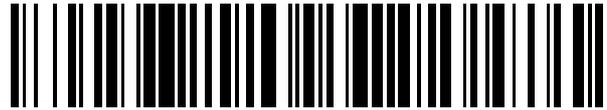


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 462 545**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/566** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.12.2003 E 07020473 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.02.2014 EP 1949901**

54 Título: **Un procedimiento para la determinación de un agonista colinérgico selectivo para un receptor alfa7 nicotínico**

30 Prioridad:

**06.12.2002 US 431650 P**

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

**23.05.2014**

73 Titular/es:

**THE FEINSTEIN INSTITUTE FOR MEDICAL  
RESEARCH (100.0%)  
350 COMMUNITY DRIVE  
MANHASSET, NY 11030, US**

72 Inventor/es:

**TRACEY, KEVIN, J. y  
WANG, HONG**

74 Agente/Representante:

**FÀBREGA SABATÉ, Xavier**

**ES 2 462 545 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

Un procedimiento para la determinación de un agonista colinérgico selectivo para un receptor  $\alpha 7$  nicotínico.

## ANTECEDENTES DE LA INVENCION

- 5 Los vertebrados consiguen la homeostasia interna durante una infección o lesión equilibrando las actividades de las rutas proinflamatorias y antiinflamatorias. Sin embargo, en muchos estados patológicos, esta homeostasia interna se desequilibra. Por ejemplo, la endotoxina (lipopolisacárido, LPS) producida por todas las bacterias gram-negativas activa los macrófagos para liberar citocinas que son potencialmente mortales (Tracey *et al.*, 1986; Wang *et al.*, 1999; Nathan, 1987; Dinarello, 1994).
- 10 La inflamación y otros estados perjudiciales (tales como choque séptico producido por la exposición a la endotoxina) están inducidos con frecuencia por citocinas proinflamatorias, tales como el factor de necrosis tumoral (TNF; también conocido como TNF $\alpha$  o caquectina), interleucina (IL)-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-18, interferón- $\gamma$ , factor activador de las plaquetas (PAF), factor inhibidor de la migración de macrófagos (MIF) y otros compuestos (Thompson, 1998). Otros determinados compuestos, por ejemplo, proteína 1 del grupo de alta movilidad (HMG-1), se inducen durante diversos estados tales como sepsis y también pueden servir como citocinas proinflamatorias (publicación PCT WO 00/47104). Estas citocinas proinflamatorias se producen por varios tipos celulares diferentes, de la manera más importante por las células inmunitarias (por ejemplo monocitos, macrófagos y neutrófilos), pero también células no inmunitarias tales como fibroblastos, osteoblastos, células del músculo liso, células epiteliales y neuronas (Zhang y Tracey, 1998). Las citocinas proinflamatorias contribuyen a diversos trastornos, en particular sepsis, a través de su liberación durante una cascada de citocinas inflamatorias.
- 15
- 20 Las cascadas de citocinas inflamatorias contribuyen a características perjudiciales, incluyendo la inflamación y la apoptosis (Pulkki, 1997), de numerosos trastornos. Se incluyen trastornos caracterizados por reacciones tanto localizadas como sistémicas, incluyendo, sin limitación, enfermedades que implican el tracto gastrointestinal y tejidos asociados (tales como apendicitis, úlceras pépticas, gástricas y duodenales, peritonitis, pancreatitis, colitis ulcerosa, colitis pseudomembranosa, aguda e isquémica, diverticulitis, epiglotitis, acalasia, colangitis, enfermedad celíaca, colecistitis, hepatitis, enfermedad de Crohn, enteritis y enfermedad de Whipple); enfermedades y estados inflamatorios locales o sistémicos (tales como asma, alergia, choque anafiláctico, enfermedad por complejos inmunitarios, isquemia de un órgano, lesión por reperfusión, necrosis de un órgano, rinitis alérgica primaveral, sepsis, septicemia, choque endotóxico, caquexia, hiperpirexia, granuloma eosinófilo, granulomatosis y sarcoidosis); enfermedades que implican el aparato genitourinario y tejidos asociados (tales como aborto séptico, epididimitis, vaginitis, prostatitis y uretritis); enfermedades que implican el aparato respiratorio y tejidos asociados (tales como bronquitis, enfisema, rinitis, fibrosis quística, síndrome de dificultad respiratoria del adulto, neumonía, silicovulcanoconiosis neumoultramicroscópica, alveolitis, bronquiolitis, faringitis, pleuresía y sinusitis); enfermedades que surgen de la infección por diversos virus (tales como influenza, virus respiratorio sincitial, VIH, virus de la hepatitis B, virus de la hepatitis C y herpes), bacterias (tales como bacteriemia diseminada, dengue), hongos (tales como candidiasis) y parásitos protozoarios y multicelulares (tales como malaria, filariasis, amebiasis y quistes hidatídicos); enfermedades y estados dermatológicos de la piel (tales como quemaduras, dermatitis, dermatomiositis, quemadura solar, urticaria, verrugas y ronchas); enfermedades que implican el sistema cardiovascular y tejidos asociados (tales como vasculitis, angitis, endocarditis, arteritis, aterosclerosis, tromboflebitis, pericarditis, miocarditis, isquemia miocárdica, insuficiencia cardíaca congestiva, periarteritis nudosa y fiebre reumática); enfermedades que implican el sistema nervioso central o periférico y tejidos asociados (tales como la enfermedad de Alzheimer, meningitis, encefalitis, esclerosis múltiples, infarto cerebral, embolia cerebral, síndrome de Guillame-Barre, neuritis, neuralgia, lesión de la médula espinal, parálisis y uveítis); enfermedades de los huesos, las articulaciones, los músculos y tejidos conjuntivos (tales como las diversas artritis y artralgiás, osteomielitis, fascitis, enfermedad de Paget, gota, enfermedad periodontal, artritis reumatoide y sinovitis); otros trastornos autoinmunitarios e inflamatorios (tales como miastenia grave, tiroiditis, lupus eritematoso sistémico, síndrome de Goodpasture, síndrome de Behcet, rechazo de aloinjerto, enfermedad de injerto contra huésped, diabetes tipo I, espondilitis anquilosante, enfermedad de Berger, diabetes tipo I, espondilitis anquilosante, enfermedad de Berger y síndrome de Retier); así como diversos cánceres, tumores y trastornos proliferativos (tales como enfermedad de Hodgkin); y, en cualquier caso, la respuesta inmunitaria o inflamatoria del huésped frente a cualquier enfermedad primaria (Gattorno *et al.*, 2000; Yeh y Schuster, 1999; McGuinness *et al.*, 2000; Hsu *et al.*, 1999; Prystowsky y Rege, 1997; Kimmings *et al.*, 2000; Hirano, 1999; Lee *et al.*, 1995; Wasserman *et al.*, 2000; Katagiri *et al.*, 1997; Bumgardner y Orosz, 1999; Dibbs *et al.*, 1999; Blum y Miller, 1998; Blackwell y Christman, 1996; Fox, 2000; Carteron, 2000; Hommes y van Deventer, 2000; Gracie *et al.*, 1999; Kanai *et al.*, 2001; Jander y Stoll, 2001; Watanabe *et al.*, 1997; Rayner *et al.*, 2000; Amrani *et al.*, 2000).
- 30
- 35
- 40
- 45
- 50
- 55 Los mamíferos responden a la inflamación producida por las cascadas de citocinas inflamatorias en parte a través de la regulación por el sistema nervioso central. Esta respuesta se ha caracterizado en detalle con respecto a mecanismos de respuesta humoral sistémica durante las respuestas inflamatorias a endotoxina (Besedovsky *et al.*, 1986; Woiciechowsky *et al.*, 1998; Hu *et al.*, 1991; Lipton y Catania, 1997). En un grupo de respuestas, se activan

5 fibras aferentes del nervio vago por la endotoxina o citocinas, estimulando la liberación de respuestas antiinflamatorias humorales a través de la liberación de la hormona glucocorticoide (Watkins y Maier, 1999; Sternberg, 1997; Scheinman *et al.*, 1995). El trabajo previo dilucidó un papel de la señalización del nervio vago como un componente crítico en el asa aferente que modula las respuestas de fiebre y adrenocorticotropina frente a citocinemia y endotoxemia sistémicas (Gaykema *et al.*, 1995; Fleshner *et al.*, 1998; Watkins *et al.*, 1995; Romanovsky *et al.*, 1997).

10 Otro grupo de respuestas es a través de la señalización del nervio vago eferente, denominada la "ruta antiinflamatoria colinérgica" (Borovikova *et al.*, 2000). La estimulación del nervio vago eferente atenúa las respuestas inflamatorias sistémicas e inhibe la liberación de TNF (íd.; Bernik *et al.*, 2002; Tracey *et al.*, 2001; solicitud de patente estadounidense número 09/855.446). La acetilcolina, el principal neurotransmisor del nervio vago, atenúa la síntesis de citocinas por macrófagos mediante la señalización a través de receptores nicotínicos de acetilcolina sensibles a  $\alpha$ -bungarotoxina, pero se desconoce la identidad del receptor de macrófagos esencial.

15 Los receptores nicotínicos de acetilcolina son una familia de canales iónicos pentaméricos, controlados por ligando. En los seres humanos, se han identificado 16 subunidades diferentes ( $\alpha$ 1-7,  $\alpha$ 9-10,  $\beta$ 1-4,  $\delta$ ,  $\nu$ arepsilon y  $\gamma$ ) que forman un gran número de receptores homo y heteropentaméricos con propiedades estructurales y farmacológicas diferenciadas (Lindstrom, 1995; Leonard y Bertrand, 2001; Le Novere y Changeux, 1995). La principal función conocida de esta familia de receptores es transmitir señales para el neurotransmisor acetilcolina en las uniones neuromusculares y en los sistemas nervioso central y periférico (Lindstrom, 1995; Leonard y Bertrand, 2001; Le Novere y Changeux, 1995, Marubio y Changeux, 2000; Steinlein, 1998). El trabajo previo indicó la presencia de receptores nicotínicos sensibles a  $\alpha$ -bungarotoxina en macrófagos primarios humanos (Borovikova *et al.*, 2000), pero se desconoce la identidad de la subunidad del receptor específica.

