathhunter con β-arrestin para evaluar la activación de hEBI2 por 7a,25DHC y 7b,25DHC.
- Figura 18: (A) cromatografía líquida para separar 7a,25DHC de 7b,25DHC. (B) tiempo de retención de seis diferentes fracciones activas.
- Figura 19: comparación líquida de tiempos de retención del ligando natural de EBI2 con 7a, 25DHC y 7b,25DHC sintéticos (recuento versus tiempo de adquisición).
- Figura 20: RMN¹H (A) 7a,25DHC sintético y (B) ligando natural EBI2 aislado de hígado de cerdo.
- Figura 21: análisis de transferencia tipo Western de la fosforilación de MAP / ERK 5 minutos después de la activación de EBI2 por medio de diferentes oxiesteroles usando un anticuerpo específico fosfo p44/42 MAPK.
- Figura 22: análisis del arreglo de ADN de (A) EBI2 humano y (B) EBI2 de ratón en diferentes subconjuntos de células B.
- Figura 23: migración de células B humanas infectadas con EBV hacia 7a,25DHC.
- Figura 24: (A) migración de células RS1 1846 hacia 7a,25DHC en un ensayo de transferencia de 96 pozos. (B) inhibición de la quimiotaxis mediada por el oxiesteroles de células de RS1 1846 por la toxina pertussis (PTX).
- Figura 25: migración de células RS1 1846 hacia diferentes oxiesteroles.
- Figura 26: formación de perfiles de Q-PCR del nivel de expresión de ARNm de EBI2 en células inmunes humanas.
- Figura 27: migración de células mediada por 7a,25DHC de células dendríticas derivadas de médula ósea de ratón.
- Figura 28: exposición a NP-CGG de ratones de tipo silvestre y EBI2 (- / -). (A) valoraciones en suero de IgM anti-NP y (B) valoración en suero de IgG1 anti-NP después de 7 días.

5.1 líneas de células recombinantes de EBI2

Se clonó el gen del EBI2 humano usando RT-PCR a partir de ADNc de HL-60 y correspondiente al número de acceso de NP_004942 del GenBank. Se insertó el EBI2 humano en el vector pEFIN3 en los sitios de EcoRI y XbaI en el sitio de clonación múltiple. Se clonó EBI2 de ratón usando RT-PCR a partir de ADN genómico de ratón y correspondiente al número de acceso Q3U6B2 del GenBank. Se insertó el EBI2 de ratón en el vector de pEFIN3 en los sitios EcoRI y XbaI en el sitio de clonación múltiple. Se transfectaron en forma estable los plásmidos que expresan EBI2 humanos y de ratón en células CHO-K1 y HEK293 que expresan la apoaquorina (CHO-Aeq y HEK-Aeq) (Tabla 1). La integridad de la secuencia de ARNm del gen del EBI2 se comprobó usando RT-PCR en tiempos de cultivo T0 y T30 en células CHO.

5

10

Tabla 1: líneas de células de Aequorina recombinante de EBI2 de humano y de ratón.

	Líneas de células parentales	Proteína G	Deposito (mezcla)	Clones
EBI2 humano	CHO-Aeq	Gα16	x	#23
	CHO-Aeq	Gqj5	x	#7
	CHO-Aeq	-	x	
	HEK-Aeq	Gα16	x	
EBI2 ratón	CHO-Aeq	Gα16	x	
	CHO-Aeq	Gqj5	x	
	CHO-Aeq	-	x	

5.2 Anticuerpo monoclonal de EBI2 humano

Se utilizó un anticuerpo monoclonal hEBI2 (Costagliola, S., et al., (2000). Genetic immunization of outbred mice with thyrotropin receptor cDNA provides a model of Graves' disease. J. Clin. Invest 105, 803 - 811) para verificar la expresión estable en la membrana plasmática de hEBI2 en células CHO recombinantes usando citometría de flujo (Figura 1).

15

5.3 ARNpi de EBI2 humano

Se desarrollaron y validaron tres secuencias diferentes de oligonucleótidos ARNpi específicas para hEBI2 (Tabla 2).

La acción de 'silenciamiento' de estos ARNpi sobre la expresión génica de hEBI2 fue validada después de la transfección transitoria de ARNpi en células hEBI2-CHO-Aeq, usando citometría de flujo. Se observa una disminución significativa de la expresión del receptor de hEBI2 en la superficie de las células después del tratamiento de las mismas con ARNpi de hEBI2 (Figura 2).

20

Tabla 2: secuencias de oligonucleótidos de ARNpi específicas de hEBI2

ARNpi	receptor	Secuencia de ARNpi (5' - 3')	SEQ ID NO:
1	EBI2	GAAGCUUCGUUUCUCUAAU	1
2	EBI2	GCAGGAGGCUGAAAGGAUU	2
3	EBI2	GUCAGUGUAUCGAUUUCUA	3
4	Ctrl	CAUGCUAUCUGCCAGAAU	4

5.4 activación específica de hEBI2 con fracciones de extracto de hígado séptico humano

Se cribaron líneas de células hEBI2-CHO Aeq en un ensayo funcional de aequorina luminiscente contra bibliotecas patentadas de ligandos naturales y colección de extractos de tejido. Se identificó la activación específica de hEBI2 con fracciones de un hígado séptico humano (Figura 3).

- 5 El perfil de activación detallado de EBI2 contra este extracto de hígado patológico mostró tres picos de actividad eluidos dentro de acetonitrilo al 48%, 50% y 60%, respectivamente. Estas 'actividades biológicas' podrían ser identificadas en condiciones de un hígado patológico (sepsis), pero los extractos de hígado normal no activaron EBI2.

5.5 especificidad de la activación de EBI2 con extracto de hígado humano

- 10 Antes de iniciar la purificación del ligando de hEBI2 de extractos de tejido hepático, fue necesario confirmar la especificidad de la activación de hEBI2 y discriminarla de cualquier respuesta endógena de células CHO putativas. Para este fin, se subreguló selectivamente la expresión del gen de hEBI2 con el uso de secuencias específicas de oligonucleótido de ARNpi de hEBI2. Se observó una disminución consecutiva de la activación de EBI2 con extracto de hígado humano después de transfección transitoria de los ARNpi de hEBI2 (las SEQ ID como se muestra en la
- 15 Tabla 2) en células hEBI2-CHO-AeqGqi5 (Figura 4).

Propiedades físico-químicas y tamaño molecular del ligando de EBI2.

La 'actividad' específica de EBI2 no disminuyó después del tratamiento con proteinasa K lo que sugiere que el ligando de EBI2 no es un péptido (Figura 5).

Tamaño molecular del ligando de EBI2

- 20 El tamaño molecular del ligando de EBI2 se estimó utilizando fracciones hepáticas activas y cromatografía de exclusión por tamaño. El tamaño estimado para el ligando de EBI2 fue de alrededor de 400 Daltons (Figura 6).

Análisis por MS de fracciones hepáticas humanas activas

- 25 Se llevaron a cabo análisis por 1-LC-MS de fracciones hepáticas humanas activas en un UPLC Waters (cromatografía líquida con presión ultra alta) acoplado a un espectrómetro de masas Quattro Premier XE y en un UPLC Waters acoplado a un espectrómetro de masas LCT con el propósito de determinar la masa exacta del ligando de EBI2. Debido, probablemente, a las bajas cantidades de la entidad, no se obtuvo un resultado completamente claro.

5.6 Purificación del ligando de EBI2 a partir de hígado séptico humano

- 30 Con el propósito de concentrar y aislar el ligando EBI2 del tejido hepático patológico humano, e analizaron 8 hígados de sepsis humana. Dos de los 8 hígados mostraron una activación significativa de EBI2. Se extrajeron 1,8 kg de hígado séptico humano usando el siguiente procedimiento: se homogenizó tejido de hígado en 7 volúmenes de una mezcla de metanol-agua-ácido acético (90:9:1). Después de 30 minutos de centrifugación (10.000 x g, 4°C), se filtró el sobrenadante sobre papel filtro Whatman. Se diluyó luego el filtrado 3 veces con agua + 0,1% de TFA. Se cargó el extracto en una columna Delta Pak C18 (400 x 40 mm) y se lavó la columna con 20% de MeCN + 0,1% de TFA. Se
- 35 llevó a cabo la elución con 80% de MeCN + 0,1% de TFA, 100 mL / min. Luego se llevaron a cabo varios fraccionamientos con HPLC de este extracto con el propósito de purificar la entidad biológica responsable por la activación de EBI2 (véase la Figura 7).

5.7 Activación específica de hEBI2 con un extracto hepático de séptico de oveja

- 40 Con el propósito de superar la limitación de la disponibilidad de tejido humano, se investigaron varias sepsis de modelos animales como fuente potencial de material 'activo'. Se detectó activación específica de EBI2 con un extracto de hígado de un modelo de sepsis de ovejas con peritonitis (Figura 8). Se consideró entonces el hígado de oveja del modelo de sepsis de peritonitis como una fuente adicional de material para la purificación del ligando de EBI2.

5.8 Purificación del ligando de EBI2 de hígado de sepsis de oveja

- 45 Ya que la identificación del ligando de EBI2 purificado a partir de tejido hepático de sepsis humano no fue exitosa (principalmente explicado por la baja recuperación de materia activo), se inició la purificación del ligando de EBI2 a partir del hígado de sepsis de oveja, ya que se confirmó previamente la activación específica del receptor de hEBI2

con extracto de hígado originado a partir de un modelo de sepsis de oveja.

Procedimientos de extracción y purificación

Se extrajeron dos kilogramos de hígado de oveja y se fraccionaron después 6 pasos de cromatografía líquida. Se obtuvieron fracciones puras que activaron en forma potente al receptor hEBI2 (Figuras 9A-F).

5 Se homogenizó el tejido hepático en 7 volúmenes de una mezcla de metanol-agua-ácido acético (90:9:1). Después de un 30 min de centrifugación (10.000 x g, 4 °C), se filtró el sobrenadante en papel Whatman. Se diluyó luego el filtrado 3 veces con agua + 0,1% de TFA. Se cargó el extracto en una columna Delta Pak C18 (400 x 40 mm) y se lavó la columna con 20% de MeCN + 0,1% de TFA. Se llevó a cabo la elución con 80% de MeCN + 0,1% de TFA, 100 mL / min.

10 1^{ra} separación por HPLC:

Columna: 19 x 150 mm C18-300 Simetría, 5 µ Waters; 19 mL / min Gradiente del 50 al 65% de MeCN + 0,1% de TFA.

2^{da} Columna de separación de HPLC:

15 7,75 x 250 mm C8-300, 5 µ, ACE, 3 mL / min. La fracción activa de la primera separación de LC se diluye 2 veces con 0,1% de TFA y se carga en la columna. Gradiente de elución: 40 a 46% de MeCN + 0,1% TFA a razón de 0,2% / min.

3^{ra} Columna de separación de HPLC:

20 7,75 x 250 mm C18-300, 5 µ, ACE, 2,8 mL / min. Las fracciones activas de la segunda separación de LC se diluyeron 3 veces con 0,1% de HCOOH y se cargaron en la columna. Gradiente de elución: 35 a 65% de MeCN + 0,1% de HCOOH a razón de 1% / min.

4^a Columna de separación de HPLC:

4,6 x 150 mm HSF5, 3 µ, Supelco, 0,8 mL / min. Las fracciones activas de la tercera separación de LC se diluyeron 3 veces con agua y se cargaron en la columna. La elución se realizó en 41% de MeCN.

5^a Columna de separación de HPLC:

25 4,6 x 150 mm Symmetry-300, 3,5 µ, Waters, 1,3 mL / min. Las fracciones activas de la 4^a separación de LC se diluyeron 3 veces con agua y se cargaron en la columna. La elución se realizó en 41% de MeCN.

6^a Columna de separación de HPLC:

30 4,6 x 150 mm Difenilo, 5 µ, Vydac, 1,5 mL / min. Las fracciones activas de la 5^a separación de LC se diluyeron 2 veces con 0,1% de acetato de amonio 10 mM, y se cargaron en la columna. Gradiente de elución: 26 a 31% de MeCN - acetato de amonio 10 mM (9:1) a razón de 0,1% / min.

5.9 Identificación del(de los) ligando(s) del EBI2 en el extracto de hígado séptico de ovejas

Identificación del ligando de EBI2: análisis por MS.

35 1 - Un primer grupo de análisis por MS de las muestras activas (etapa 5) no logró revelar una masa candidata para el ligando de EBI2, probablemente debido a las bajas cantidades de molécula pura. Varios contaminantes estaban presentes en las muestras, dificultando la identificación de señales específicas. Además, no se podían detectar diferencias claras entre las muestras activas y de control

40 2 - Se llevó a cabo una etapa de purificación adicional por HPLC de las muestras de la etapa 5 (etapa 6). Antes del análisis por MS, se concentraron y limpiaron las muestras con Zip-Tips C18. La elución final fue con 80% de MeCN + acetato de amonio 10 mM. Las muestras eluidas fueron inyectadas directamente en un MS Orbitrap (Thermo) equipado con un dispositivo de NanoMate (Advion). El análisis por MS de las fracciones activas mostró cuatro picos con intensidades significativas tanto en la etapa 5 (Activo 1) como en la etapa 6 (Activo 2), que fueron despreciables en muestras de control. Los iones con masas m / z 383,3303; 401,3408; 441,3332 fueron observados en el modo de ion positivo, mientras que m / z 477,3582 fue observada en el modo de ion negativo (Figura 10).