20 El conocimiento del receptor nicotínico particular que es responsable de inhibir la inflamación sería útil para identificar agonistas específicos del receptor que inhibirían la inflamación. Es probable que tales agonistas tengan menos efectos secundarios que los agonistas identificados actualmente que son relativamente inespecíficos. También se facilitaría la identidad de otros efectos fisiológicos influenciados por el receptor antiinflamatorio.

25

## DESCRIPCIÓN DE LA TÉCNICA RELACIONADA

### Referencias citadas

- Amrany, Y. *et al. Respir. Res.* 1:49-53 (2000).
- 30 Bernik, T. R. *et al.* "Pharmacological stimulation of the cholinergic anti-inflammatory pathway". *J. Exp. Med.* 195: 781-788 (2002).
- Besedovsky, H. *et al. Science* 233:652-54 (1986).
- Bianchi, M. *et al.* "An inhibitor of macrophage arginine transport and nitric oxide production (CNI-1493) prevents acute inflammation and endotoxin lethality". *Mol. Med.* 1:254-266 (1995).
- Blackwell, T.S. y Christman, J.W. *Br. J. Anaesth.* 77: 110-17 (1996).
- 35 Blum, A. y Miller, H. *Am. Heart J.* 135:181-86 (1998).
- Borovikova, L.V., Ivanova, S., Zhang, M., Yang, H., Botchkina, G.I., Watkins, L.R., Wang, H., Abumrad, N., Eaton, J.W. & Tracey, K.J. "Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin". *Nature* 405:458-462 (2000).
- Bumgardner, G.L. y Orosz, C.G. *Semin. Liver Dis.* 19: 189-204 (1999).
- 40 Carteron, N.L. *Mol. Med. Today* 6:315-23 (2000).
- Cohen, P. S. *et al.* "The critical role of p38 MAP kinase in T cell HIV-1 replication". *Molecular Medicine* 3:339-346 (1997).
- Dibbs, Z. *et al. Proc. Assoc. Am. Physicians* 111:423-28 (1999).

- Dinareello**, C.A. *FASEB J.* 8:1314-25 (1994).
- Drisdel**, R. C. y **Green**, W. N. "Neuronal  $\alpha$ -bungarotoxin receptors are  $\alpha 7$  subunit homomers". *J. Neurosci.* 20: 133-139 (2000).
- 5 **Feng**, G., **Steinbach**, J.H. y **Sanes**, J.R. "Rapsyn clusters neuronal acetylcholine receptors but is inessential for formation of an interneuronal cholinergic synapse". *J. Neurosci.* 18:4166-4176 (1998).
- Fleshner**, M. *et al. J. Neuroimmunol.* 86:134-41 (1998).
- Fox**, D.A. *Arch. Intern. Med.* 28:437-444 (2000).
- Franceschini**, D. *et al.* "Altered baroreflex responses in  $\alpha 7$  deficient mice". *Behavioural Brain Res.* 113:3-10 (2000).
- Francis**, M.M. *et al. Mol. Pharmacol.* 60:71-79 (2001).
- 10 **Gattomo**, M. *et al. J. Rheumatol.* 27:2251-2255 (2000).
- Gault**, J. *et al.* "Genomic organization and partial duplication of the human  $\alpha 7$  neuronal nicotinic acetylcholine receptor gene (CHRNA7)". *Genomics* 52:173-185 (1998).
- Gaykema**, R.P. *et al. Endocrinology* 136:4717-4720 (1995).
- Gracie**, J.A. *et al. J. Clin. Invest.* 104:1393-1401 (1999).
- 15 **Holladay** *et al.* "Neuronal Nicotinic Acetylcholine Receptors as Targets for Drug Discovery". *Journal of Medicinal Chemistry* 40:4169-4194 (1997).
- Hommes**, D.W. y van **Deventer**, S.J. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* 3:191-95 (2000).
- Hsu**, H.Y. *et al. J. Pediatr. Gastroenterol.* 29:540-45 (1999).
- Hu**, X.X. *et al. J. Neuroimmunol.* 31:35-42 (1991).
- 20 **Jander**, S. y **Stoll**, G. *J. Neuroimmunol.* 114:253-58 (2001).
- Kanai**, T. *et al. Digestion* 63 Suppl. 1:37-42 (2001).
- Katagiri**, M. *et al. J. Clin. Gastroenterol.* 25 Suppl. 1: S211-14 (1997).
- Keffer**, J. *et al.* "Transgenic mice expressing human tumour necrosis factor: a predictive genetic model of arthritis". *EMBO J.* 10:4025-4031 (1991).
- 25 **Kem**, W.R. *et al. J. Pharmacol. Exp. Ther.* 283:979-992 (1997).
- Kimblings**, A.N. *et al. Eur. J. Surg.* 166:700-05 (2000).
- Kontoyiannis**, D. *et al.* "Impaired on/off regulation of TNF biosynthesis in mice lacking TNF AU-rich elements: implications for joint- and gut- associated immunopathologies". *Immunity* 10:387-398 (1999).
- 30 **Kumins**, N.H., **Hunt**, J., **Gamelli**, R.L. y **Filkins**, J.P. "Partial hepatectomy reduces the endotoxin-induced peak circulating level of tumor necrosis factor in rats". *Shock* 5:385-388 (1996).
- Le **Novere**, N. & **Changeux**, J-P. "Molecular evolution of the nicotinic acetylcholine receptor: an example of multigene family in excitable cells". *J. Mol. Evol.* 40:155-172 (1995).
- Lee**, H.G., *et al. Clin. Exp. Immunol.* 100:139-44 (1995).

- Leonard, S. y Bertrand, D.** "Neuronal nicotinic receptors: from structure to function". *Nicotine & Tobacco Res.* 3: 203-223 (2001).
- Lin, W. et al.** "Distinct roles of nerve and muscle in postsynaptic differentiation of the neuromuscular synapse". *Nature* 410:1057-1064 (2001).
- 5 **Lindstrom, J. M.** "Nicotinic acetylcholine receptors". En "Hand Book Of Receptors And Channels: Ligand- And Voltage- Gated Ion Channels". Editado por R. Alan North. *CRC Press, Inc.* (1995).
- Marubio, L.M. y Changeux, J-P.** "Nicotinic acetylcholine receptor knockout mice as animal models for studying receptor function". *Eur. J. Pharmacol.* 393:113-121 (2000).
- McGuinness, P.H. et al.** *Gut* 46:260-69 (2000).
- 10 **Nathan, C.F.** *J. Clin. Invest.* 79:319-26 (1987).
- Orr-Urtreger, A. et al.** "Mice deficient in the  $\alpha 7$  neuronal nicotinic acetylcholine receptor lack a-bungarotoxin binding sites and hippocampal fast nicotinic currents". *J. Neurosci.* 17:9165-9171 (1997).
- Peng, X. et al.** "Human  $\alpha 7$  acetylcholine receptor: cloning of the  $\alpha 7$  subunit from the SH-SY5Y cell line, and determination of pharmacological properties of native receptors and functional  $\alpha 7$  homomers expressed in *Xenopus oocytes*". *Mol. Pharmacol.* 45:546-554 (1994).
- 15 **Pulkki, K.J.** *Ann. Med.* 29:339-43 (1997).
- Prystowsky, J.B. y Rege, R.V.** *J. Surg. Res.* 71:123-26 (1997).
- Rayner, S.A. et al.** *Clin. Exp. Immunol.* 122:109-16 (2000).
- Romanovsky, A.A. et al.** *Am. J. Physiol.* 273:R407-13 (1997).
- 20 **Seguela, P. et al.** "Molecular cloning, functional properties, and distribution of rat brain  $\alpha 7$ : a nicotinic cation channel highly permeable to calcium". *J. Neurosci.* 13:596-604 (1993).
- Scheinman, R.I. et al.** *Science* 270:283-86 (1995).
- Shoop, R.D., Yamada, N. y Berg, D.K.** "Cytoskeletal links of neuronal acetylcholine receptors containing  $\alpha 7$  subunits". *J. Neurosci.* 20:4021-4029 (2000).
- 25 **Shoop, R. D. et al.** "Synaptically driven calcium transients via nicotinic receptors on somatic spines". *J. Neurosci.* 21: 771-781 (2001).
- Simosky, J.K. et al.** *Biol. Psychiatry* 50:493-500 (2001).
- Steinlein, O.** "New functions for nicotine acetylcholine receptors?" *Behavioural Brain Res.* 95:31-35 (1998).
- Sternberg, E.M.** *J. Clin. Invest.* 100:2641-47 (1997).
- 30 **Tsutsui, H. et al.** *Immunol. Rev.* 174:192-209 (2000).
- Tracey, K.J. et al.** "Shock and tissue injury induced by recombinant human cachectin". *Science* 234:470-474 (1986).
- Tracey, K.J., Czura, C.J. e Ivanova, S.** "Mind over immunity". *FASEB J.* 15:1575-1576 (2001).
- Vijayaraghavan, S. et al.** "Nicotinic receptors that bind a-bungarotoxin on neurons raise intracellular free  $Ca^{2+}$ ". *Neuron* 8:353-362 (1992).
- 35 **Wang, H. et al.** "HMG-1 as a late mediator of endotoxin lethality in mice". *Science* 255:248-251 (1999).

**Waserman, S. et al. *Can. Respir. J.* 7:229-37 (2000).**

**Watanabe, H. et al. *J. Reconstr. Microsurg.* 13:193-97 (1997).**

**Watkins, L.R. y Maier, S.F. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:7710-13 (1999).**

**Watkins L.R., et al. *Neurosci. Lett.* 183:27-31 (1995).**

5 **Woiciechowsky, C. et al. *Nat. Med.* 4: 808-13 (1998).**

**Yeh, S.S. y Schuster, M.W. *Am. J. Clin. Nutr.* 70, 183-97 (1999).**

**Zhang y Tracey, en "The Cytokine Handbook", 3a ed., Ed. Thompson, *Academic Press*, 515-47 (1998).**

Publicación de solicitud de patente PCT WO 97/30998.