Hipótesis:

Modo positivo:

441,3332 => [C27H46O3Na1]⁺ (precisión de la masa en ppm: -1,5)

401,3408 => [C27H45O2]⁺ (-1,5 ppm)

5 383,3303 => [C27H43O1]⁺ (-1,5 ppm)

Modo negativo:

477,3582 [C29H50O5]⁻ (+1,5 ppm)

10 Se obtuvieron cuatro composiciones elementales con buena precisión la masa de cuatro señales de iones comunes detectados en ambas fracciones activas. El ion correspondiente a la masa m / z 441,3332 podría ser asignado al aducto de sodio de la molécula C27H46O3 (M), mientras que la masa m / z 477,3582 para el aducto de acetato (CH₃COO⁻ o OAc⁻) de M. Además, los iones con masas 401,3408 y 383,3303 podrían ser asignados a una pérdida sencilla y doble de agua, respectivamente, a partir del ion molecular protonado. Por tanto, la hipótesis resultante es que el compuesto M = C27H46O3 con una masa teórica que de 418,3447 fue detectado como: [M + Na]⁺, [M + H - H₂O]⁺ y [M + H - 2H₂O]⁺ en modo de ión positivo, y [M + OAc]⁻ en modo de ión negativo. Ni protonados [M + H]⁺ ni desprotonados [M - H]⁻ se detectaron los iones.

20 Además, los experimentos de MS / MS se realizaron con las fracciones activas en las cuatro masas. No se obtuvieron fragmentos de m / z 441,3332 y 477,3582, dando crédito a la hipótesis de que estos corresponden a los aductos de sodio y acetato, respectivamente. Esto se debe a que la disociación inducida por colisión en fase gaseosa conduce predominantemente el desprendimiento del ion sodio o del ion acetato en vez de a la fragmentación de la molécula. Tanto los iones Na⁺ como OAc⁻ iones pueden no ser detectados debido al "corte de baja masa" (instrumento específico) en los experimentos de MS / MS. Algunos fragmentos se obtuvieron por MS / MS de m / z 383,3303. Entre ellos, se detectó una pérdida de agua a m / z 365,3205 (0,7 ppm). No se intentó una asignación adicional de estructura sobre los fragmentos de m / z 383,3303. No se realizó una MS / MS sobre m / z 401,3408 debido a su baja intensidad.

25 La consulta en bases de datos de la masa 418,3447 proporcionó colesterol oxidado principalmente (oxiesteroles) o derivados de vitamina D. A partir del análisis de las bases de datos se identificaron los siguientes candidatos a ligando:

39 derivados de colesterol que consisten de:

8 cetodiolos

30 27 trioles

2 ácidos

1 diol + epoxi

1 diol + aldehído

Compuestos analizados para la activación de EBI2 en un ensayo de aequorina

35 1 (25R)-5-alfa-espirostan

2 5-alfa-colestano-3,6-diona

3 5-alfa-colestano-2,3-diona

4 5-alfa-colestano-3,7-diona

5 colestano-4,6-dien-3-ona

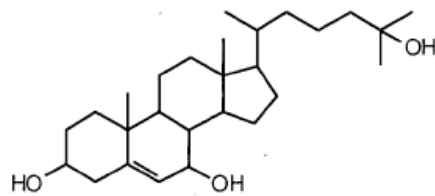
40 6 3-beta-hidroxicolest-4-en-6-ona

- 7 5-alfa-hidroxi-6-ceto colesterol
- 8 colest-3,5-dien-7-ona
- 9 5-colesten-3b-ol-7-ona
- 10 4,5-epoxi-3-colestanona
- 5 11 4-beta ,5-epoxi-5-beta-colestan-3-ona
- 12 Colesterol
- 13 b-sitosterol
- 14 25-hidroxicolesterol
- 15 22 (S)-hidroxicoolesterol
- 10 16 22 (R)-hidroxicoolesterol
- 17 1-alfa, 25-dihidroxitamina D3
- 18 24(R), 25-dihidroxitamina D3
- 19 25-Hidroxitamina D3

15 Se priorizó una lista de las moléculas candidatas con fórmula molecular C₂₇H₄₆O₃, y se probó para la activación de hEBI2. Tal lista de priorización se estableció a partir de derivados de colesterol identificados como productos intermedios en la ruta del metabolismo del colesterol y de los derivados conocidos de vitamina D. Esta lista contenía 12 derivados de colesterol y 5 derivados de vitamina D con la fórmula molecular C₂₇H₄₆O₃ (masa 418,3447)

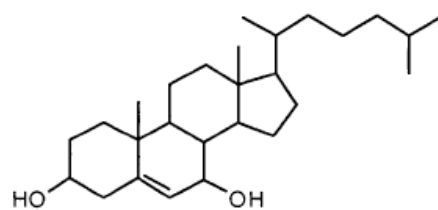
Se analizaron 3 compuestos de oxisterol y 3 de vitamina D3 para la activación de EBI2 en un ensayo de aequorina.

20 Entre estas moléculas candidatas, dos oxisteroles relacionados, colest-5-eno-3b, 7b,25-triol (7b,25DHC), representados por el compuesto de la Estructura I y colest-5-eno-3b, 7b-diol (7bHC), representados por el compuesto de la Estructura II indujeron la activación específica del receptor de EBI2 con valores de EC₅₀ cercanos a 50 nM y 15 μM, respectivamente, mientras que colest-5-eno-7-metoxi, 3b-ol, representado por el compuesto de la Estructura III no activó EBI2 (Figura 11), lo que subraya la importancia de los grupos alcohol y su posición en la relación estructura-actividad.

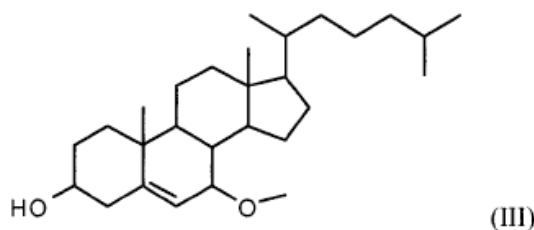


(I)

25



(II)



5.10 Confirmación de la activación específica de EBI2 con el ligando derivado del colesterol en células CHO y HEK.

Se demostró que colest-5-eno-3b, 7b,25-triol (7b,25DHC) específicamente y selectivamente activa hEBI2 en comparación con células WT CHO-AeqGqi5 y las GPCR no relacionadas tales como HCR y GPR23 huérfanas (Figura 12 y 14). También se confirmó la activación de hEBI2 por 7b,25DHC en diferentes ambientes de células CHO-Aeq (Gqi5 y Gα16 (= WTA11)) (Figura 14). Además se demostró la activación de receptor de EBI2 de ratón con 7b,25DHC (Figuras 13 y 14). Finalmente, se confirmó la activación de hEBI2 por 7b,25DHC con células hEBI2-HEK-AeqGα16 (pCAeqG9) y hEBI2 transfectadas en forma transitoria en células T HEK (datos no mostrados).

5.11 MS de compuestos estándar 7,25-OHC

Se analizaron muestras estándar sintetizadas 7a25-OHC y 7b25-OHC con los mismos métodos de MS como se describe en 5.9. En concentración relativamente bajas, sólo $[M + Na]^+$ m / z 441,3338 (0,3 ppm), $[M + H-H_2O]^+$ m / z 401,34140 (0,5 ppm) y $[M + H-2H_2O]^+$ m / z 383,33084 (0,01 ppm) se detectaron en modo de ion positivo, y $[M + OAc]^-$ m / z 477,3585 (0,2 ppm) en modo de ion negativo en presencia de acetato de amonio. No se detectaron señales protonadas y desprotonadas. Estas observaciones son consistentes con aquellas obtenidas a partir de las fracciones activas.

5.12 Conclusión

Se purificó el ligando natural de EBI2 a partir de hígado de oveja obtenido de un modelo de sepsis de peritonitis. Aunque la activación de EBI2 se detectó inicialmente en un extracto de hígado séptico humano, el material patológico humano era difícil de obtener y la purificación del ligando de EBI2 a partir de 1,8 kg de hígado séptico humano no permitió aislar cantidades suficientes de entidad activa para ser detectados por análisis de MS.

El análisis de espectrometría de masas en fracciones activas purificadas de hígado de oveja, dio como resultado la identificación de una masa candidata 418,3447 y una fórmula molecular asociada C₂₇H₄₆O₃. Los compuestos que muestran tales características son esencialmente correspondientes con el colesterol o derivados de la vitamina D.

Después de la selección y el cribado del candidato para la activación de hEBI2 (ensayo de aequorina), se identificaron colest-5-eno-3b,7b,25-triol (7,25-dihidroxicolesterol) ("7b,25DHC") y colest-5-eno-3b,7b-diol (7-hidroxicolesterol) ("7bHC") como dos ligandos activos en hEBI2. Colest-5-eno-3b,7b,25-triol potentemente activó hEBI2 con valor de EC₅₀ de alrededor de 50 nM y mostró una eficacia mayor al 100% en comparación con la respuesta de ATP (receptores P_{2Y} endógenos).

La especificidad y la selectividad del colest-5-eno-3b,7b,25-triol para hEBI2 se demostró en comparación con células WT CHO-Aeq y los GPCR no relacionados.

La activación de hEBI2 con colest-5-eno-3b, 7b, 25-triol se demostró en células CHO-K1 y células HEK293.

5.13 Perfil farmacológico de oxiesteroles en el receptor EBI2

Una vez se demostró la actividad de 7b,25DHC y 7bHC en el receptor EBI2 nos propusimos determinar cuál es el compuesto activo más probable in vivo. 7b,25DHC no es un compuesto producido de forma natural por una reacción enzimática, sino más bien es un producto de auto-oxidación bajo condiciones específicas. Se llevó a cabo, por lo tanto, una caracterización farmacológica de la interacción oxiesteroles/EBI2.

Metodología

Compuestos:

Se sintetizaron 7a,25DHC (CAS No. 64907-22-8) y 7b,25DHC (CAS No. 64907-21-7) a partir del precursor 7-ceto tal como se describe a continuación. Se adquirieron 7a,27DHC (CAS No. 144300-24-3), 7b,27DHC (CAS No. 240129-

43-5) a través de Avanti Polar Lipids Inc. (Alabaster, AL, EUA). 7aHC (CAS No. 566-26-7) fue sintetizado por lotes en casa. Se adquirieron 7bHC (CAS No- 566-27-8), 25HC (CAS No. 2140-46-7), y colesterol (CAS No. 57-88-5) a través de Sigma-Aldrich (Buchs, Suiza).

Preparación Compuesto

- 5 Si no se indica otra cosa, se disolvieron los compuestos en DMSO 10 mM o etanol (colesterol, 25MDC). Las diluciones en serie se llevaron a cabo en 90% de DMSO (FLIPR, GTPgS) o amortiguador de ensayo (ensayo de enlazamiento). Para los ensayos basados en células, se mantienen las concentraciones finales de DMSO por debajo del 1%. Con el fin de evitar la adsorción de compuestos hidrófobos en las placas de ensayo se añade 0,1% de (2-hidroxipropil) - β -ciclodextrina (Aldrich, # 33259-3).

10 Línea celular

Si no se indica otra cosa, se usó la misma línea celular de ovario de hámster chino (CHO) denominada E2 para la identificación del ligando en estos experimentos. Esta línea celular expresa (1) el receptor de EBI2 humano recombinante, (2) la proteína promiscua Gqi5, así como (3) la apo-aequorina.

FLIPR

- 15 Se sembraron las células en placas de 384 pozos de fondo negro / claro, recubiertos con poli-D-lisina con una densidad celular de 10.000 células / 25 μ L / pozo, usando medio de cultivo. Se cultivaron las células durante 24 horas a 37 °C / 5% de CO₂. Se removió el medio de cultivo y para la carga de las células, se distribuyeron 20 μ L por pozo de amortiguador de carga (Calcio-4 sin colorante de lavado) en los pozos y se incubaron las placas durante 60 min a 37 °C en 5% de CO₂. Con la pipeta de FLIPR, se añadieron 10 μ L de los diferentes compuestos a las células y se hizo seguimiento a los cambios posteriores de fluorescencia durante 3 minutos. Mediante el uso de la herramienta de software de FLIPR, se exportaron 2 valores de respuestas de calcio fluorescente: F_{máx}, la fluorescencia en el pico y F_{basal} correspondiente al valor previo a la inyección del compuesto. A partir de estos dos valores, se normaliza la respuesta del calcio con respecto a los valores de línea base del calcio utilizando $dF/F = (F_{máx} - F_{basal}) / F_{basal}$. El dF/F máximo se llama E_{máx}.