Publicación de solicitud de patente PCT WO 00/47104.

10 Publicación de solicitud de patente PCT WO 01/85727.

Publicación de solicitud de patente PCT WO 02/44176.

Publicación de solicitud de patente PCT WO 02/057275.

Solicitud de patente estadounidense número 09/855.446.

Publicación de solicitud de patente estadounidense número 2002/0040035.

15 Publicación de solicitud de patente estadounidense número 2002/0086871.

Patente estadounidense número 5.902.814.

Patente estadounidense número 5.977.144.

Patente estadounidense número 6.110.914.

Patente estadounidense número 6.407.095.

20 Patente estadounidense número 6.436.909.

## RESUMEN DE LA INVENCION

25 En consecuencia, la presente invención se basa en el descubrimiento de que el receptor  $\alpha 7$  es el receptor sensible a  $\alpha$ -bungarotoxina que influye en la liberación de citocinas proinflamatorias desde los macrófagos. Con ese conocimiento, se entendería que diversos procedimientos y composiciones sean útiles para el tratamiento de estados inflamatorios y la identificación de compuestos útiles para ese tratamiento. Los estudios de las respuestas de macrófagos frente a agonistas y antagonistas colinérgicos también se ven facilitados por este conocimiento.

30 La invención está dirigida a procedimientos para determinar si un compuesto es un agonista colinérgico selectivo para un receptor  $\alpha 7$  nicotínico como se define en las reivindicaciones. Los procedimientos comprenden determinar si el compuesto inhibe la liberación de una citoquina proinflamatoria de una célula de mamífero, y determinar si el compuesto es un agonista colinérgico reactivo con al menos un receptor nicotínico que no es  $\alpha 7$ . En estos procedimientos, un compuesto que inhibe la liberación de la citoquina proinflamatoria de la célula de mamífero, pero no es un agonista colinérgico reactivo con al menos un receptor nicotínico que no es  $\alpha 7$ , es un agonista colinérgico selectivo para un receptor  $\alpha 7$  nicotínico.

35 En un ejemplo relacionado, la presente divulgación, que comprende la invención, se refiere a procedimientos para determinar si un compuesto es un antagonista colinérgico reactivo con un receptor nicotínico  $\alpha 7$ . Estos

procedimientos comprenden la determinación de si el compuesto reduce la capacidad de un agonista colinérgico para inhibir la liberación de una citoquina proinflamatoria de una célula de mamífero. En estos procedimientos, un compuesto que reduce la capacidad de un agonista colinérgico para inhibir la liberación de una citoquina proinflamatoria de una célula de mamífero es un antagonista colinérgico reactivo con un receptor  $\alpha 7$ .

- 5 En un ejemplo adicional, la presente descripción se refiere a procedimientos para determinar si un compuesto de ensayo tiene la capacidad de inhibir la inflamación. Estos procedimientos comprenden la determinación de si el compuesto de ensayo es un agonista colinérgico reactivo con un receptor  $\alpha 7$  nicotínico.

10 Otros procedimientos para determinar si un compuesto de ensayo tiene la capacidad de inhibir la inflamación son también parte de la divulgación. Estos procedimientos comprenden la determinación de si el compuesto de ensayo inhibe la unión de un antagonista de un receptor  $\alpha 7$  nicotínico.

La presente divulgación también se refiere a oligonucleótidos o miméticos capaces de inhibir la atenuación de lipopolisacárido inducida por la liberación de TNF a partir de un macrófago de mamíferos tras la exposición de los macrófagos a un agonista colinérgico. Los oligonucleótidos o miméticos consisten esencialmente en una secuencia mayor que 5 nucleótidos de longitud que es complementaria a un ARNm de un receptor  $\alpha 7$ .

- 15 Adicionalmente, la divulgación está dirigida a procedimientos para inhibir la atenuación de la liberación de TNF a partir de un macrófago de mamíferos tras la exposición de los macrófagos a un agonista colinérgico. Estos procedimientos comprenden el tratamiento de los macrófagos con el oligonucleótido o mimético descrito anteriormente.

#### BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

- 20 La figura 1 son micrografías fluorescentes que establecen que los receptores nicotínicos de unión a  $\alpha$ -bungarotoxina se agrupan en la superficie de los macrófagos. Se tiñeron macrófagos primarios humanos con  $\alpha$ -bungarotoxina marcada con FITC ( $\alpha$ -bgt, 1,5  $\mu$ g/ml) y se visualizaron con un microscopio de fluorescencia confocal. Los paneles 1a y b muestran micrografías con menor aumento. a. Se tiñeron células con  $\alpha$ -bungarotoxina sola. b. Se añadieron 500  $\mu$ M de nicotina antes de la adición de  $\alpha$ -bungarotoxina. Los paneles 1c y 1d muestran micrografías con mayor  
25 aumento para revelar las agrupaciones de receptores. c. Los planos focales se encontraban en las capas internas próximas al centro (tres células inferiores) o próximas a la superficie (célula superior) de las células. d. El plano focal se encontraba en la superficie superior de la célula.

- 30 La figura 2 son fotografías de geles e inmunotransferencias de tipo Western que muestran la expresión de ARNm y proteína de receptores nicotínicos  $\alpha 7$  y  $\alpha 1$  en macrófagos primarios humanos. El panel a muestra los resultados de RT-PCR con cebadores específicos para  $\alpha 7$ , que genera una banda de  $\alpha 7$  de 843 pb. Se verificaron los productos de PCR mediante secuenciación (datos no mostrados). MAC 1 y MAC2: macrófagos derivados de dos donantes no relacionados. El panel b muestra inmunotransferencias de tipo Western. Se incubaron lisados celulares de células PC12 o macrófagos humanos (MAC) o bien con perlas de Sepharose control o perlas de Sepharose conjugadas con  $\alpha$ -bungarotoxina. Entonces se analizaron las proteínas unidas mediante anticuerpos monoclonales y policlonales  
35 específicos para  $\alpha 7$  tal como se indica.

- 40 La figura 3 muestra gráficas y micrografías que establecen que los oligonucleótidos antisentido para la subunidad  $\alpha 7$  de los receptores nicotínicos de acetilcolina inhiben el efecto de la nicotina sobre la liberación de TNF. Los paneles a-c son gráficas que resumen los resultados experimentales, que muestran la liberación de TNF estimulada por LPS desde macrófagos primarios humanos pretratados con oligonucleótidos antisentido con respecto a diversas subunidades de los receptores nicotínicos. Cuando se indica, se añadió nicotina (Nic, 1  $\mu$ M) 5-10 min. antes de la inducción con LPS (100 ng/ml). Se determinaron los niveles de TNF en el medio de cultivo celular mediante ensayos con L929. CT: cultivos de macrófagos control (no estimulados). AS $\alpha 7$ , AS $\alpha 1$  y AS $\alpha 10$ : oligonucleótidos antisentido para las subunidades  $\alpha 7$ ,  $\alpha 1$  y  $\alpha 10$ , respectivamente. Los paneles d y e son micrografías fluorescentes que muestran la tinción con FITC- $\alpha$ -bungarotoxina de macrófagos primarios humanos tratados (e) o sin tratar (d) con el  
45 oligonucleótido antisentido para  $\alpha 7$  (AS $\alpha 7$ ) y visualizados mediante microscopía de fluorescencia confocal.

- 50 La figura 4 son gráficas que resumen experimentos que demuestran el aumento de la producción de citocinas en ratones deficientes en  $\alpha 7$  durante endotoxemia. Se inyectó a los ratones deficientes en la subunidad  $\alpha 7$  (-/-) o ratones de tipo natural con edad y sexo coincidentes (+/+) LPS (0,1 mg/kg, i.p.). Se obtuvieron la sangre y los órganos o bien 1 h (para TNF) o bien 4 h (para IL-1 $\beta$  y IL-6) tras la estimulación con LPS. Se midieron los niveles de TNF, IL-1 $\beta$  e IL-6 en el suero o los órganos con ELISA. Panel a: niveles de TNF en suero. n=10 por grupo. Panel b: niveles de TNF en hígado. n=6 por grupo. Panel c: niveles de TNF en bazo. n=6 por grupo. Panel d: niveles de IL-1 $\beta$  en suero. n=8 por grupo. Panel e: niveles de IL-6 en suero. n=9 por grupo. \* = P < 0,05 frente a los controles de tipo natural.

- La figura 5 es una gráfica que muestra que la estimulación del nervio vago no inhibe TNF en los ratones deficientes en la subunidad  $\alpha 7$  del receptor nicotínico de acetilcolina. Se sometieron los ratones deficientes en la subunidad  $\alpha 7$  (-/-) o ratones de tipo natural con edad y sexo coincidentes (+/+) o bien a una operación simulada (SIMUL.) o bien a estimulación del nervio vago (ENV, vago izquierdo, 1 voltio, 2 ms, 1 Hz); se extrajo sangre 2 h tras la administración de LPS. Se determinaron los niveles de TNF en suero mediante ELISA. n=10 (SIMUL.  $\alpha 7$  +/+). n=11 (ENV  $\alpha 7$  +/+, SIMUL.  $\alpha 7$  -/-, ENV  $\alpha 7$  -/-). \* = P < 0,05 frente a SIMUL.  $\alpha 7$  +/+.
- La figura 6 es un diagrama que muestra la mortalidad (supervivencia en porcentaje) de los ratones en el transcurso de la administración de o bien el compuesto (V) o bien el compuesto (VI) tras la inducción de sepsis usando el modelo de ligadura cecal y punción.
- La figura 7 es una comparación en paralelo de diagramas que representan las cantidades medidas de liberación de TNF- $\alpha$  inducida por LPS a partir de células similares a macrófagos RAW 264.7 murinas tratadas con concentraciones incrementales o bien del compuesto (V) o bien de nicotina como una función de las concentraciones de estos compuestos.
- La figura 8A es un diagrama que muestra la inhibición en porcentaje de la liberación de TNF- $\alpha$  inducida por LPS a partir de células similares a macrófagos RAW 264.7 murinas tratadas con concentraciones incrementales de compuesto (VI) como una función del tiempo de preincubación.
- La figura 8B es un diagrama que muestra la inhibición en porcentaje de la liberación de TNF- $\alpha$  inducida por LPS a partir de células similares a macrófagos RAW 264.7 murinas tratadas con concentraciones incrementales de compuesto (VI) como una función de la concentración de compuesto (VI).
- La figura 9 es un diagrama de barras de la concentración en el torrente sanguíneo medida de TNF- $\alpha$  tras la administración de LPS a ratones a los que se administró previamente el compuesto (VI).
- La figura 10 es una comparación en paralelo de diagramas de barras que representan el peso del colon (A) y la longitud del colon (B) de ratones a los que se ha administrado el compuesto (VI) tras la inducción de colitis mediante sulfato sódico de dextrano.
- La figura 11 es un diagrama de barras que muestra la concentración medida de TNF- $\alpha$  liberado a partir de células similares a macrófagos RAW 264.7 murinas estimuladas con LPS tras la preincubación con cantidades incrementales de compuesto (VII).

## DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

### Definiciones de sustituyentes

- El término "alquilo", tal como se usa en el presente documento, a menos que se indique lo contrario, incluye radicales hidrocarbonados monovalentes saturados que tienen restos lineales o ramificados, normalmente C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>, preferiblemente C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>. Ejemplos de grupos alquilo incluyen metilo, etilo, propilo, isopropilo y t-butilo.
- El término "alquenilo", tal como se usa en el presente documento, a menos que se indique lo contrario, incluye restos alquilo que tienen al menos un doble enlace carbono-carbono en los que alquilo es tal como se definió anteriormente. Ejemplos de alquenilo incluyen etenilo y propenilo.
- El término "alquinilo", tal como se usa en el presente documento, a menos que se indique lo contrario, incluye restos alquilo que tienen al menos un triple enlace carbono-carbono en los que alquilo es tal como se definió anteriormente. Ejemplos de grupos alquinilo incluyen etinilo y 2-propinilo.
- El término "alcoxilo", tal como se usa en el presente documento, significa un grupo "alquil-O-", en el que alquilo es tal como se definió anteriormente.
- El término "cicloalquilo", tal como se usa en el presente documento, a menos que se indique lo contrario, incluye restos alquilo cíclicos saturados no aromáticos en los que alquilo es tal como se definió anteriormente. Ejemplos de cicloalquilo incluyen ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo y cicloheptilo. Los grupos "bicicloalquilo" son grupos carbocíclicos saturados no aromáticos que consisten en dos anillos. Ejemplos de grupos bicicloalquilo incluyen biciclo-[2.2.2]-octilo y norbornilo. El término "cicloalquenilo" y "bicicloalquenilo" se refieren a restos cicloalquilo y bicicloalquilo carbocíclicos no aromáticos tal como se definieron anteriormente, excepto porque comprenden uno o más dobles enlaces carbono-carbono que conectan miembros de anillo de carbono (un doble

5 enlace "endocíclico") y/o uno o más dobles enlaces carbono-carbono que conectan un miembro de anillo de carbono y un carbono que no es de anillo adyacente (un doble enlace "exocíclico"). Ejemplos de grupos cicloalqueno incluyen cicloalqueno y ciclohexeno. Un ejemplo no limitante de un grupo bicicloalqueno es norborneno. Los grupos cicloalquilo, cicloalqueno, bicicloalquilo y bicicloalqueno también incluyen grupos similares a los descritos anteriormente para cada una de estas categorías respectivas, pero que están sustituidos con uno o más restos oxo. Los ejemplos de tales grupos con restos oxo incluyen oxociclopentilo, oxociclobutilo, oxociclopentenilo y norcanforilo.

El término "cicloalcoxilo", tal como se usa en el presente documento, a menos que se indique lo contrario, incluye el grupo "cicloalquil-O-", en el que cicloalquilo se definió anteriormente.

10 El término "arilo", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo carbocíclico. Ejemplos de grupos arilo incluyen fenilo y naftilo.

15 El término "heteroarilo", tal como se usa en el presente documento, se refiere a grupos aromáticos que contienen uno o más heteroátomos (O, S o N). Un grupo heteroarilo puede ser monocíclico o policíclico. Los grupos heteroarilo de esta invención también pueden incluir sistemas de anillos sustituidos con uno o más restos oxo. Ejemplos de grupos heteroarilo incluyen piridinilo, piridazinilo, imidazolilo, pirimidinilo, pirazolilo, triazolilo, pirazinilo, quinolilo, isoquinolilo, tetrazolilo, furilo, tienilo, isoxazolilo, tiazolilo, oxazolilo, isotiazolilo, pirrolilo, quinolinilo, isoquinolinilo, indolilo, bencimidazolilo, benzofuranilo, cinolinilo, indazolilo, indolizínilo, ftalazinilo, piridazinilo, triazinilo, isoindolilo, purinilo, oxadiazolilo, tiazolilo, tiadiazolilo, furazanilo, benzofurazanilo, benzotiofenilo, benzotriazolilo, benzotiazolilo, benzoxazolilo, quinazolinilo, quinoxalinilo, naftiridinilo, dihidroquinolilo, tetrahydroquinolilo, dihidroisoquinolilo, tetrahydroisoquinolilo, benzofurilo, furopiridinilo, pirrolopirimidinilo y azaindolilo.

20 Los grupos heteroarilo anteriores pueden unirse a través de C o unirse a través de N (cuando eso es posible). Por ejemplo, un grupo derivado de pirrol puede ser pirrol-1-ilo (unido a través de N) o pirrol-3-ilo (unido a través de C).

En el contexto de la presente invención, un grupo carbocíclico bicíclico es un compuesto bicíclico que sólo lleva carbono como átomo de anillo. La estructura de anillo puede ser, en particular, aromática, saturada o parcialmente saturada. Ejemplos de tales compuestos incluyen indanilo, naftalenilo, azuleno.

25 En el contexto de la presente invención, un grupo amino puede ser primario (-NH<sub>2</sub>), secundario (-NHR<sub>a</sub>), o terciario (-NR<sub>a</sub>R<sub>b</sub>), en los que R<sub>a</sub> y R<sub>b</sub> pueden ser cualquiera de alquilo, alqueno, alquínilo, alcoxilo, cicloalquilo, cicloalcoxilo, arilo, heteroarilo y un grupo carbocíclico bicíclico.

30 La práctica de la presente invención empleará, a menos que se indique lo contrario, técnicas convencionales de cultivo celular, biología molecular, microbiología, biología celular e inmunología, que se encuentran dentro de las habilidades de la técnica. Tales técnicas se explican totalmente en la bibliografía. Véase, por ejemplo, Sambrook *et al.*, 1989, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory Press; Ausubel *et al.* (1995), "Short Protocols in Molecular Biology", John Wiley and Sons; "Methods in Enzymology" (varios volúmenes); "Methods in Cell Biology" (varios volúmenes), y "Methods in Molecular Biology" (varios volúmenes).

35 Pueden usarse sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos divulgados en el presente documento para poner en práctica la presente invención. Tal como se usa en el presente documento, una "sal farmacéuticamente aceptable" del compuesto divulgado es un producto que contiene un enlace iónico de la reacción de un compuesto de la invención con o bien un ácido o bien una base, adecuado para su administración a un sujeto. Por ejemplo, puede obtenerse una sal de ácido de un compuesto que contiene un grupo amina u otro básico haciendo reaccionar el compuesto con un ácido orgánico o inorgánico adecuado, tal como cloruro de hidrógeno, bromuro de hidrógeno, ácido acético, ácido perclórico y similares. Otros ejemplos de tales sales incluyen clorhidratos, bromhidratos, sulfatos, metanosulfonatos, nitratos, maleatos, acetatos, citratos, fumaratos, tartratos (por ejemplo (+)-tartratos, (-)-tartratos o mezclas de los mismos incluyendo mezclas racémicas), succinatos, benzoatos y sales con aminoácidos tales como ácido glutámico. También pueden formarse sales con bases orgánicas adecuadas cuando el compuesto comprende un grupo funcional ácido tal como -COOH o -SO<sub>3</sub>H. Tales bases adecuadas para la formación de sales de adición de base farmacéuticamente aceptables con compuestos de la presente invención incluyen bases orgánicas que no son tóxicas y lo suficientemente fuertes como para reaccionar con el grupo funcional ácido. Tales bases orgánicas se conocen bien en la técnica e incluyen aminoácidos tales como arginina y lisina, mono, di y trietanolamina, colina, mono, di y trietilamina, tal como metilamina, dimetilamina, y trimetilamina, guanidina, N-bencilfenetilamina, N-metilglucosamina, N-metilpiperazina, morfolina, etilendiamina y tris(hidroximetil)aminometano.

50 Tal como se usa en el presente documento, una "composición farmacéutica" es una formulación que comprende los compuestos descritos y un diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable, en una forma adecuada para la administración a un sujeto. La composición farmacéutica puede estar a granel o en una forma farmacéutica unitaria. La forma farmacéutica unitaria puede estar en cualquiera de una variedad de formas, incluyendo, por ejemplo, una cápsula, una bolsa i.v., un comprimido, una bomba individual en un inhalador en aerosol, o un vial. La cantidad de

principio activo (es decir, una formulación del compuesto divulgado o sales del mismo) en una dosis unitaria de composición es una cantidad eficaz y puede variarse según el tratamiento particular implicado. Puede apreciarse que puede ser necesario realizar variaciones rutinarias a la dosificación dependiendo de la edad y el estado del paciente. La dosificación también dependerá de la vía de administración. Se contempla una variedad de vías, incluyendo tópica, oral, pulmonar, rectal, vaginal, parenteral, incluyendo transdérmica, subcutánea, intravenosa, intramuscular, intraperitoneal e intranasal.