25 Preparación de las membranas

- Se cultivaron células CHO que expresan EBI2 humano (E2) en forma estable en botellas rotatorias (Corning # 431191) hasta confluencia, se lavaron con solución salina amortiguada con fosfato (PBS) una vez y se congelaron a -80 °C. Se resuspendieron los sedimentos celulares congelados en amortiguador de homogeneización enfriado con hielo (10 ml / gramo, Tris 20 mM pH 7,2), se complementaron con un cóctel inhibidor de proteasa (Complete^{MR}, Roche, # 05 056 489 001 - 14302200). Se homogenizó luego la suspensión de células usando un homogeneizador Dounce (10 golpes) con un taladro. Después de centrifugación a 110.000 x g durante 45 minutos y la remoción del sobrenadante, se resuspendieron los sedimentos en amortiguador de sacarosa (Tris 50 mM pH 7, 2, sacarosa 250 mM, glicerol al 10%) mediante agitación de tipo vórtice. Se homogenizó nuevamente la suspensión utilizando un homogeneizador Dounce (10 golpes) y se centrifugó a 100.000 x g durante 45 minutos. Se descartó el sobrenadante, se resuspendió el sedimento en amortiguador de sacarosa, se determinó la concentración de proteína, se dividió en alícuotas y se congeló a -80 °C. Estas preparaciones de membrana se utilizan en el enlazamiento, así como en ensayos de GTPgS.

Ensayo de GTPgS

- 40 La reacción se llevó a cabo en placas de 96 pozos (OptiPlates^{MR}, Perkin Elmer # 6005299). Se disuelven 10 microgramos de membranas del EBI2 en 40 μ L de amortiguador A (HEPES 20 mM, pH 7,4, NaCl 100 mM, MgCl₂ 1,5 mM, saponina 10 μ g / ml) complementado con GDP 10 μ M. Después de la adición de 20 μ L de perlas para el ensayo de proximidad de centelleo (SPA) (100 μ g / pozo, Amersham, RPNQ0001), se mezclan suavemente los componentes y se incuban a temperatura ambiente durante 15 minutos. Se añaden 20 μ L del compuesto diluido en amortiguador A y 20 μ L de GTP³⁵S (Perkin Elmer NEG030X) antes de la incubación durante una hora a temperatura ambiente.

Se transfieren las placas y se hace un recuento en un TopCount (Perkin Elmer NXT HTS^{MR}) y se analizan los recuentos en un gráfico para determinar las concentraciones medias máximas de activación utilizando un software estándar (Prisma^{MR}, GraphPad Software Inc.).

Ensayo de enlazamiento

50 Materiales

Se adquirieron perlas para el ensayo de proximidad de centelleo (SPA) de aglutinina de germen de trigo liofilizado (RPNQ0001) a través de GE Healthcare (Buckinghamshire, Reino Unido). Se reconstituye un vial (500 mg) mediante la adición de 5 mL de agua destilada hasta una concentración final de 100 mg / mL. Las perlas del SPA reconstituidas deben ser almacenadas a 4 °C, pero no deben ser congeladas. Se sintetizó [3H]-7a,25-COH, por reducción de la 7-ceto,25DHC en presencia de 3H-L-selectrida. Este protocolo produce cantidades iguales de 7a,25DHC y 7b,25-OHC (ver más abajo). El [3H]-7a,25DHC utilizado en este experimento era Batch RSE 436-2 con una actividad específica de 1024 GBq/mmol) y se almacenó a - 20 °C. Las placas de 384 pozos de EBI2 (Cat. No. 6007290, poliestireno blanco, fondo cuadrado plano) fueron adquiridas a través de Perkin Elmer (Boston, EUA).

Síntesis de 7,25DHC marcado en forma radioactiva

- 10 En una línea de valoración, se colocó un matraz de dos bocas evacuado ($V = 2$ mL) bajo $^3\text{H}_2$ (99% de $^3\text{H}_2$, 179,25 mmoles, $p = 728$ mbares) a 296 K. Posteriormente, se añadieron butil-litio en hexano (160 μmoles , 100 μL , $c = 1,6$ M) y tetrametil etilendiamina (200 μmoles , 30 μL). Después de 55', se enfrió la suspensión con N_2 líquido, se llevó de vuelta el exceso de $^3\text{H}_2$ al depósito de residuos y se evaporó el disolvente. A continuación, se dejó el residuo bajo una atmósfera de N_2 , se añadió THF (500 μL), se diluyó la suspensión con sec-butil-borano en THF (160 μmoles , 160 μL , $c = 1$ M) y se enfrió a -90 °C. A esta temperatura, se añadió una solución de 1 (24 μmoles , 10 mg) en THF (500 μL) en el lapso de 1' y se agitó la mezcla de reacción durante 90', mientras se elevaba lentamente la temperatura desde -80 °C hasta -50 °C. Después de este tiempo, se añadió acetona (150 μL) y se agitó la mezcla de reacción durante otros 90', mientras la temperatura se elevaba lentamente desde -50 °C hasta -8 °C. Al final, se detuvo la mezcla de reacción con NaOH 1,0 N (250 μL) y H_2O_2 al 30% (250 μL) y se agitó durante 15' a temperatura ambiente. Posteriormente, se congeló la mezcla de reacción en nitrógeno líquido, se evaporó a sequedad y se evaporó conjuntamente con etanol (4 x 1 mL). Se filtró el residuo sobre una almohadilla de SiO_2 (1 g) y se eluyó el producto con CH_2Cl_2 / MeOH en proporción 95:5 a fin de producir 851 MBq de una mezcla de 2 y 3 (disuelta en 14 mL de etanol; isómero α / isómero $\beta = 58:42$), que se separó por HPLC preparativa en fase inversa en MN Nucleodur Sphinx RP (5 μm , 8 x 150 mm, $T = 20$ °C, $\lambda = 210$ nm; eluyente A: agua + 0,1% de TFA; eluyente B: $\text{CH}_3\text{CN} + 0,1\%$ de TFA). De este modo, se obtuvieron dos fracciones enriquecidas de 2 (59,94 MBq, isómero α / isómero $\beta = 70:30$) y 3 (108,04 MBq, isómero α / isómero $\beta = 38:62$), cada uno después de la extracción sobre un soporte sólido StrataX (2 x 100 mg). Las fracciones previamente purificadas enriquecidas se purificaron adicionalmente por medio de HPLC preparativa en fase inversa en SunFire C18 de Waters (5 μm , 10 x 250 mm, $T = 40$ °C, $\lambda = 210$ nm; eluyente A: $\text{H}_2\text{O} / \text{MeOH} = 95:5$; eluyente B: $\text{H}_2\text{O} / \text{MeOH} = 5:95$) con el fin de producir 50,6 MBq de 2 diastereoméricamente puro (isómero α / isómero $\beta = 99,9:0,1$) y 51,4 MBq de 3 diastereoméricamente puro (isómero α / isómero $\beta = 0,1: 99,9$).

Determinación de K_D

La determinación de K_D se realizó utilizando una concentración fija de membranas y perlas (respectivamente 20 μg y 200 μg por pozo) y un intervalo de concentraciones de [3H]-BYX998 de 0,05 a 300 nM. Estas soluciones se elaboraron en amortiguador que contenía Tris 50 mM; NaCl 100 mM; MgCl_2 5 mM y 0,1% de ciclodextrina.

- 35 El enlazamiento específico se midió en presencia de una concentración constante final de 7a,25DHC (NVP-BYX998-NX-4) de 10 μM y se midió el enlazamiento total correspondiente con amortiguador en lugar de NVP-BYX998-NX-4.

Determinación de IC50

- 40 Se llevó a cabo el ensayo de SPA en un volumen final de 50 μL por pozo en una placa Opti de poliestireno de 384 pozos. Se añadieron los componentes en los pozos de la siguiente manera: - 10 μL de compuestos del ensayo en Tris 50 mM; NaCl 100 mM, MgCl_2 5 mM y 0,1% de ciclodextrina.

Se determinó el enlazamiento total mediante la adición de 10 μL de Tris 50 mM; NaCl 100 mM; MgCl_2 5 mM y 0,1% de ciclodextrina y se determinó el enlazamiento no específico mediante la adición de 10 μL de NVP-BYX998-NX-4 (concentración final de 10 μM).

- 45 - 20 μL de [3H]-BYX998 10 nM final en amortiguador del ensayo (Tris-HCl 50 mM, NaCl 100 mM, MgCl_2 5 mM y 0,1% de ciclodextrina).

- 20 μL de perla mixta y suspensión de membrana en amortiguador del ensayo, con el fin de obtener una concentración final de 20 μg de membrana / pozo y 200 μg de perlas / pozo.

- 50 Se sellaron las placas y se agitaron a temperatura ambiente durante 10 minutos y después se dejó en reposo a temperatura ambiente durante al menos 12 horas. Se hizo recuento de las placas usando un lector TopCount de Perkin Elmer, haciendo un recuento por pozo durante 1 minuto. Cada determinación de IC50 se realizó con 11 concentraciones.

Se utilizó un algoritmo de reducción de datos estándar para calcular el porcentaje de enlazamiento específico en presencia del compuesto del ensayo de la siguiente manera:

$$((B - NSB) / (Total - NSB)) \cdot 100,$$

donde

5 B = Enlazamiento en presencia del compuesto del ensayo (en cpm)

NSB = Enlazamiento no específico en presencia del inhibidor en exceso (en cpm)

Total = Enlazamiento en ausencia del compuesto del ensayo (en cpm)

10 Se lleva a cabo luego un ajuste de curva de las curvas normalizadas de respuesta a la concentración utilizando un ajuste logístico de cuatro parámetros usando XLfit (v.2 o v.4, IDBS, Guildford, Reino Unido). La ecuación usada es la ecuación XLfit no. 205 para una curva de respuesta a la dosis sigmoideal en un sitio: $Y = A + ((BA) / (1 + ((C / X) ^D)))$, donde A = min, B = máx, C = IC50, D = pendiente. Por defecto, min se fija en 0, mientras que máx no se fija.

Ki se calcula de acuerdo con la ecuación de Cheng-Prusoff (Cheng, Y. y Prusoff, W. H. (1973). Relationship between the inhibition constant (K1) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (150) of an enzymatic reaction. *Biochem. Pharmacol.* 22, 3099 - 3108):

15 Ensayo de aequorina

Usando el ensayo de aequorina se encontró que 7a,25DHC activó EBI2 expresado de forma estable en células CHO con una EC50 de 18,4 nM en comparación con el menos potente 7b,25DHC para el que se midió una EC50 de 398 nM (Figura 15).

Metodología

20 Se generó una línea celular estable que expresa EBI2 humano (en el vector pcDNA3.1) y Gy16 con células CHO parentales que expresan de forma estable la apo-aequorina (línea de células CHO-A12 de Euroscreen). Se sembraron las células en placas de fondo negro / claro de 384 pozos (Greiner Bio-One) a razón de 10.000 células / 25 µL / pozo en medio F12 que contenía 3% de FBS y se incubó durante la noche. Se añadió coelenterazina (20 µM final) a las placas de células a razón de 25 µL / pozo. Se devolvieron las placas de células a la incubadora durante 3

25 horas. Se diluyeron los compuestos en proporción 1:20 en una placa intermedia con amortiguador Tyrode (NaCl 130 mM, CaCl₂ 2 mM, NaHCO₃ 5 mM, KCl 5 mM, MgCl₂ 1 mM, HEPES 20 mM, pH 7,4). Se transfirieron 12,5 µL / pozo de compuestos previamente diluidos a la placa de ensayo celular y se leyó en LumiLux^{MR} (Perkin Elmer) para luminiscencia instantánea.

30 Se creó un algoritmo similar al área bajo la curva (AUC) en casa para analizar los datos cinéticos de la aequorina, que fue denominado Umbral de la Pendiente (Pendiente 100). El algoritmo define el comienzo y el final del pico de intensidad de luminiscencia mediante la comparación de la diferencia de intensidad de cada instante de tiempo con un instante de tiempo anterior, y determina si la diferencia excede un umbral definido, que se estableció usualmente en 100. Si lo hace, entonces se añade la intensidad del instante de tiempo posterior a la suma del Umbral de la Pendiente.

35 Ensayo de cAMP

Del mismo modo, en el ensayo de cAMP, el estereoisómero 7a,25DHC (EC50 = 10,3 nM) muestra ser más potente que el estereoisómero 7b,25DHC (EC50 = 10,6 µM) (Figura 16).

Metodología

40 La misma línea celular estable de EBI2 utilizada en el ensayo de aequorina se utilizó en el ensayo de AMPc. Se sembraron 10.000 células (25 µl) por pozo en placa sólida blanca de 384 pozos y se incubaron en una incubadora a 37 °C durante la noche. A continuación, se transfirieron 500 nl del compuesto a cada pozo de ensayo, seguido por 5 µl de adición de forskolina para una concentración final de 30 µM. Se devolvieron las células a una incubadora a 37 °C durante 30 min. Finalmente, se dispensaron 15 µl cada vez de HiRange D2-AMPc y criptato de anti-AMPc por pozo. Después de > 1 hora de incubación a temperatura ambiente, se hizo la adquisición de datos en el modo FRET (transferencia de energía de resonancia de fluorescencia) resuelta en el tiempo en un Envision^{MR} o ViewLux^{MR} (Perkin Elmer). Se calculó la relación entre la señal de fluorescencia del aceptor (A 665 nm) y la señal de fluorescencia del donador (A 620 nm) x 10⁴, que representa la FRET entre el AMPc conjugado y el anticuerpo anti-

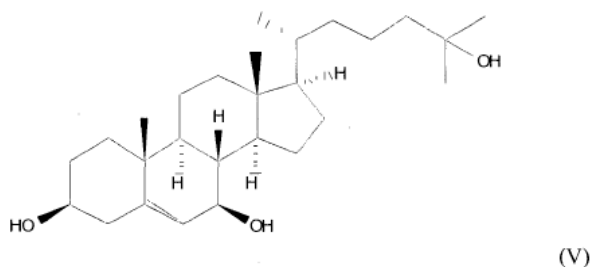
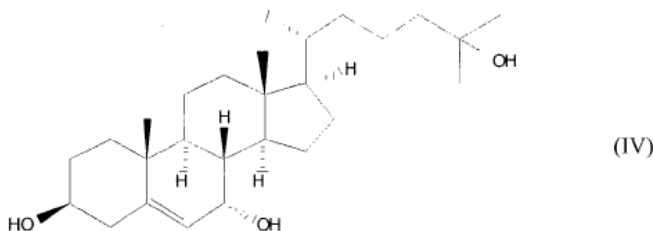
45

AMPC, y se representó gráficamente en el eje Y. Cuanto mayor sea la señal, menor es la concentración de AMPC endógeno en la muestra.

Interacción de la beta-arrestina beta de EB12 después de la activación con oxiesteroles (DiscoverX)

5 Se ha demostrado para un gran número de GPCR que la activación del receptor conduce a la fosforilación de residuos en el terminal C y el reclutamiento de β -arrestina. Posteriormente, el complejo GPCR / β -arrestina se incorpora en pozos revestidos de clatrina lo que conduce a la internalización del receptor que contiene vesículas y la desensibilización del receptor de señalización.

10 Varias tecnologías de ensayo Transfluor^{MR}, (Ghosh, R. N., et al. (2005). Quantitative cell-based high-content screening for vasopressin receptor agonists using transfluor technology. *J Biomol Screen* 10; Granas, C., et al. (2005). High content screening for G protein-coupled receptors using cell-based protein translocation assays. *Comb Chem High Throughput Screen* 8); Pathhunter^{MR}, (Hammer, M. M., et al. (2007). A novel enzyme complementation-based assay for monitoring G-protein-coupled receptor internalization. *Faseb J*, 21; Wehrman, T. S., et al. (2005). Enzymatic detection of protein translocation. *Nat Methods* 2), Tango^{MR}, (Barnea, G., et al. (2008). Aquí hemos aplicado la tecnología Pathhunter^{MR} (DiscoverRx) para probar la interacción de EB12 con β -arrestina. Para eso, se clonó EB12 humano en el vector Prolink^{MR} (DiscoverRx) para la producción de proteína de fusión GPCR-prolink. Se desprendieron las células HEK293 parentales que expresan de forma estable la proteína de fusión β -arrestina-2- β -gal-EA (HEK293-BAEA) y se transfectaron transitoriamente con el vector hEB12-prolink usando el reactivo de transfección Fugene6 en el modo de suspensión. Las células transfectadas en medio de ensayo (DMEM libre de rojo fenol con 10% de FBS) se sembraron en placas sólidas blancas de 384 pozos a razón de 15.000 células / 25 μ l / pozo. Después de incubación durante la noche, se transfirieron 200 nl de moléculas de ensayo a las placas de células por medio de PinTool^{MR} (GNF Systems) seguido por incubación durante 1 - 2 horas a 37 °C, 5% de CO₂. Se añadieron reactivos de detección instantánea a 12,5 μ l / pozo. Después de 5 min - 1 h de incubación a temperatura ambiente, se leyeron las placas de las células en CLIPR^{MR} (Perkin Elmer) o Acquest^{MR} (Molecular Devices) para la señal de luminiscencia. Los resultados muestran que 7a,25DHC (compuesto de fórmula IV) y 7b,25DHC (compuesto de fórmula V) activan hEB12 con una EC₅₀ de 8,0 nM y 837 nM (48% de eficacia), respectivamente (Figura 17).



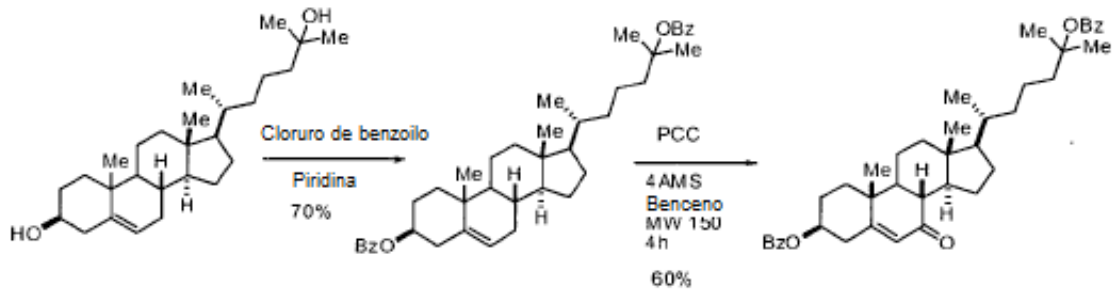
5.14 7a,25-COH es el oxiesteroles que se purificó a partir de extractos de tejido

30 7a,25DHC que se sintetizó mediante la modificación de un método conocido (método de síntesis 1) (Li, D. & Spencer T. A. (2000) Synthesis of 7a-hydroxy derivatives of regulatory oxysterol, *Steroids* 65, 529 - 535) o de acuerdo con la proceso de un solo paso (método de síntesis 2) como se muestra a continuación.

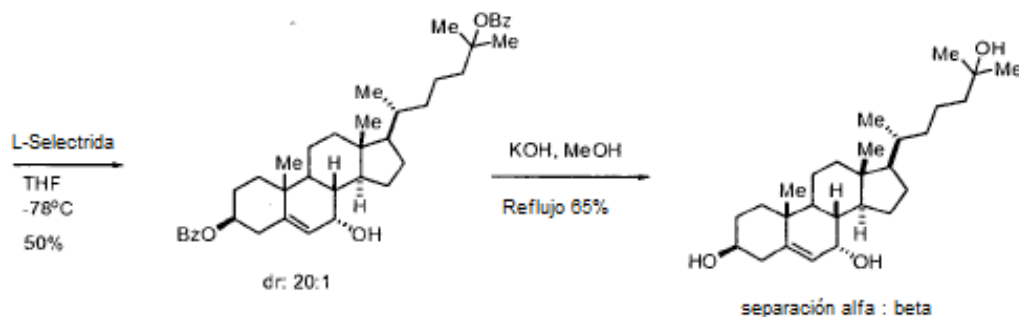
Método de síntesis 1

35 A partir de 5-3b-colesten,25-diol comercialmente disponible (Steraloids, C6510-000), se protegen los dioles con cloruro de benzoilo, seguido por oxidación C7 con clorocromato de piridinio en benceno absoluto y tamiz molecular bajo irradiación de microondas a 150 °C durante 4 h. L-selectrida en THF a -78 °C facilitó la reducción diastereoselectiva (20:1) del carbonilo C7 hasta un grupo 7 α -hidroxi. Los dos diastereómeros se pueden aislar

convenientemente usando cromatografía en columna de gel de sílice (75% de acetato de etilo en hexanos hasta 100% de acetato de etilo). La desprotección del éster di-benzoilo produjo el producto final 7a,25DHC con un rendimiento total del 14% (4 pasos).

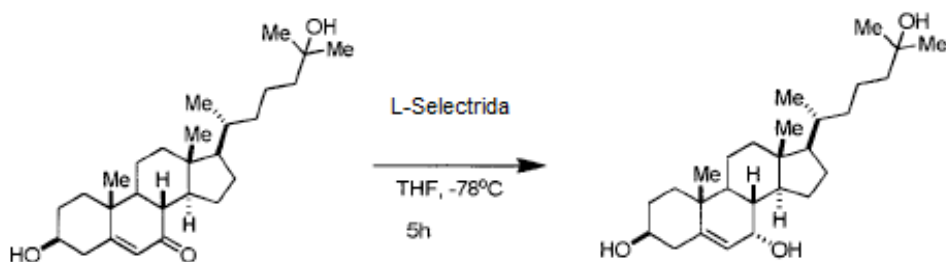


5



Método de síntesis 2

- 10 A partir de 5-colesten-3 β ,25-diol-7-ona comercialmente disponible (Steraloids, C6510-000), se redujo diastereoselectivamente el grupo C7-carbonilo (dr ~ 20:1) con L-Selectrida en THF a -78 °C durante 5 horas, después de la elaboración y cromatografía en columna, se pudo obtener 7a,25DHC puro se puede obtener en un solo paso con un rendimiento aproximado del 50%. Este proceso en un solo paso es muy útil para la síntesis de 7a, 25DHC (por ejemplo, marcado con ^3H).



Como se muestra en la Tabla 3 anterior, el compuesto 7a,25DHC probó ser más potente que 7b,25DHC.

- 15 Con el fin de determinar la naturaleza exacta del oxiesterol purificado a partir de hígado de oveja se desarrolló un método analítico para separar los dos oxiesteros estereoisómeros diferentes (7a,25DHC versus 7b,25DHC) por medio de cromatografía líquida.

Metodología

- 20 Con el fin de determinar la estereoquímica de 7,25DHC del material bioactivo a partir de los extractos de tejido, primero se estableció un método analítico para separar los dos diastereómeros, 7a,25DHC y 7b,25DHC usando compuestos de referencia. En una segunda etapa, se compararon el tiempo de retención para los compuestos de referencia con material bioactivo de extractos de tejido. Las muestras utilizadas en este experimento fueron a partir de dos preparaciones de hígado de oveja, S5 y S9, y las tres fracciones biológicamente activas para cada preparación se recogieron en la última etapa de purificación.

Se separaron el 7a,25DHC y el 7b,25DHC por cromatografía líquida (LC) en una columna Hypersil Gold^{MR} de Thermo-Fischer. Se utilizaron agua (NH₄Ac 5 mM) y acetonitrilo (ácido acético al 0,1%) como fases móviles. El gradiente varió de 20% a 85% de acetonitrilo durante 12 min (Figura 18A). Se detectaron selectivamente los compuestos por espectrometría de masas con electroaspersión, en 2 instrumentos. En ambos casos, se hizo seguimiento al producto de fragmentación en la fuente (pérdida de 2 H₂O C₂₇H₄₇O₃⁺ -> C₂₇H₄₃O⁺, 383,3308 Da), así como a 2 fragmentos de CID (descomposición inducida por colisión) de ese ión específico en 253,27 y 157,18 Da. Sólo si se observan simultáneamente los 3 iones se llega a la conclusión de que se detecta DHC.

Primero se utilizó un instrumento LTQ^{MR} de Thermo Finnigan. Es capaz de adquisición rápida de datos, lo que permite un uso completo de la separación del pico por medio del tiempo de retención (RT) por cromatografía líquida. En todas las seis muestras sólo se detectó 7a,25DHC y no 7b,25DHC (Figura 18B). Se confirmaron estos resultados en un segundo instrumento (Thermo LTQ-Orbitrap^{MR}), que muestra una mayor resolución de masa y de precisión, pero una resolución ligeramente reducida por cromatografía líquida.

5.15 Aislamiento del ligando natural del EBI2 a partir de hígado de cerdo

Paralelamente a la amplia caracterización farmacológica de los oxiesteroles capaces de modular EBI2, se ha intentado la purificación de ligandos naturales del EBI2 a partir de extractos de hígado de cerdo.

Protocolo de extracción

Se molieron 10 Kg de hígado de cerdo, en un molino para carne, y se homogeneizaron (cada 500 g de tejido molido en húmedo con 500 mL de agua) utilizando Vitamix, y se extrajo con 20 L de mezcla de hexanos e isopropanol en proporción 1:1 durante 1 h. Se separaron los sedimentos y dos capas de líquido por centrifugación durante 30 min (15000 x g, 4 °C), se recogieron las capas orgánicas, se secaron sobre sulfato de sodio, y se concentró para producir un sólido blanquecino pálido (~ 1 kg, no totalmente seco).

Protocolo de fraccionamiento

Etapa 1 del fraccionamiento: se cargó 1 kg de extracto sin purificar en 10 kg de gel de sílice para cromatografía en columna manual y se eluyó secuencialmente con 2 volúmenes de columna (16 L) de 100% de hexanos, 10%, 25%, 50% y 75% de EtOAc en hexanos, 100 % de EtOAc, y 10% de EtOAc en MeOH, y se recolectaron un total de 40 fracciones (4 L / fracción). Se secaron las fracciones por medio de un evaporador rotatorio a presión reducida y 25 °C y se probó la actividad por medio del ensayo de beta arrestina de DiscoverX.