Los compuestos descritos en el presente documento, y las sales farmacéuticamente aceptables de los mismos puede usarse en preparaciones farmacéuticas en combinación con un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable. Vehículos farmacéuticamente aceptables adecuados incluyen cargas o diluyentes sólidos inertes y disoluciones acuosas u orgánicas estériles. Los compuestos estarán presentes en tales composiciones farmacéuticas en cantidades suficientes para proporcionar la cantidad de dosificación deseada en el intervalo descrito en el presente documento. Pueden hallarse técnicas para la formulación y administración de los compuestos de la presente invención en "*Remington: the Science and Practice of Pharmacy*", 19ª edición, Mack Publishing Co., Easton, PA (1995).

Tal como se usa en el presente documento, un "sujeto" incluye mamíferos, por ejemplo, seres humanos, animales de compañía (por ejemplo, perros, gatos, pájaros y similares), animales de granja (por ejemplo, vacas, ovejas, cerdos, caballos y aves de corral y similares) y animales de laboratorio (por ejemplo, ratas, ratones y cobayas y similares). En una realización preferida de los procedimientos divulgados, el sujeto es humano.

Tal como se usa en el presente documento, una "cantidad terapéuticamente eficaz" de un compuesto de la invención divulgada es la cantidad que, cuando se administra a un sujeto que necesita tratamiento, mejora el pronóstico del sujeto, por ejemplo, retrasa la aparición de y/o reduce la gravedad de uno o más de los síntomas del sujeto asociados con una infección fúngica. La cantidad del compuesto divulgado que ha de administrarse a un sujeto dependerá de la enfermedad particular, el modo de administración y las características del sujeto, tales como la salud general, otras enfermedades, edad, sexo, genotipo, peso corporal y tolerancia a fármacos. El experto podrá determinar dosificaciones apropiadas dependiendo de estos y otros factores. Las cantidades eficaces de los compuestos divulgados normalmente oscilan entre aproximadamente 0,1 mg/kg de peso corporal al día y aproximadamente 1000 mg/kg de peso corporal al día, y preferiblemente entre 1 mg/kg de peso corporal al día y 100 mg/kg de peso corporal al día.

La presente invención se basa en la identificación del receptor sensible a  $\alpha$ -bungarotoxina que, cuando se expone a un agonista de ese receptor, inhibe la liberación de citocinas proinflamatorias desde los macrófagos cuando se estimulan de otro modo los macrófagos para liberar citocinas inflamatorias. El receptor responsable de esta inhibición es el receptor  $\alpha 7$ . Por tanto, el tratamiento de un macrófago con un agonista para el receptor  $\alpha 7$  inhibe que el macrófago libere citocinas proinflamatorias, particularmente TNF, si el macrófago se estimuló de otro modo, por ejemplo, con lipopolisacárido (LPS) bacteriano, para liberar las citocinas proinflamatorias.

Por consiguiente, en un ejemplo de la presente divulgación se refiere a procedimientos de inhibición de la liberación de una citoquina proinflamatoria de una célula de mamífero. Los procedimientos comprenden el tratamiento de la célula con un agonista colinérgico con una cantidad suficiente para disminuir la cantidad de la citoquina proinflamatoria liberado de la célula, en el que el agonista colinérgico es selectivo para un receptor  $\alpha 7$  nicotínico.

Tal como se usa en el presente documento, una citocina es una proteína o péptido soluble que se produce de manera natural por las células de mamífero y que actúan *in vivo* como reguladores humorales a concentraciones de micro a picomolares. Las citocinas pueden, en estados o bien normales o bien patológicos, modular las actividades funcionales de células y tejidos individuales. Una citocina proinflamatoria es una citocina que puede provocar cualquiera de las siguientes reacciones fisiológicas asociadas con la inflamación: vasodilatación, hiperemia, aumento de la permeabilidad de vasos con edema asociado, acumulación de granulocitos y fagocitos mononucleares, o deposición de fibrina. En algunos casos, la citocina proinflamatoria también puede provocar apoptosis, tal como en la insuficiencia cardíaca crónica, en la que se ha mostrado que TNF estimula la apoptosis de los cardiomiocitos (Pulkki, 1997; Tsutsui *et al.*, 2000). Ejemplos no limitativos de citocinas proinflamatorias son el factor de necrosis tumoral (TNF), interleucina (IL)-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-18, interferón- $\gamma$ , HMG-1, factor activador de las plaquetas (PAF) y factor inhibidor de la migración de macrófagos (MIF). En un ejemplo de la presente divulgación que comprende la invención, la citocina proinflamatoria que se inhibe mediante el tratamiento con un agonista colinérgico es TNF, dado que es citocina producido por macrófagos y media estados perjudiciales para muchos trastornos importantes, por ejemplo choque endotóxico, asma, artritis reumatoide, enfermedad biliar inflamatoria, insuficiencia cardíaca y rechazo de aloinjerto.

Las citocinas proinflamatorias han de distinguirse de las citocinas antiinflamatorias, tales como IL-4, IL-10 e IL-13, que no son mediadores de la inflamación. En un ejemplo, la liberación de citocinas antiinflamatorias no se inhibe por agonistas colinérgicos.

En muchos ejemplos, se producen citocinas proinflamatorias en una cascada de citocinas inflamatorias, definida en el presente documento como una liberación *in vivo* de al menos una citocina proinflamatoria en un mamífero, en la que la liberación de citocinas afecta a un estado fisiológico del mamífero.

5 Cualquier célula de mamífero que produce citocinas proinflamatorias es adecuada para la práctica de la presente divulgación que comprende la invención. Ejemplos no limitativos son monocitos, macrófagos, mastocitos, neutrófilos, células epiteliales, osteoblastos, fibroblastos, células del músculo liso y neuronas. En realizaciones preferidas, la célula es un macrófago.

10 Tal como se usa en el presente documento, un "receptor colinérgico  $\alpha 7$ " es un receptor que comprende una subunidad  $\alpha 7$ . El receptor puede comprender sólo subunidades  $\alpha 7$ ; alternativamente el receptor comprende subunidad(es)  $\alpha 7$  y subunidad(es) de otros subtipos de receptor colinérgico. En un ejemplo, el receptor es un homopentámero. En otro ejemplo, el receptor es un heteropentámero.

15 Tal como se usa en el presente documento, un "agonista de receptor colinérgico  $\alpha 7$ " es un compuesto que se une a un receptor que comprende una subunidad  $\alpha 7$ , *in vivo* o *in vitro*, induciendo al receptor a llevar a cabo su función biológica. En una realización, un agonista de receptor colinérgico inhibe la liberación de citocinas proinflamatorias desde células que expresan receptores colinérgicos que comprenden subunidades  $\alpha 7$  cuando la célula se estimula de otro modo para liberar esas citocinas proinflamatorias. Los expertos pueden determinar si cualquier compuesto particular es un agonista de receptor  $\alpha 7$  mediante cualquiera de varios procedimientos bien conocidos, por ejemplo los facilitados en el ejemplo A más adelante.

20 Cuando se hace referencia al efecto del agonista colinérgico sobre la liberación de citocinas proinflamatorias o una cascada de citocinas inflamatorias, o el efecto de la estimulación del nervio vago sobre una cascada de citocinas inflamatorias, el uso de los términos "inhibir" o "disminuir" engloba al menos una reducción pequeña pero medible en la liberación de citocinas proinflamatorias. En un ejemplo de la presente divulgación, la liberación de la citocina proinflamatoria se inhibe en al menos un 20% con respecto a los controles no tratados; en realizaciones más preferidas, la inhibición es de al menos el 50%; en ejemplos todavía más preferidos, la inhibición es de al menos el 70%, y en ejemplos más preferidos, la inhibición es de al menos el 80%. Tales reducciones en la liberación de citocinas proinflamatorias pueden reducir los efectos perjudiciales de una cascada de citocinas inflamatorias en realizaciones *in vivo*.

30 Se esperaría que cualquier agonista de  $\alpha 7$ , ya conocido o a descubrir posteriormente, inhiba la liberación de citocinas proinflamatorias desde células de mamífero. En un ejemplo de la presente divulgación que comprende la invención, el agonista colinérgico no es tóxico por lo demás para la célula a las concentraciones útiles. En un ejemplo, el agonista colinérgico se ha usado terapéuticamente *in vivo* o se produce de forma natural por las células de mamífero. Ejemplos no limitativos incluyen acetilcolina, muscarina, nicotina, 3-2,4-dimetoxibencilidina-anabaseína (DMXB-A, también conocido como GTS-21) (Kem *et al.*, 1997; Simosky *et al.*, 2001), colina, metyoduro de cocaína (Francis *et al.*, 2001).

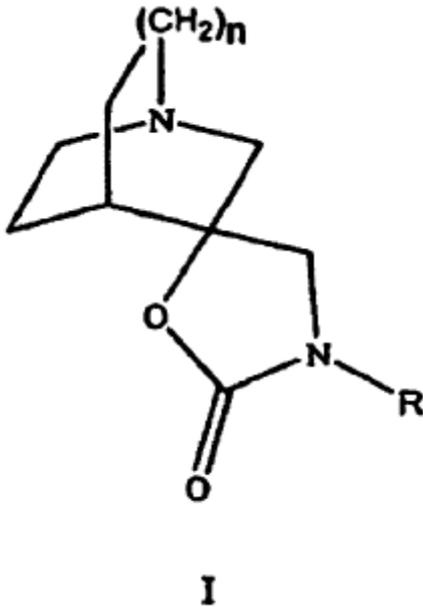
35 En las realizaciones más preferidas, el agonista colinérgico es un agonista que es selectivo o específico para  $\alpha 7$ , puesto que se esperaría que un agonista de este tipo produzca menos efectos secundarios que un agonista colinérgico inespecífico (por ejemplo, nicotina), a un sujeto que se está tratando para la inflamación. Tal como se usa en el presente documento, un agonista es selectivo para  $\alpha 7$  si ese agonista es un agonista que activa  $\alpha 7$  en mayor grado que el agonista activa al menos otro receptor nicotínico. Tal diferencia de activación puede medirse comparando la activación de los diversos receptores mediante cualquier procedimiento conocido, por ejemplo usando un ensayo de unión al receptor *in vitro*, tal como los producidos por NovaScreen Biosciences Corporation (Hanover, MD), o mediante los procedimientos descritos en el documento WO 02/44176 ( $\alpha 4\beta 2$  sometido a prueba), la patente estadounidense número 6.407.095 (receptor nicotínico periférico de tipo ganglionar), la publicación de solicitud de patente estadounidense número 2002/0086871 (unión de ligando marcado a membranas preparadas a partir de células GH<sub>4</sub>C1 transfectadas con el receptor de interés), la publicación de solicitud de patente estadounidense número 2002/0086871 ( $\alpha 1$  y  $\alpha 4$ ) y el documento WO 97/30998. Las referencias que describen procedimientos para determinar agonistas que son selectivos para los receptores  $\alpha 7$  incluyen: la patente estadounidense 5.977.144 (tabla 1), el documento WO 02/057275 (págs. 41-42) y Holladay *et al.* (1997). El experto conoce ensayos para otros subtipos de receptor nicotínico.