Etapa 2 del fraccionamiento: HPLC en fase normal, columna de gel de sílice de 21 x 250, condiciones de elución: 100% de hexanos durante 5 min, 100% de hexanos hasta 100% de EtOAc durante 60 min, 100% de EtOAc durante 10 min, 0 ~ 20% de metanol en EtOAc durante 20 min, con una carga de 1 gramo por columna, 18 corridas por duplicado)

Etapa 3 del fraccionamiento: HPLC en fase normal, columna de gel de sílice de 4,6 x 250, F3 son específicas de EBI2 a partir del nuevo fraccionamiento de la etapa 2 y se reúnen a partir de 18 corridas en paralelo y se somete en la etapa 3 a HPLC en fase normal con diclorometano (DCM) y metanol como disolvente, 5% de DCM durante 5 minutos, 5 ~ 50% de DCM en metanol durante 60 minutos, manteniendo en 50% de DCM durante 20 min).

Etapa 4 del fraccionamiento: cromatografía en columna HPLC en fase inversa C18 (4,6 x 250) cromatografía HPLC columna, resina C18 4,6 x 250 C18, condiciones de elución: 50 - 100% de acetonitrilo (ACN) en H₂O sin modificador TFA, 1 mL / min / fraccionamiento).

Etapa 5 de fraccionamiento: cromatografía en columna HPLC en fase inversa C4 (2,0 x 250), 0,35 mL / min / fracción, eluido a partir de 50% - 100% de ACN/H₂O, durante 2 h)

El análisis por LC-MS de las fracciones activas e inactivas se hizo en un Agilent serie 1200 utilizando HPLC en fase inversa con una columna C4 (2,0 x 50 mm, YMC^{MR} Pro C4, S-5, 120 Å). Parámetros de adquisición de MS: Instrumento: Agilent 6520 Accurate Mass Q-TOF LC / MS. Temperatura del Gas: 350 °C. Gas de secado: 10 L/min. Nebulizador: 45 psig, VCap: 4000 V. Capilaridad: 0.047 µA. Cámara: 0,63 µA. Fragmentador: 175 V. Espumador: 65 V. OCT1 RF Vpp: 750 V. Adquisición del rango de masas: 50 - 1500. Velocidad de adquisición: 1 espectro/s. Masa de referencia: 121,050873 y 922,009798 y (se infundió una solución de referencia durante todo el tiempo de la corrida).

Se eluyeron las muestras a 0,35 mL / min con un gradiente de 30 al 100% de acetonitrilo en H₂O con ácido fórmico al 0,1% como modificador. La columna se mantuvo a 30 °C.

Se identificó una fracción pura con un pico principal a los 9,77 min en un cromatograma total de iones (modo positivo). Se observaron iones con masas m/z 365.3202, 383.3311, 401.3411 y 441.333 en el modo de ion positivo, racionalizado como $M + H - 3 H_2O$, $M + H - 2 H_2O$, $M + H - H_2O$, y $M + Na$. No se observó el $M + H$ en 419,3. Estos datos confirman además y apoyan los hallazgos mostrados anteriormente en la sección 5.9.

- 5 Se compraron 7a,25DHC y 7b,25DHC sintetizados con las fracciones activas obtenidas por fraccionamiento de los extractos de hígado de cerdo como se describió anteriormente. Se analizaron los compuestos sintetizados y las fracciones activas por el tiempo de retención en cromatografía de líquidos y MS / MS (Figura 19). Estos resultados indican que el ligando natural de EBI2 aislado a partir de extractos de hígado de cerdo es 7a,25DHC.

- 10 RMN 1H de 7a,25DHC (Figura 20A) y 7a,25DHC aislados de ligando natural EBI2 (Figura 20B) de hígado de cerdo se analizaron por RMN. La extracción / fraccionamiento a mayor escala de hígado de cerdo (escala 35 Kg) tras el fraccionamiento como se describió anteriormente produjo aproximadamente 100 microgramos del ligando del EBI2 sustancialmente puro. El análisis de RMN 1H confirmó además, que el ligando natural del EBI2 purificado a partir de hígado de cerdo es 7a,25DHC.

5.16 Resultados

- 15 Se identificó que, aparte de la hidroxilación en la posición 3, es necesaria la hidroxilación en la posición 7 y en la posición 25 para la activación potente de EBI2. En la posición 7, se prefiere mucho más la posición axial alfa sobre la posición beta ecuatorial (compuesto 7a,25DHC como se representa en la Fórmula IV y el compuesto 7b,25DHC como se representa en la Fórmula V). Se prefiere la hidroxilación de la cadena lateral en la posición 25, aunque también el compuesto 27 muestra una buena potencia. Se encontró con que el rango del orden de potencia de los diferentes oxisteroles en diferentes ensayos es idéntico (Tabla 3)
- 20

Tabla 3: Caracterización farmacológica de diferentes oxisteroles en la fluorescencia de calcio (FLIPR^{MR}), GTPgS y ensayo de enlazamiento del radioligando.

	FLIPR (nM)		GTPgS (nM)		Enlazamiento de [3H] 7a,25DHC	
	EC50	DE	EC50	DE	IC50(nM)	DE
7a,25DHC	1,9	1,8	7,5	4,0	70,4	4,4
7a,27DHC	4,8	3,7	5,1	1,6	362,0	32,1
7b,25DHC	120,8	53,6	221,0	104,5	2632,0	110,3
7b,27DHC	309,6	261,0	124,8	66,4	>10000	
7aHC	1452,7	1162,5	497,6	266,5	3535,7	430,5
7bHC	>10000		>10000		>10000	
25DHC	3031,5	2644,7	726,7	231,8	>10000	
colesterol	>10000		>10000		>10000	
	n = 3 - 4		n = 3 - 4		n = 3	

- 25 Utilizando [3H]-7a,25DHC se llevaron a cabo experimentos de enlazamiento de saturación utilizando membranas de células CHO que expresan en forma estable EBI2 humano. El enlazamiento de [3H]-7a,25DHC a EBI2 es saturable con alta afinidad ($K_d = 25 \pm 10$ nM ($n = 3$)) y desplazable con el aumento de concentración de 7a,25DHC y otros oxisteroles. Mediante el uso del otro estereoisómero [3H]-7b,25DHC no se pudo detectar el enlazamiento específico a membranas de EBI2 (datos no presentados).

5.17 La activación de EBI2 conduce a la fosforilación en la ruta MAP / ERK

- 30 Las proteína quinasas activadas por mitógeno (MAPK) son proteína quinasas específicas de serina / treonina que

responden a estímulos extracelulares y regulan diversas actividades celulares.

Metodología

5 Se sembraron células (E2 = CHO/AEQ/Gqi5/hEBI2) a razón de 2×10^5 células / pozo en una placa de 12 pozos (TPP # 92012) y se incubaron a 37 °C / 5% de CO₂ durante la noche. Al siguiente día se removió el medio y se mantuvieron las células con inanición en medio libre de suero durante 4 h. Posteriormente se añadió el compuesto durante 5 min a temperatura ambiente antes de lisar las células (70 µl, 0,5% de Triton-X100, NaCl 300 mM, Tris 50 mM pH 7,5, coctel inhibidor de proteasa Complete^{MR} de Roche # 04693124001). Se resolvieron los lisados celulares mediante gradiente de SDS-PAGE (4 - 12% de NuPage^{MR}, caja # NP0322), se transfirieron por transferencia semiseca a nitrocelulosa (Invitrogen, # LC2001) y se sondearon con un mAb de conejo fosfo p42/44 MAPK (T202/Y204) (Señalización Celular # 4376S). Después del tratamiento con un anticuerpo secundario anticonejo-HRP de cabra (Pierce # 41460) se desarrollaron las transferencias por quimioluminiscencia (SuperSignal West Dura^{MR}, Pierce # 34075) y se visualizaron utilizando un sistema de formación de imágenes Gel Doc^{MR} de BioRad.

15 Se probó la línea de células CHO que expresa EBI2 para la fosforilación de MAP / ERK y encontrar que 7a,25DHC y otros oxisteroles de acuerdo con la invención pueden activar potencialmente la ruta de señalización de MAP / ERK mediante fosforilación de p44/42 MAP quinasa (Figura 21). Como control se utilizó la línea celular parental CHO que no expresa EBI2 humano. Incluso altas concentraciones de 7a,25-OHC no activan una señal de MAP / ERK en esta línea celular de control.

5.18 La especificidad de la interacción entre 7a,25DHC y 7a,27DHC con EBI2

20 Hasta ahora se ha observado que los oxisteroles regulan a saber la expresión de genes que participan tanto en el metabolismo de esteroides como de grasas, sirven como sustratos para la síntesis de ácidos biliares, y son compuestos intermedios en la transferencia de esteroides desde la periferia hasta el hígado (Russell, D. W. (2000). Oxysterol biosynthetic enzymes. Biochim. Biophys. Acta 1529, 126 - 135). A fin de evaluar las posibles interacciones de los dos agonistas más potentes de EBI2 (7a,25-OHC y 7a,27-OHC) fueron analizadas en un panel de ensayos del gen reportero contra los siguientes receptores de hormonas nucleares: SXR (NR1I2; ENSG00000144852), ERa (NR3A1; ENSG00000091831), FXRa (NR1H4; ENSG00000012504), GR (NR3C1; ENSG00000113580), LXRa (NR1H3; ENSG00000025434), PPARg (NR1C3; ENSG00000132170), RXRa (NR2B1; ENSG00000078380). Se encontró que ninguno de estos dos oxisteroles activaron los receptores de hormonas nucleares antes mencionados, en concentraciones de hasta 10 µM. También se evaluaron los mismos dos compuestos en un panel de seguridad utilizado rutinariamente para la evaluación de compuestos durante el desarrollo de fármacos. Esto incluyó ensayos de enlazamiento para 26 GPCR diferentes, ensayos funcionales de 9 GPCR diferentes, 40 ensayos de quinasa, así como ensayos de canales iónicos seleccionados, proteasas, transportadores y de enzimas. En ninguno de estos análisis se observó una interacción significativa ya sea entre 7a,25DHC o 7a,27DHC y el socio a prueba (datos no mostrados)

5.19 El oxisterol 7a,25DHC actúa como quimioatrayente para las células inmunes.

35 Metodología

40 Se llevaron a cabo ensayos de quimiotaxis en placas de 96 pozos MultiScreen-MIC^{MR} con filtros de policarbonato de 5 µm de poro (Millipore # MAMI C5S10). Se elaboraron suspensiones de células y se hicieron las diluciones de quimiocina en RPMI 1640 con glutamax^{MR} (Invitrogen, # 61870 - 010) suplementada con 1% de aminoácidos no esenciales (Invitrogen, # 11140-035), piruvato de sodio (Invitrogen, # 11360-039), penicilina / estreptomina (Invitrogen, # 15140-114), β-mercaptoetanol 50 µM (Invitrogen, # 31350-010) y 0,5% de BSA (Gibco # 15260).

45 Se lavaron células B (RS 11846 o células B humanas infectadas con EBV) o células dendríticas derivadas de médula ósea de murino una vez con medio y se resuspendieron a razón de 1×10^6 / ml. Se añadieron 100 µl de esta suspensión en los pozos de la placa filtrante y se colocó suavemente en la placa receptora que contiene 150 µl de una dilución dada del compuesto. La concentración final de DMSO fue menor del 0,1%. Después de la migración durante 3 horas a 37 °C en una incubadora, se removió cuidadosamente la placa filtrante de la placa receptora y se descartó. Las células que migraron a la placa receptora fueron resuspendidas y transferidas a placas de 96 pozos de fondo redondo, se centrifugaron y se resuspendieron en 100 µl de PBS que contenía 2% de FCS y 0,1% de NaN₃ (amortiguador FACS). Las celdas de entrada (100 µl) se procesaron de manera similar. Para el cálculo de la migración específica, se añadió un número fijo de perlas (10000; Invitrogen # PCB100) en 20 µl de amortiguador FACS y se analizó la suspensión por citometría de flujo utilizando un instrumento para FACS PAS^{MR} (Partec). Se identificaron las células en función de su dispersión hacia delante (FSC) y el patrón de dispersión lateral (SSC). La quimiotaxis se expresa ya sea como el número total de células o como porcentaje de las células de entrada.

Los arreglos de expresión de ADN de células B en diferentes etapas de su ciclo de vida muestran un perfil distinto de expresión de EBI2 (Figura 22 A y B). Si bien existe una expresión clara de EBI2 en células B intactas, las células

B de los centros germinales de los ganglios linfáticos subregulan fuertemente la expresión de EB12 (Gatto, D., et al. (2009) Guidance of B Cells by the Orphan G Protein-Coupled Receptor EB12 Shapes Humoral Immune Responses. *Immunity* 31[2], 259-269; Pereira, J. P., et al. (2009) EB12 mediates B cell segregation between the outer and centre follicle. *Nature*, 460). Una vez que se ha completado la maduración de afinidad y las células B se transforman en células B plasmáticas o células B de memoria, se eleva nuevamente la expresión EB12 (Figura 20A y B). Este patrón es el mismo para subconjuntos de células B humanas y de ratón (Longo, N. S., et al. (2009). Analysis of somatic hypermutation in X-linked hyper-IgM syndrome shows specific deficiencies in mutational targeting. *Blood* 113, 3706 - 3715; Luckey, C. J., et al. (2006). Memory T and memory B cells share a transcriptional program of self-renewal with long-term hematopoietic stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103, 3304 - 3309).

10 EB12 ha sido identificado inicialmente por su sobreexpresión en las células B infectadas con el virus de Epstein-Barr (Birkenbach 1993). Mediante la realización de un experimento de FACS (clasificación de células activada por fluorescencia) usando un anticuerpo monoclonal anti-EB12 (Euroscreen) se encontró que esta línea de células B humanas infectadas con EBV expresa altos niveles de EB12 en la superficie celular.

Metodología para la generación de linfocitos B periféricos transformados con EBV.

15 Se prepararon linfocitos B periféricos humanos (PBL) se prepararon a partir de sangre periférica como una suspensión de células por centrifugación en una placa de Ficoll. Se enjuagaron los PBL en PBS y se resuspendieron en medio RPMI 1640 completo (10% de FCS y antibióticos) en una concentración de 2×10^7 / célula / ml. Se dividieron las células en alícuotas de 500 μ l y se sembraron en placas de 24 pozos. A cada pozo (10^7 PBL), se le añadieron 500 μ l de los sobrenadantes de la línea celular B95-8 (que contenían el virus de Epstein Barr). La línea celular B95-8 es una línea celular utilizada para producir EBV (American Type Culture Collection, Cat. CRL-1612). Se añadieron 0,8 μ g / ml de ciclosporina A (CsA) a cada pozo. Se alimentan las células una vez a la semana mediante el intercambio de alrededor de la mitad del medio con uno fresco que contenía 0,8 μ g / ml de CsA. Este tratamiento se repite por más de 3 semanas hasta que grupos de células en crecimiento son visibles. Se transfieren grupos individuales a matraces de cultivo pequeños y se expanden adicionalmente las células transformadas. La mayoría de las células transformadas son de un linaje de células B. Se congelan alícuotas de células tan pronto como las células están creciendo bien. Se descongelan alícuotas congeladas (1 ml, alrededor de 10^7 células) y se diluyen en RPMI 1640, 10% de FCS, 50 μ g / ml de gentamicina y se pasan por dilución de 1/4 a 1/8.

20 Se encontró que 7a,25DHC puede atraer poderosamente estas células B infectadas con EBV en un sistema de ensayo de transferencia entre pozos. Como control, la concentración de 7a,25DHC fue idéntica en ambos compartimentos (Figura 23).

25 En una segunda serie de experimentos se probó una línea celular pre B de linfoma de Burkitt llamada RSL 1846 (proporcionada por el Dr. John C. Reed, del Instituto Burnham de Investigaciones Médicas, La Jolla, EUA; Gauwerky, C. E., et al. (1988). Pre-B-cell leukemia with a t (8; 14) and a t (14; 18) translocation is preceded by follicular lymphoma. *Oncogene* 2, 431 - 435; Reed, J. C. et al. (1993). Somatic point mutations in the translocated bcl-2 genes of non-Hodgkin's lymphomas and lymphocytic leukemias: implications for mechanisms of tumor progression. *Leuk. Lymphoma* 10, 157 - 163). La inspección de los datos de la matriz de ADN (BioGPS) indica que esta línea celular tiene altos niveles de expresión de EB12 endógeno.

30 Se encontró que 7a,25DHC puede atraer en forma potente las células RSL 1846 y que esta atracción puede ser bloqueada por la toxina pertussis, un reactivo que bloquea la señalización de receptores acoplados a Gai por ADP-ribosilación de la subunidad Gai. Al igual que las quimoquinas clásicas, se encontró una curva de actividad en forma de campana que indica una atracción reducida con concentraciones altas de compuestos (Figura 24 A y B).

35 También se llevaron a cabo experimentos de migración celular de las células RSL 1846 con un conjunto de diferentes oxisteroles. Los resultados (Figura 25) muestran una clara correlación entre la potencia de diferentes oxisteroles en la atracción de células RSL 1846 y la potencia de estos compuestos en ensayos basados en células para la activación funcional de EB12 (FLIPR, GTPgS) o ensayos de enlazamiento de radioligandos de EB12 (véase la Tabla 3).

La quimioatracción mediada por oxisterol no se limita a las células B, sino que también se observa con otras células inmunes que expresan EB12. El análisis de la expresión de ARN mensajero de diferentes células inmunes humanas indicó que células dendríticas mieloides y plasmacitoides expresan en forma elevada EB12 (Figura 26).

40 Con el fin de generar un número suficiente de células dendríticas (DC) se aisló médula ósea de ratones de tipo silvestre y deficientes en EB12 (Deltagen) y se los trató en cultivo durante 7 - 8 días con IL4 de murino y GM-CSF de murino. Mediante el uso de este protocolo, se puede generar una población homogénea de células dendríticas. Se encontró que aunque las DC de animales de tipo silvestre migran hacia 7a,25DHC, las DC de ratones EB12(-/-) no migran hacia 7a,25DHC. Este resultado demuestra que las propiedades quimiotácticas de 7a,25DHC están mediadas por EB12 (Figura 27).

Desafío inmunológico de ratones (-/-) que no expresan genes objetivo para EBI2

Identificación de las propiedades quimioatrayentes de oxisteroles sobre las células inmunes sugiere que la ablación de EBI2 tendrá un impacto en el tráfico adecuado de células que expresan EBI2 bajo diversas condiciones fisiológicas. Por lo tanto, se desafiaron ratones EBI2(-/-) y de tipo silvestre con nitro-fenil gamma globulina de pollo (NP-CGG) y alumbre.

5

Inmunización de ratones EBI2 (-/-), y de tipo silvestre con nitro-fenil gamma globulina (NP-CGG)

Metodología

Después del sangrado previo de NP-CGG, se llevó a cabo la inmunización de ratones que no expresan genes objetivo para EBI-2 o compañeros de camada mediante la inyección en forma intraperitoneal de 200 µl de 50 µg de NP(15)-CGG (Biosearch Technologies, Inc.; # N-5055) en Alum (Serva; # 12261). Siete días después de eso, se recogió suero y se analizaron IgG1 e IgM específicos de NP en ELISA.

10

Medición por ELISA de inmunoglobulinas específicas de nitrofenilo

Se llevó a cabo un ELISA de anti-NP de IgG1 e IgM mediante el recubrimiento de placas de 96 pozos (Costar; # 9018) con 10 µg ml⁻¹ de NP (23) BSA (Biosearch Technologies, Inc.; # N-5050) en PBS (Gibco; # 14040-091) durante la noche a temperatura ambiente, y se bloquearon con PBS / 1% de BSA / 0,05% de Tween 20 durante 1 h a temperatura ambiente. Se diluyeron en forma serial las muestras de suero (1:3) a partir de 1:50 en PBS / 1% de BSA / 0,05% de Tween 20 (= amortiguador de reactivo) por duplicado y se incubaron durante 2 h a 25 °C, y se detectaron IgG1 e IgM que se enlazan a NP utilizando IgG1 antirratón de rata conjugado con biotina (Zymed; # 04-6140) o IgM antirratón de cabra conjugado con biotina (Southern Biotech; # 1020-1008), seguido por estreptavidina conjugada con europio (Wallac; # 1244-360). Después de cada etapa de incubación, se lavaron las placas 6 veces con PBS / 0,05% de Tween 20. Para la medición se añadió Solución de Refuerzo^{MR} de emisión de luz relacionada con europio (Wallac; # 1244-105) y se midieron las placas en un dispositivo Victor 2^{MR} (contador 1420 Multilabel de Wallac), utilizando el programa de Europio por defecto. Se calcularon los títulos de IgG1 e IgM específicos de NP mediante la determinación de los títulos a 50% máx., grupos promediados, y mostrados como la media de los títulos a 50% max. +/- la desviación estándar. y la mediana. Siete días después del desafío inmune se midieron los niveles de inmunoglobulina. Si bien no hay alteración en el nivel de expresión de IgM (Figura 28A), se encontró una respuesta de IgG1 mitigada ya que los ratones EBI2 (-/-) sólo producen alrededor de la mitad del título en comparación con los animales de tipo silvestre (Figura 28B).

15

20

25

5.20 Resultados

Nuestros hallazgos proporcionan un enlace no anticipado entre los resultados recientes que han identificado un papel crucial para EBI2 en la promoción de la localización de células B dentro de los órganos linfoides (Pereira, J. P., et al. (2009) EBI2 mediates B-cell segregation between the outer and centre follicle. *Nature* 460 [7259], 1122 - 1; Gatto, D., et al (2009) Guidance of B Cells by the Orphan G Protein-Coupled Receptor EBI2 Shapes Humoral Immune Responses. *Immunity* 31 [2], 259 - 269) y los experimentos que identifican los mecanismos por medio de los cuales los oxisteroles dan forma a la respuesta inmune adaptativa (Bauman, D.R., et al., (2009). 25-Hydroxycholesterol secreted by macrophages in response to Toll-like receptor activation suppresses immunoglobulin A production. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 106, 16764 - 16769; Diczfalusy, U., et al. (2009). Marked up-regulation of cholesterol 25-hydroxylase expression by lipopolysaccharide. *J. Lipid Res*, en prensa) y establecer una nueva dimensión fisiológica de estas moléculas bioactivas de señalización.

35

40

REIVINDICACIONES

1. Un método de / para identificar un modulador de la interacción entre el 7,25 DHC y / o 7,27 DHC y / o 7HC y / o 25HC con EB12, cuyo método comprende;
- (a) proporcionar un modulador candidato;
- 5 (b) incubar el modulador de la etapa (a) con 7,25DHC y / o 7,27DHC y / o 7HC y / o 25HC y EB12,
- (c) determinar si la interacción entre el 7,25DHC y / o 7,27DHC y / o 7HC y / o 25HC con EB12 es modulada en presencia de dicho modulador candidato en comparación con la interacción entre 7,25DHC y / o 7,27DHC y / o 7HC y / o 25HC con EB12 en ausencia de dicho modulador candidato,
- en donde
- 10 7,25DHC es colest-5-eno-3b, 7,25-triol;
- 7,27DHC es colest-5-eno-3b, 7,27-triol;
- 7HC es colest-5-eno-3b, 7-diol;
- 25HC es colest-5-eno-3b, 25-diol; y
- EB12 es el receptor 2 inducido por el virus de Epstein-Barr.
- 15 2. El método de la reivindicación 1, en el que se identifica un modulador de la interacción entre 7a,25DHC y / o 7b,25DHC y / o 7a,27DHC y / o 7b,27DHC y / o 7aHC y / o 7bHC y / o 25HC y EB12.
3. El método de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que dicho modulador de la interacción entre el 7,25DHC y / o 7,27DHC y / o 7HC y / o 25HC con EB12 humano es un inhibidor de dicha interacción.
- 20 4. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 - 3, en el que dicho modulador se puede utilizar para el tratamiento de una enfermedad humana o trastorno sensible a la modulación de la interacción entre 7a,25DHC y / o 7b,25DHC y / o 7a,27DHC y / o 7b,27DHC y / o 7aHC y / o 7bHC y / o 25HC y EB12.
5. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 - 3, en el que dicho modulador se puede utilizar para el tratamiento profiláctico de un enfermedad humana o trastorno sensible a la modulación de la interacción entre 7,25DHC y / o 7,27DHC y / o 7HC y / o 25HC con EB12.
- 25 6. El método de la reivindicación 4 o la reivindicación 5, en el que la enfermedad o el trastorno se selecciona del grupo que consiste de: hipertensión, angina de pecho, aterosclerosis, insuficiencia cardiaca congestiva, accidente cerebrovascular, obesidad, síndrome metabólico, enfermedades autoinmunes tales como artritis, (artritis reumatoide especialmente) y lupus, afecciones atópicas tales como asma y dermatitis atópica, EPOC, hipertensión pulmonar, infecciones virales tales como EBV, VIH, hepatitis (A o C), enfermedad de hígado graso, cirrosis hepática (cirrosis hepática inducida particularmente por el alcohol), cáncer, dislipidemia, diabetes (especialmente de tipo II), rechazo de trasplante, síndrome de intestino irritable, enfermedad inflamatoria del intestino, enfermedades de inflamación crónica, alergia, psoriasis, fibrosis quística, hipercolesterolemia, enfermedad renal, esclerosis múltiple.
- 30 7. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que dicho modulador se selecciona del grupo que consiste de: una pequeña entidad química, anticuerpo, Adnectina, Anquirina, Maxybody / Avimero, Affibody, Anticalina, Affilina, oligonucleótidos antisentido, y ARN pequeño de interferencia (ARNpi).
- 35 8. El método de la reivindicación 7, en el que dicho modulador es un anticuerpo o fragmento de anticuerpo.
9. El método de la reivindicación 8, en el que dicho anticuerpo comprende una región constante humana.
10. El método de las reivindicaciones 8 o 9, en el que dicho anticuerpo tiene un isotipo de IgG (por ejemplo, IgG1 o IgG4).
- 40 11. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, en el que dicho anticuerpo es quimérico, humano o humanizado.

12. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11, en el que dicho anticuerpo es un fragmento de anticuerpo seleccionado de entre el grupo que consiste de: Fab, Fab', F(ab)2, Fv, ScFv, dominio VH, dominio VHH.

13. El método de la reivindicación 7, en el que dicho modulador es un oligonucleótido antisentido o ARNpi que inhibe la expresión de la proteína EB12.

Figura 1

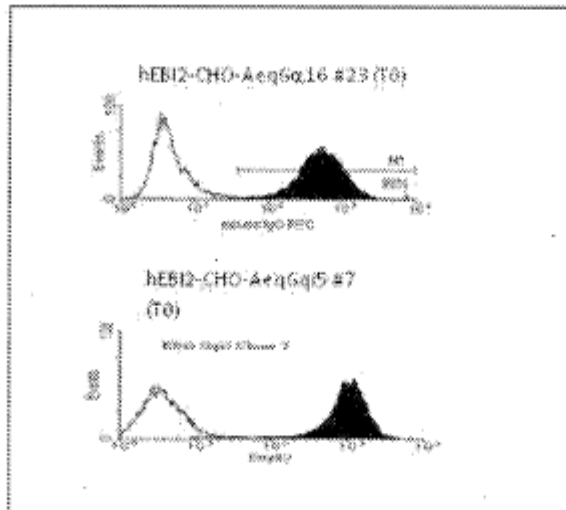


Figura 2

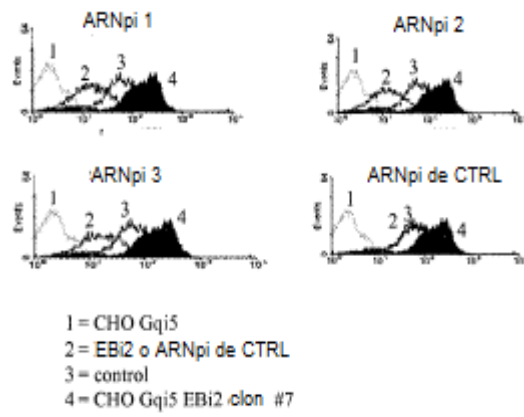


Figura 3

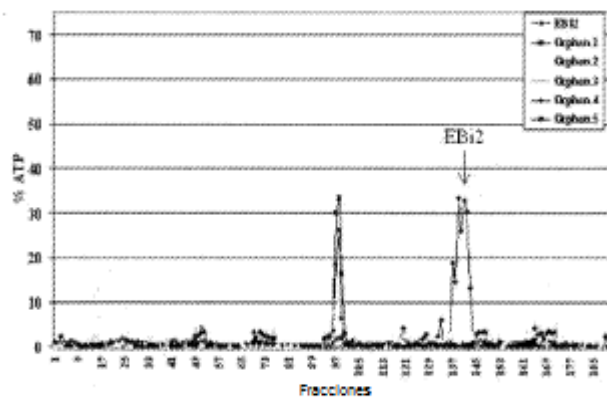


Figura 4

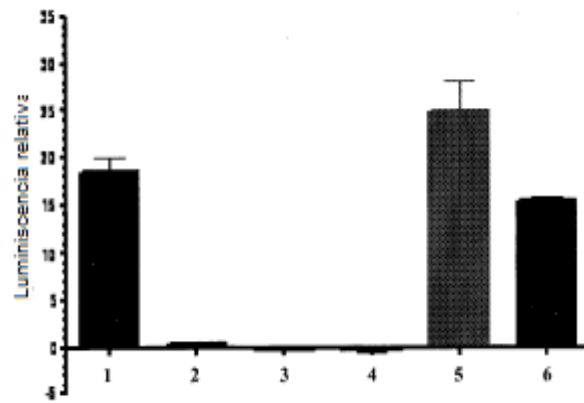


Figura 5

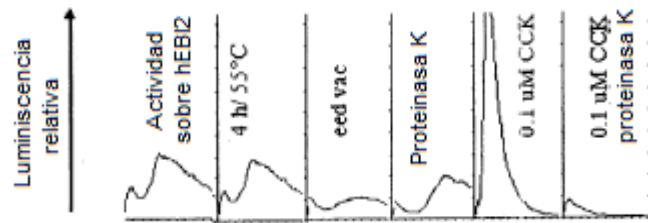


Figura 6

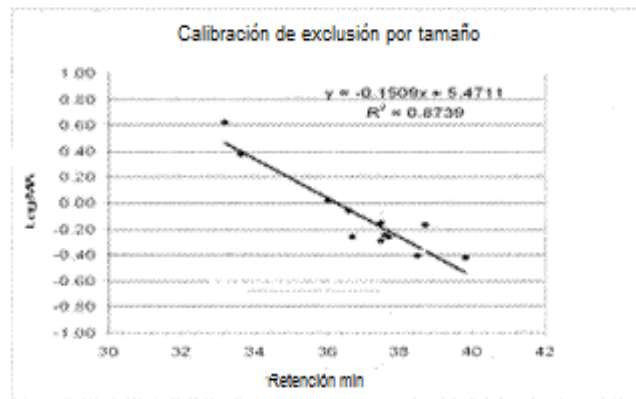


Figura 7

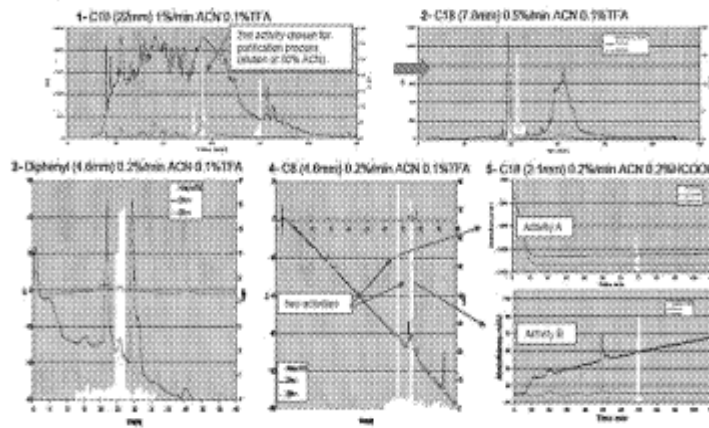


Figura 8

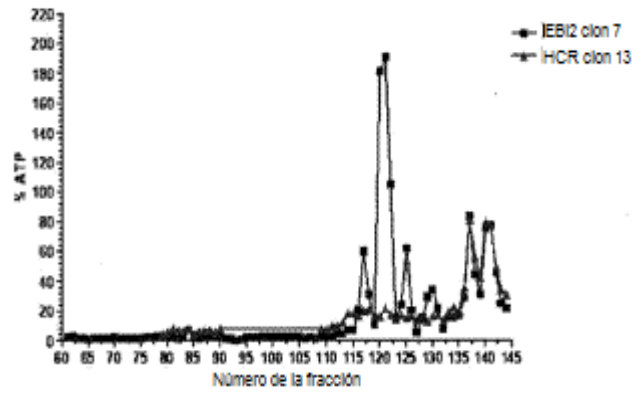
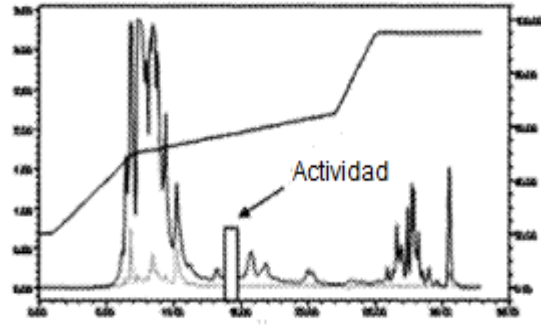
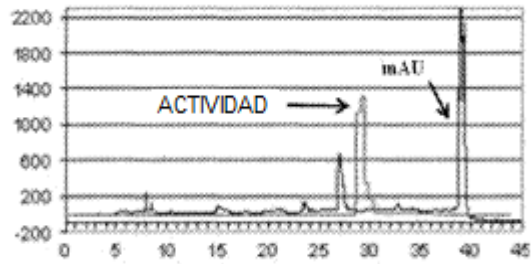


Figura 9

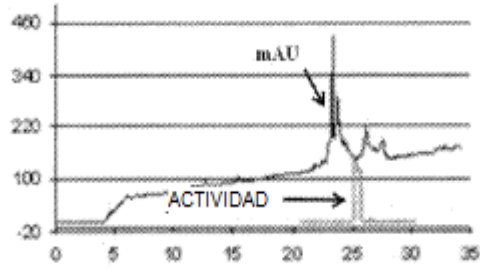
A



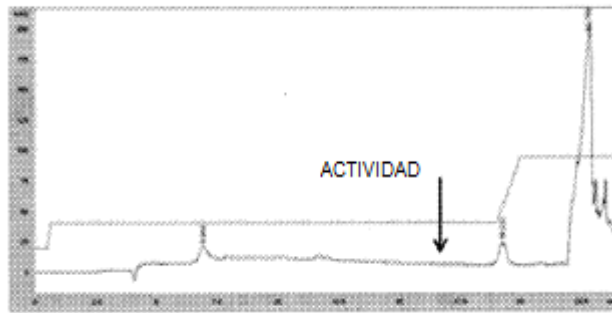
B



C



D



E

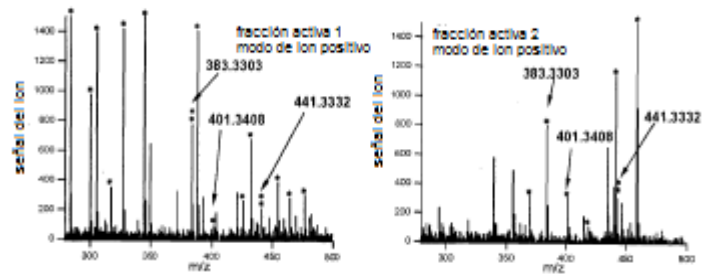


F



Figura 10

Modo de ion positivo:



Modo de ion negativo:

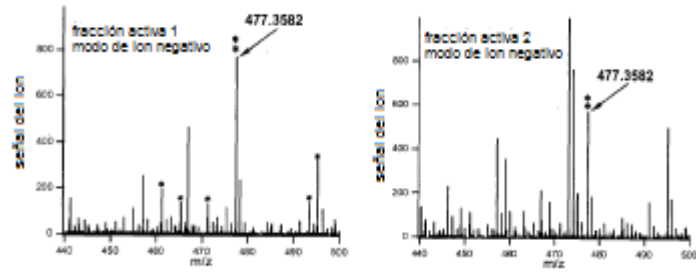


Figura 11

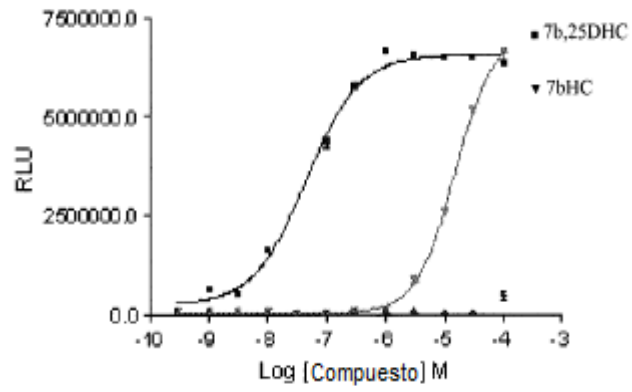


Figura 12

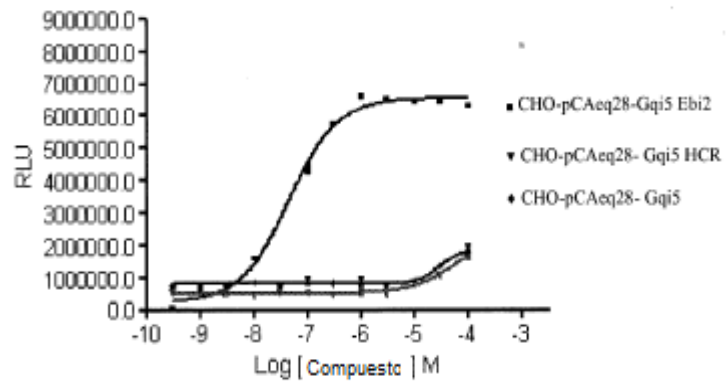


Figura 13

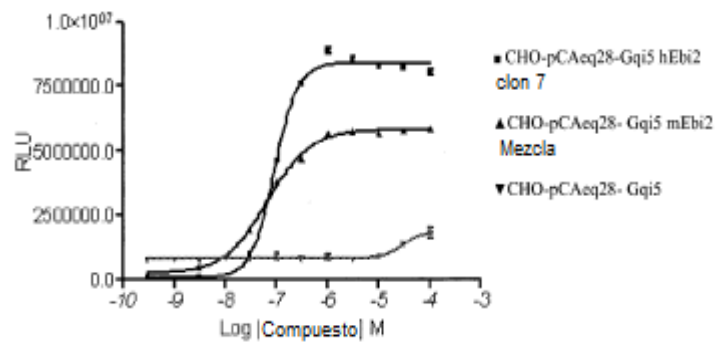


Figura 14

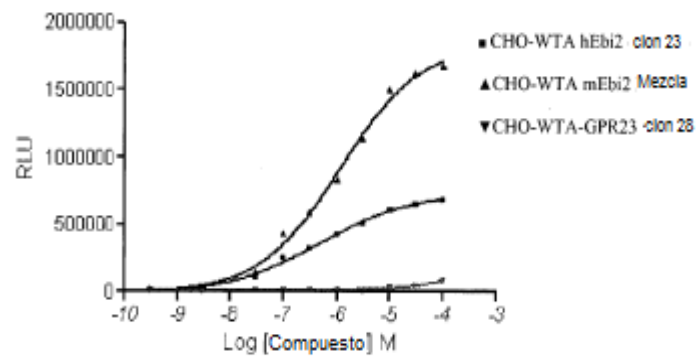


Figura 15

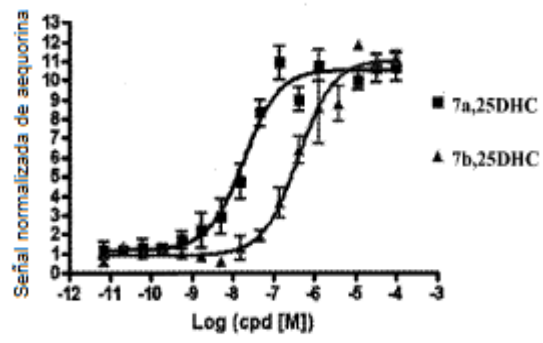


Figura 16

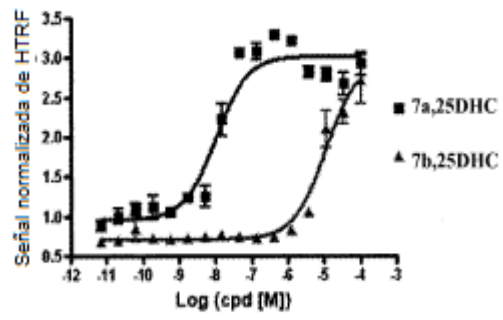


Figura 17

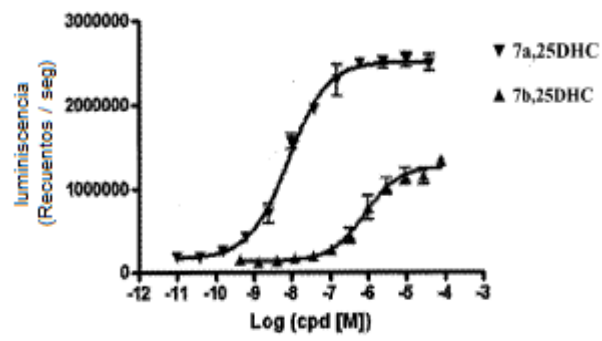
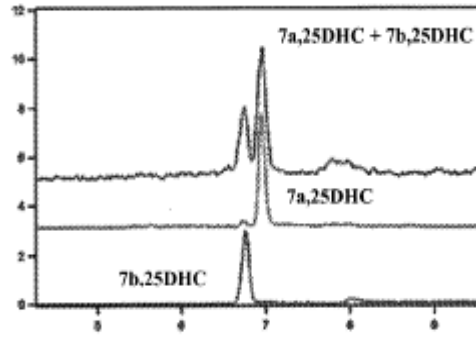


Figura 18

A
 LC-MS/MS de estereoisómeros 7,25DHC (Compuestos de referencia)



B

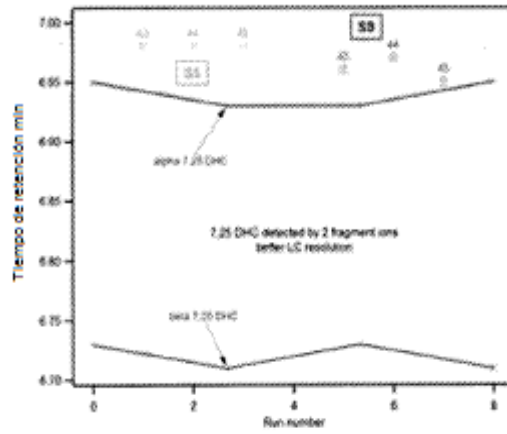


Figura 19

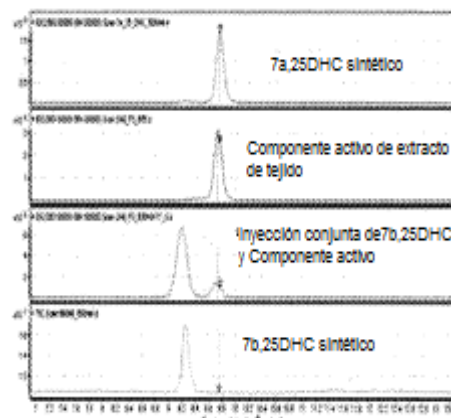


Figura 20

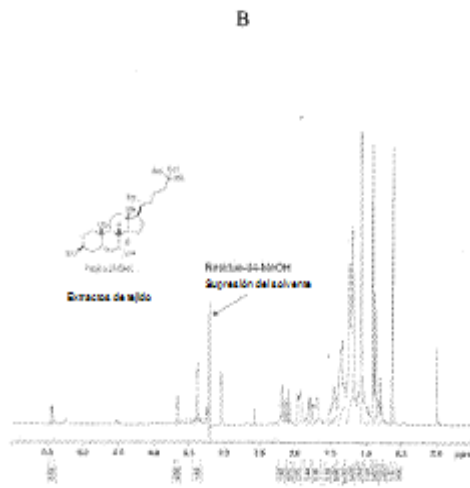
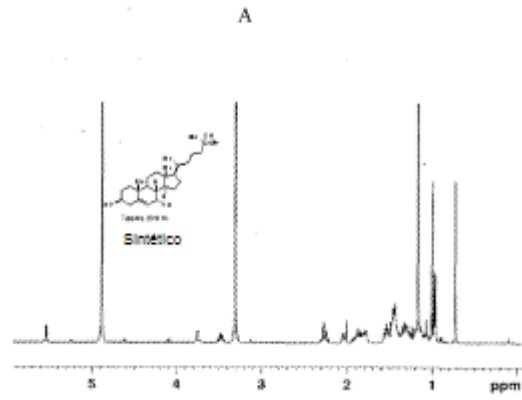


Figura 21

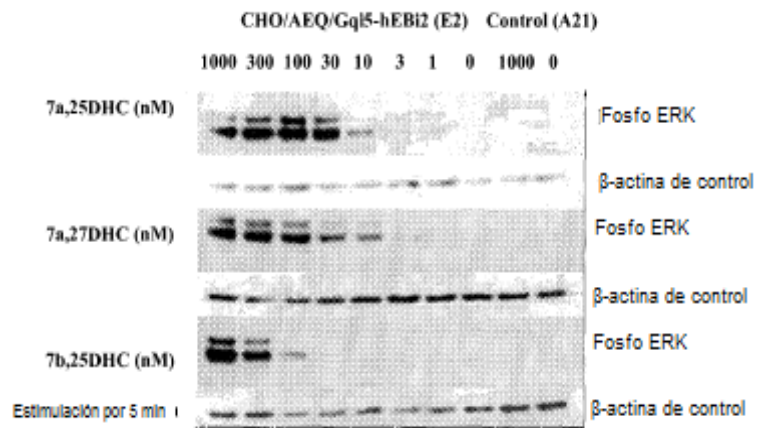


Figura 22

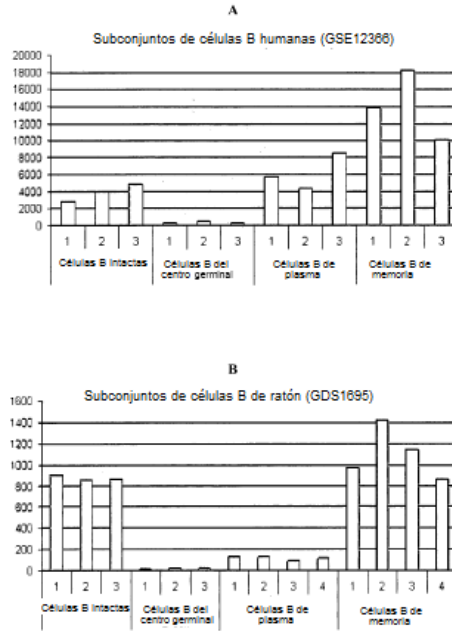


Figura 23

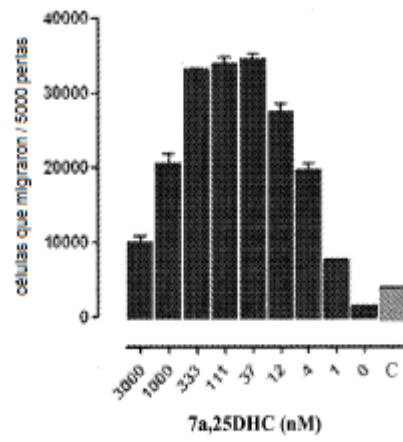


Figura 24

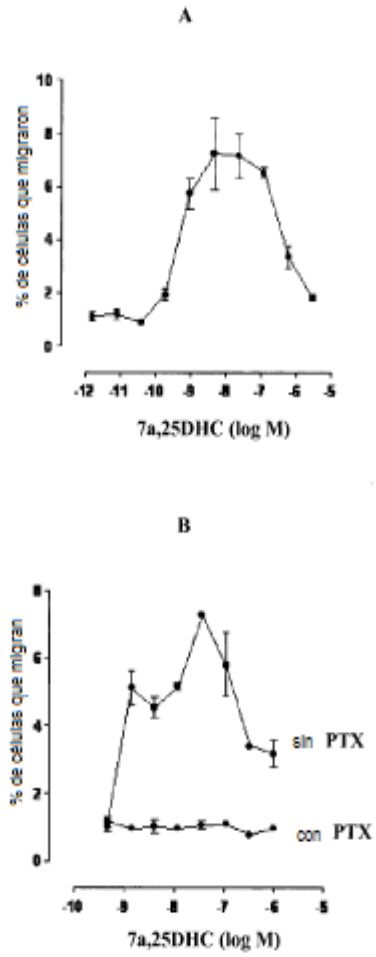


Figura 25

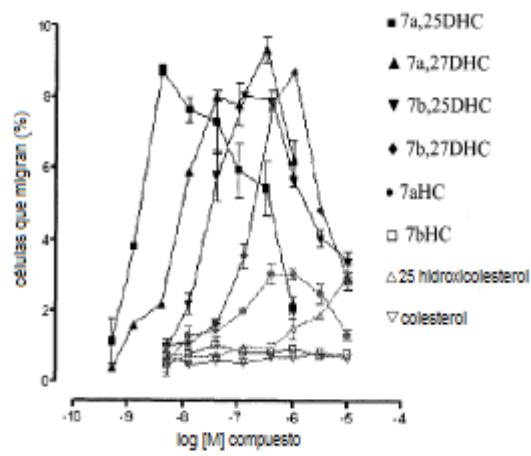


Figura 26

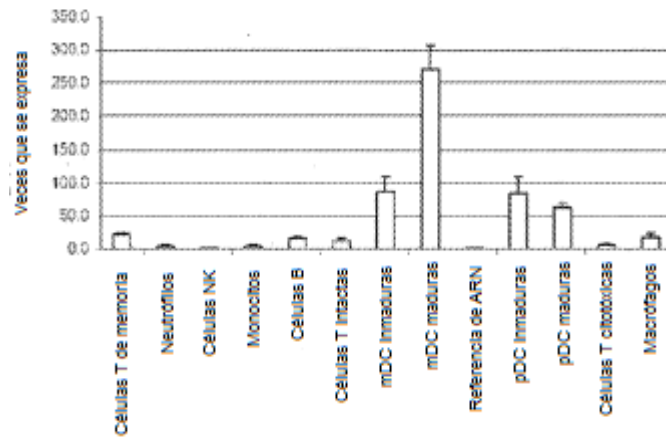


Figura 27

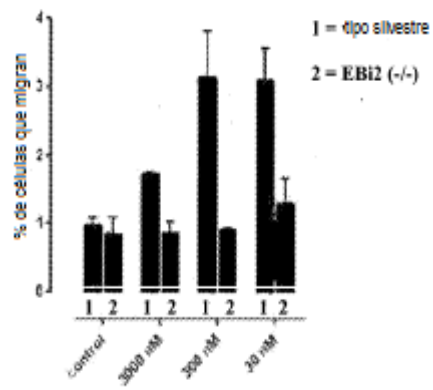


Figura 28