50 En un procedimiento preferido, la unión o actividad (respuestas a corriente) de ovocitos de *Xenopus* que expresan o bien el subtipo de receptor  $\alpha 7$  o bien otro subtipo de receptor (por ejemplo,  $\alpha 4\beta 2$ ) tras la administración del agonista. Se determinan que los agonistas que dan como resultado una mayor activación del subtipo de receptor  $\alpha 7$  son agonistas selectivos para  $\alpha 7$ . Usando cualquiera de los procedimientos anteriores o un procedimiento equivalente, se prefiere que el agonista selectivo para  $\alpha 7$  sea al menos dos veces, más preferiblemente al menos cinco veces, incluso más preferiblemente al menos 10 veces, y lo más preferiblemente al menos 50 veces más capaz de activar el receptor  $\alpha 7$  que al menos otro receptor nicotínico.

Un agonista es específico para  $\alpha 7$  si ese agonista activa el receptor  $\alpha 7$  en un grado mucho mayor (es decir, al menos 10 veces, preferiblemente al menos 20 veces, más preferiblemente al menos 50 veces) que cualquier otro receptor nicotínico. Lo más preferiblemente, el agonista específico no activará otro receptor nicotínico en ningún grado medible (es decir, significativo a  $P = 0,05$  frente al receptor no tratado en una comparación bien controlada). Ejemplos no limitativos de agonistas específicos para  $\alpha 7$  son DMXB-A (compuesto (V)) y metyoduro de cocaína.

5

En algunos ejemplos de la presente divulgación que comprende la invención, el agonista colinérgico nicotínico es un compuesto de fórmula I:



10

en la que R representa hidrógeno o metilo, y

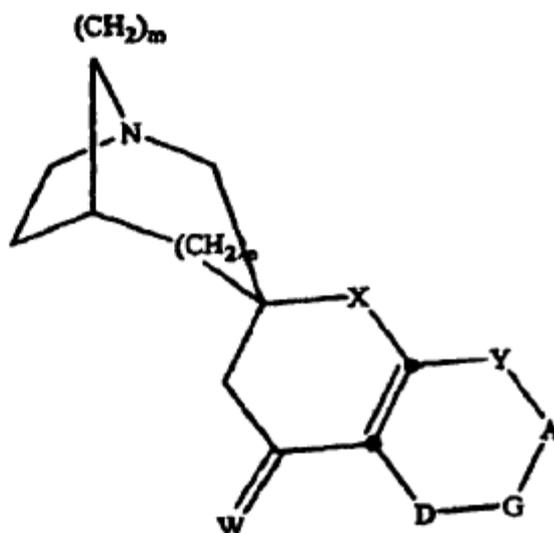
n representa 0 ó 1;

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. En realizaciones particularmente preferidas, el agonista colinérgico nicotínico es (-)-espiro[1-azabicyclo[2.2.2]octano-3,5'-oxazolidin-2'-ona] (compuesto VII). Se describen procedimientos de preparación de compuestos de fórmula I en la patente estadounidense número 5.902.814, cuyas enseñanzas se incorporan en su totalidad en este documento por referencia.

15

En otros ejemplos, el agonista colinérgico nicotínico es un compuesto de fórmula II:

(II)



en la que:

5 m es 1 ó 2;

n es 0 ó 1;

Y es CH, N o NO;

X es oxígeno o azufre;

W es oxígeno, H<sub>2</sub> o F<sub>2</sub>;

10 A es N o C(R<sup>2</sup>);

G es N o C(R<sup>3</sup>);

D es N o C(R<sup>4</sup>);

con la condición de que no más de uno de A, G y D sea nitrógeno pero al menos uno de Y, A, G y D es nitrógeno o NO;

15 R<sup>1</sup> es hidrógeno o alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>;

R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup> y R<sup>4</sup> son independientemente hidrógeno, halógeno, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>, alqueno C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub>, alquino C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub>, arilo, heteroarilo, OH, O-alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>, CO<sub>2</sub>R<sup>1</sup>, -CN, -NO<sub>2</sub>, -NR<sup>5</sup>R<sup>6</sup>, -CF<sub>3</sub> o -OSO<sub>2</sub>CF<sub>3</sub>, o R<sup>2</sup> y R<sup>3</sup>, R<sup>3</sup> y R<sup>4</sup>, respectivamente, pueden formar juntos otro anillo aromático o heteroaromático de seis miembros que comparte A y G, o G y D, respectivamente, que contiene entre cero y dos átomos de nitrógeno, y está sustituido con de uno a dos de los siguientes sustituyentes: independientemente hidrógeno, halógeno, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>, alqueno C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub>, alquino C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub>, arilo, heteroarilo, OH, O-alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>, CO<sub>2</sub>R<sup>1</sup>, -CN, -NO<sub>2</sub>, -NR<sup>5</sup>R<sup>6</sup>, -CF<sub>3</sub> o -OSO<sub>2</sub>CF<sub>3</sub>;

20 R<sup>5</sup> y R<sup>6</sup> son independientemente hidrógeno, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>, C(O)R<sup>7</sup>, C(O)NHR<sup>8</sup>, C(O)OR<sup>9</sup>, SO<sub>2</sub>R<sup>10</sup> o juntos pueden ser (CH<sub>2</sub>)<sub>j</sub>Q(CH<sub>2</sub>)<sub>k</sub> en el que Q es O, S, NR<sup>11</sup>,

o un enlace;

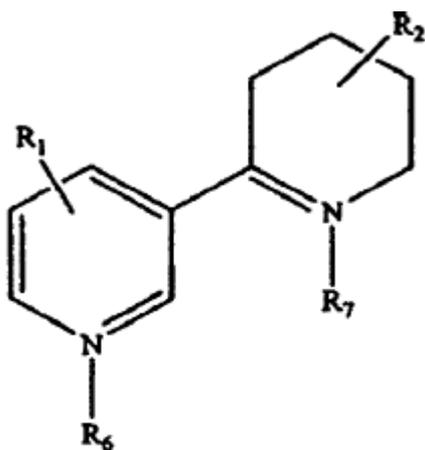
25 j es de 2 a 7;

k es de 0 a 2;

$R^7$ ,  $R^8$ ,  $R^9$ ,  $R^{10}$  y  $R^{11}$  son independientemente alquilo  $C_1$ - $C_4$ , arilo, o heteroarilo, o un enantiómero de los mismos;

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. En realizaciones preferidas, un agonista colinérgico es un compuesto de fórmula II en el que m es 1; n es 0; p es 0; x es oxígeno; A es  $C(R^2)$ ; G es  $C(R^3)$ ; y D es  $C(R^4)$ . En una realización particularmente preferida, el agonista colinérgico nicotínico es (R)-(-)-5'-fenilespiro[1-azabicyclo[2.2.2]octano-3,2'-(3'H)-furo[2,3-b]piridina]. Se describen procedimientos de preparación de compuestos de fórmula II en la patente estadounidense número 6.110.914.

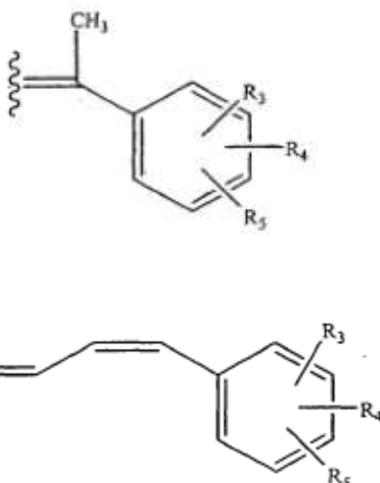
En ejemplos adicionales, el agonista colinérgico nicotínico es un compuesto de fórmula III:



III

10

en la que  $R_1$ ,  $R_6$  y  $R_7$  son hidrógeno o alquilo  $C_1$ - $C_4$ ; y  $R_2$  se selecciona de un grupo de



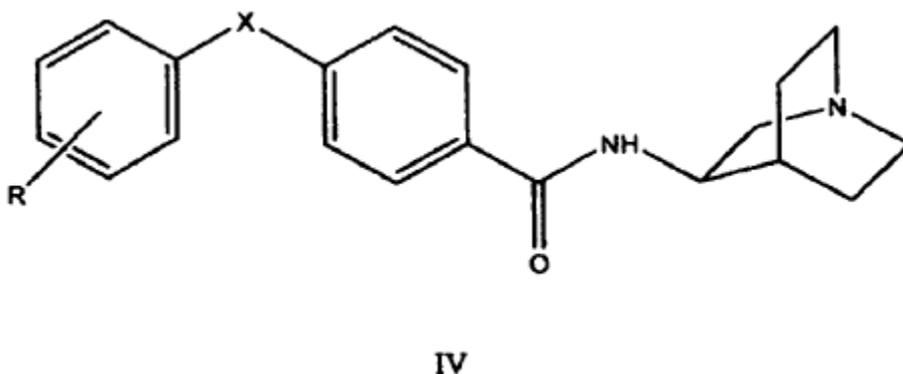
15

Y en las que,  $R_3$ ,  $R_4$  y  $R_5$  se seleccionan del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo  $C_1$ - $C_4$  opcionalmente sustituido con N,N-dialquilamino que tiene de 1 a 4 carbonos en cada uno de los alquilos, alcoxilo  $C_1$ - $C_6$  opcionalmente sustituido con N,N-dialquilamino que tiene de 1 a 4 carbonos en cada uno de los alquilos, carboalcoxilo que tiene de 1 a 4 carbonos en el alcoxilo, amino, amido que tiene de 1 a 4 carbonos en el acilo, ciano, y N,N-dialquilamino que tiene de 1 a 4 carbonos en cada uno de los alquilos, halógeno, hidroxilo o nitro.

20

En un ejemplo preferido, un agonista es un compuesto de fórmula III, en el que R<sub>2</sub> está unido a la posición 3 del anillo de tetrahidropiridina, y además en el que R<sub>3</sub>, que está unido a la posición 4 ó 2 del anillo de fenilo, se selecciona del grupo que consiste en amino, hidroxilo, cloro, ciano, dimetilamino, metilo, metoxilo, acetilamino, acetoxilo y nitro. En un ejemplo particularmente preferido, el agonista es un compuesto de fórmula III, en el que R<sub>3</sub> es hidroxilo, y en el que R<sub>1</sub>, R<sub>4</sub> y R<sub>5</sub> son hidrógeno. En otro ejemplo particularmente preferido, el agonista es un compuesto de fórmula III, en el que R<sub>3</sub> es acetilamino y en el que R<sub>1</sub>, R<sub>4</sub> y R<sub>5</sub> son hidrógeno. En otro ejemplo particularmente preferido, el agonista es un compuesto de fórmula III, en el que R<sub>3</sub> es acetoxilo y en el que R<sub>1</sub>, R<sub>4</sub> y R<sub>5</sub> son hidrógeno. En otro ejemplo particularmente preferido, el agonista es un compuesto de fórmula III, en el que R<sub>3</sub> es metoxi, y en el que R<sub>1</sub>, R<sub>4</sub> y R<sub>5</sub> son hidrógeno. Aún en otro ejemplo particularmente preferido, el agonista es un compuesto de fórmula III, en el que R<sub>3</sub> es metoxi y en el que R<sub>1</sub> y R<sub>4</sub> son hidrógeno, y además en el que R<sub>3</sub> está unido a la posición 2 del anillo de fenilo, y R<sub>5</sub>, que está unido a la posición 4 del anillo de fenilo, es metoxi o hidroxilo. En ejemplos particularmente preferidos, el agonista colinérgico nicotínico se selecciona del grupo que consiste en 3-2,4-dimetoxibencilidín-anabaseína (DMXB-A; compuesto (V)), 3-(4-hidroxibencilidén)anabaseína, 3-(4-metoxibencilidén)anabaseína, 3-(4-aminobencilidén)anabaseína, 3-(4-hidroxí-2-metoxibencilidén)anabaseína (compuesto VI), 3-(4-metoxi-2-hidroxibencilidén)anabaseína, trans-3-cinamilidén-anabaseína, trans-3-(2-metoxi-cinamilidén)anabaseína y trans-3-(4-metoxicinamilidén)anabaseína. Se describen procedimientos de preparación de compuestos de fórmula III en la patente estadounidense número 5.977.144.

En ejemplos adicionales, el agonista es un compuesto de fórmula IV:



en la que X es O o S; y

R se selecciona de H, OR<sub>1</sub>, NHC(O)R<sub>1</sub>, y un halógeno, en el que R<sub>1</sub> es un hidrógeno o un alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>. En una realización particularmente preferida, el agonista colinérgico nicotínico se selecciona de un grupo que consiste en N-[(3R)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il]-4-(4-hidroxifenoxi)benzamida, N-[(3R)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il]-4-(4-acetamidofenoxi)benzamida, N-[(3R)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il]-4-(fenilsulfanil)benzamida y N-[(3R)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il]-4-(3-clorofenilsulfonil)-benzamida. Se describen procedimientos de preparación de compuestos de fórmula IV en la publicación de solicitud de patente PCT WO 01/85727.

Aún en otros ejemplos, el agonista es éster 1-(2-fluorofenil)-etílico del ácido (1-aza-biciclo[2.2.2]oct-3-il)-carbámico. Se han descrito procedimientos de preparación de este compuesto en la publicación de solicitud de patente estadounidense 2002/0040035.

Todavía en otros ejemplos, el agonista de α<sub>7</sub> es un anticuerpo que es un agonista selectivo (lo más preferiblemente un agonista específico) del receptor nicotínico α<sub>7</sub>. Los anticuerpos pueden ser policlonales o monoclonales; pueden provenir de cualquiera de varias fuentes humana, eucariota no humana, celular, fúngica o bacteriana; pueden estar codificados por secuencias codificantes portadas por vector o genómicas; y pueden producirse frente a α<sub>7</sub> nativo o recombinante o fragmentos del mismo con o sin el uso de adyuvantes, todo según una variedad de procedimientos y procedimientos bien conocidos en la técnica para generar y producir anticuerpos. Otros ejemplos de tales anticuerpos útiles incluyen, pero no se limitan a, los tipos quiméricos, de cadena sencilla y diversos tipos humanos o humanizados de anticuerpos, así como diversos fragmentos de los mismos tales como fragmentos Fab y fragmentos producidos a partir de sistemas de expresión especializados.

La presente divulgación también se refiere a anticuerpos que son agonistas α<sub>7</sub>, tal y como se describe anteriormente.

Un ejemplo no limitativo de procedimientos para generar anticuerpos para el receptor nicotínico  $\alpha 7$  es inmunizar un animal de laboratorio adecuado con el receptor  $\alpha 7$  o un fragmento del mismo y aislar los anticuerpos producidos mediante la inmunización que se unen a  $\alpha 7$ . Un experto en la técnica conoce bien los procedimientos de inmunización y aislamiento. Pueden identificarse los anticuerpos que son agonistas mediante los procedimientos descritos en el presente documento, por ejemplo, combinando los anticuerpos aislados con un macrófago que se ha estimulado para liberar citocinas proinflamatorias, o cualquier otro procedimiento adecuado para evaluar la actividad del receptor  $\alpha 7$ . La inhibición de la liberación de citocinas es indicativa de la actividad agonista. Puede evaluarse la selectividad para  $\alpha 7$  detectando la actividad frente a al menos uno de otro receptor nicotínico o colinérgico, tal como se trató anteriormente. Pueden evaluarse adicionalmente los anticuerpos que se encuentra que son agonistas selectivos para el receptor  $\alpha 7$  para determinar su eficacia en el tratamiento de una o más de las enfermedades inflamatorias descritas en el presente documento, por ejemplo, pruebas *in vitro* o pruebas *in vivo* adicionales en modelos con animales. La presente divulgación también incluye agonistas de anticuerpo selectivos de  $\alpha 7$  identificados mediante este procedimiento.

La presente invención es útil para estudiar células en cultivo, por ejemplo para estudiar el efecto de liberación de citocinas inflamatorias sobre la biología de los macrófagos, o para someter a prueba compuestos para determinar la actividad como agonista colinérgico. Sin embargo, las aplicaciones *in vivo* constituyen muchas de los ejemplos preferidos. En esos ejemplos, la célula está en un paciente que padece, o corre el riesgo de padecer, un estado mediado por una cascada de citocinas inflamatorias. Tal como se usa en el presente documento, un paciente puede ser cualquier mamífero. Sin embargo, en ejemplos preferidos, el paciente es un ser humano.

Usando la presente invención, se puede tratar cualquier estado mediado por una cascada de citocinas inflamatorias. En un ejemplo preferido, el estado es uno en el que la cascada de citocinas inflamatorias se ve afectada por la liberación de citocinas proinflamatorias desde un macrófago. El estado puede ser uno en el que la cascada de citocinas inflamatorias produce una reacción sistémica, tal como con choque séptico. Alternativamente, el estado puede estar mediado por una cascada de citocinas inflamatorias localizada, tal como en la artritis reumatoide.

Ejemplos no limitativos de estados que pueden tratarse de forma útil usando la presente invención incluyen aquellos estados listados en la sección de antecedentes de esta memoria. Preferiblemente, el estado es apendicitis, úlceras pépticas, gástricas o duodenales, peritonitis, pancreatitis, colitis aguda o isquémica, diverticulitis, epiglotitis, acalasia, colangitis, colecistitis, hepatitis, enfermedad de Crohn, enteritis, enfermedad de Whipple, asma, alergia, choque anafiláctico, enfermedad por complejos inmunitarios, isquemia de un órgano, lesión por reperfusión, necrosis de un órgano, rinitis alérgica primaveral, sepsis, septicemia, choque endotóxico, caquexia, hiperpirexia, granuloma eosinófilo, granulomatosis, sarcoidosis, aborto séptico, epididimitis, vaginitis, prostatitis, uretritis, bronquitis, enfisema, rinitis, fibrosis quística, neumonía, silicovulcanoconiosis neumoultramicroscópica, alveolitis, bronquiolitis, faringitis, pleuresía, sinusitis, gripe, virus respiratorio sincitial, herpes, bacteriemia diseminada, infección por VIH, infección por el virus de la hepatitis B, infección por el virus de la hepatitis C, dengue, candidiasis, malaria, filariasis, amebiasis, quistes hidatídicos, quemaduras, dermatitis, dermatomiositis, quemadura solar, urticaria, verrugas, ronchas, vasculitis, angitis, endocarditis, arteritis, aterosclerosis, tromboflebitis, pericarditis, miocarditis, periarteritis nudosa, fiebre reumática, enfermedad celíaca, insuficiencia cardíaca congestiva, síndrome de dificultad respiratoria del adulto, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, meningitis, encefalitis, neuritis, neuralgia, lesión de la médula espinal, parálisis, uveítis, artritis, artralgias, osteomielitis, fascitis, enfermedad de Paget, gota, enfermedad periodontal, artritis reumatoide, sinovitis, miastenia grave, tiroiditis, lupus eritematoso sistémico, síndrome de Goodpasture, síndrome de Behcet, rechazo de aloinjerto, enfermedad de injerto contra huésped, espondilitis anquilosante, enfermedad de Berger, síndrome de Retier o enfermedad de Hodgkin.

En un ejemplo alternativo, el estado es cualquiera de los estados enumerados anteriormente, siempre que el estado no sea colitis ulcerosa, accidente cerebrovascular, diabetes tipo II, enfermedad de Crohn, enfermedad de Alzheimer o un estado cutáneo inflamatorio.

En un ejemplo, el estado es apendicitis, úlceras pépticas, gástricas o duodenales, peritonitis, pancreatitis, hepatitis, enfermedad de Crohn, asma, alergia, choque anafiláctico, isquemia de un órgano, lesión por reperfusión, necrosis de un órgano, rinitis alérgica primaveral, sepsis, septicemia, choque endotóxico, caquexia, aborto séptico, bacteriemia diseminada, quemaduras, enfermedad de Alzheimer, enfermedad celíaca, insuficiencia cardíaca congestiva, síndrome de dificultad respiratoria del adulto, infarto cerebral, embolia cerebral, lesión de la médula espinal, parálisis, rechazo de aloinjerto o enfermedad de injerto contra huésped.

En otro ejemplo, el estado es apendicitis, úlceras pépticas, gástricas o duodenales, peritonitis, pancreatitis, hepatitis, asma, alergia, choque anafiláctico, isquemia de un órgano, lesión por reperfusión, necrosis de un órgano, rinitis alérgica primaveral, sepsis, septicemia, choque endotóxico, caquexia, aborto séptico, bacteriemia diseminada, quemaduras, insuficiencia cardíaca congestiva, síndrome de dificultad respiratoria del adulto, infarto cerebral, embolia cerebral, lesión de la médula espinal, parálisis, rechazo de aloinjerto o enfermedad de injerto contra huésped. En un ejemplo, el estado es sepsis.

Aún en otro ejemplo, el estado se selecciona del grupo que consiste en peritonitis, pancreatitis, isquemia de un órgano, lesión por reperfusión, sepsis, choque endotóxico, caquexia, quemaduras, síndrome de dificultad respiratoria del adulto, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, psoriasis, artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico, isquemia miocárdica y rechazo de aloinjerto.

5 En un ejemplo alternativo, el estado se selecciona del grupo que consiste en peritonitis, pancreatitis, sepsis, choque endotóxico, síndrome de dificultad respiratoria del adulto, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico, isquemia miocárdica, rechazo de aloinjerto, asma, enfermedad de injerto contra huésped, insuficiencia cardíaca congestiva y fibrosis quística.

10 Estos estados se tratan preferiblemente con cualquiera de los compuestos I-VII o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.

15 La vía de administración del agonista colinérgico depende del estado que va a tratarse. Por ejemplo, puede preferirse la inyección intravenosa para el tratamiento de un trastorno sistémico tal como choque séptico, y puede preferirse la administración oral para tratar un trastorno gastrointestinal tal como una úlcera gástrica. El experto puede determinar la vía de administración y la dosificación del agonista colinérgico que va a administrarse sin excesiva experimentación junto con estudios convencionales de dosis-respuesta. Las circunstancias relevantes que han de considerarse al realizar esas determinaciones incluyen el estado o estados que van a tratarse, la elección de la composición que va a administrarse, la edad, el peso y la respuesta del paciente individual, y la gravedad de los síntomas del paciente. Por tanto, dependiendo del estado, el agonista colinérgico puede administrarse por vía oral, por vía parenteral, por vía intranasal, por vía vaginal, por vía rectal, por vía lingual, por vía sublingual, por vía bucal, por vía intrabucal y por vía transdérmica al paciente.

25 En consecuencia, las composiciones de agonista colinérgico diseñadas para la administración oral, lingual, sublingual, bucal e intrabucal pueden prepararse sin excesiva experimentación por medios bien conocidos en la técnica, por ejemplo con un diluyente inerte o con un vehículo comestible. Las composiciones pueden encerrarse en cápsulas de gelatina o comprimirse para dar comprimidos. Para el fin de la administración terapéutica oral, a las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden incorporarse excipientes y usarse en forma de comprimidos, trociscos, cápsulas, elixires, suspensiones, jarabes, obleas y chicles.

30 Los comprimidos, píldoras, cápsulas y trociscos también pueden contener aglutinantes, recipientes, agentes disgregantes, lubricantes, agentes edulcorantes y agentes aromatizantes. Algunos ejemplos de aglutinantes incluyen celulosa microcristalina, goma tragacanto o gelatina. Los ejemplos de excipientes incluyen almidón o lactosa. Algunos ejemplos de agentes disgregantes incluyen ácido algínico y almidón de maíz. Los ejemplos de lubricantes incluyen estearato de magnesio o estearato de potasio. Un ejemplo de un deslizante es dióxido de silicio coloidal. Algunos ejemplos de agentes edulcorantes incluyen sacarosa y sacarina. Los ejemplos de agentes aromatizantes incluyen menta, salicilato de metilo y aroma de naranja y similares. Los materiales usados en la preparación de estas diversas composiciones deben ser farmacéuticamente puros y no tóxicos en las cantidades usadas.

35 Las composiciones de agonista colinérgico encontrados por los procedimientos de la presente invención pueden administrarse fácilmente por vía parenteral, tal como por ejemplo, mediante inyección intravenosa, intramuscular, intratecal o subcutánea. Puede lograrse la administración parenteral incorporando las composiciones de agonista colinérgico de la presente invención en una disolución o suspensión. Tales disoluciones o suspensiones también pueden incluir diluyentes estériles tales como agua para inyección, solución salina, aceites fijos, polietilenglicoles, glicerina, propilenglicol u otros disolventes sintéticos. Las formulaciones parenterales también pueden incluir agentes antibacterianos tales como, por ejemplo, alcohol bencílico o metilparabenos, antioxidantes tales como, por ejemplo, ácido ascórbico o bisulfito de sodio y agentes quelantes tales como EDTA. También pueden añadirse tampones tales como acetatos, citratos o fosfatos y agentes para el ajuste de la tonicidad, tales como cloruro de sodio o dextrosa. La preparación parenteral puede encerrarse en ampollas, jeringas desechables o viales de múltiples dosis compuestos por vidrio o plástico.

50 La administración rectal incluye administrar las composiciones farmacéuticas en el recto o el intestino grueso. Esto puede lograrse usando supositorios o enemas. Las formulaciones de supositorio pueden prepararse fácilmente mediante procedimientos conocidos en la técnica. Por ejemplo, pueden prepararse formulaciones de supositorio calentando glicerina hasta aproximadamente 120°C, disolviendo el agonista colinérgico en la glicerina, mezclando la glicerina calentada tras lo cual puede añadirse agua purificada, y vertiendo la mezcla caliente en un molde para supositorios.

La administración transdérmica incluye la absorción percutánea del agonista colinérgico a través de la piel. Las formulaciones transdérmicas incluyen parches (tales como el famoso parche de nicotina), pomadas, cremas, geles y ungüentos.

- 5 Administrar por vía nasal o administración nasal incluye administrar el agonista colinérgico a las membranas mucosas de las fosas nasales o la cavidad nasal del paciente. Las composiciones farmacéuticas para la administración nasal de un agonista colinérgico incluyen cantidades terapéuticamente eficaces del agonista preparado mediante procedimientos bien conocidos que va a administrarse, por ejemplo, como un aerosol nasal, gotas nasales, suspensión, gel, pomada, crema o polvo. La administración del agonista colinérgico puede tener lugar usando un tapón nasal o una esponja nasal.
- Tal como se trató previamente, los agonistas colinérgicos preferidos para esos procedimientos son selectivos o específicos para el receptor  $\alpha 7$ , incluyendo por ejemplo DMXB-A (compuesto (V)), metyoduro de cocaína.
- 10 La presente divulgación, que comprende la invención también se refiere a procedimientos para determinar si un compuesto es un agonista colinérgico reactivo con un receptor  $\alpha 7$  nicotínico. Los procedimientos comprenden la determinación de si el compuesto inhibe la liberación de una citoquina proinflamatoria de una célula de mamífero. En estos procedimientos, un compuesto que inhibe la liberación de la citoquina proinflamatoria de la célula de mamífero es un agonista colinérgico reactivo con un receptor  $\alpha 7$  nicotínico.
- 15 Estos procedimientos implican preferiblemente el tratamiento de la célula de mamífero con el compuesto junto con un agente que estimula una cascada de citoquinas proinflamatorias. Un agente preferido es el lipopolisacárido bacteriano (LPS). El compuesto se puede administrar a la célula de mamífero, ya sea antes que el agente, al mismo tiempo que el agente de, o después del agente. Preferiblemente, el compuesto se administra antes que el agente. Véase, por ejemplo, la solicitud de patente US nº 09/855.446.
- 20 En un ejemplo de la presente divulgación, los compuestos que se determinan para ser agonistas  $\alpha 7$  se ponen a prueba adicionalmente para la capacidad de activar al menos otro subtipo de receptor nicotínico, con el fin de determinar si el agonista  $\alpha 7$  es selectivo o específico. Los compuestos de ensayo que activan selectivamente o específicamente el subtipo  $\alpha 7$  pueden ser sometidos adicionalmente a pruebas más avanzadas, por ejemplo, pruebas in vitro o pruebas in vivo adicionales en modelos animales para evaluar más a fondo la idoneidad de los compuestos para el tratamiento de sujetos con trastornos inflamatorios.
- 25 Estos procedimientos no se limitan estrictamente a cualquier compuesto particular a ensayar. Aunque la mayoría de los agonistas colinérgicos ahora conocidos son moléculas pequeñas, la actividad agonista  $\alpha 7$  podría estar presente en una proteína (por ejemplo, un anticuerpo, como se analiza anteriormente), un oligonucleótido o mimético (por ejemplo, un aptámero) o cualquier otro compuesto. Estos procedimientos son adecuados para probar alguno de esos potenciales agonistas  $\alpha 7$ .
- 30 Para estos procedimientos, la célula puede ser cualquier célula que puede ser inducida a producir una citoquina proinflamatoria. En realizaciones preferidas, la célula es una célula inmune, por ejemplo, macrófagos, monocitos, o neutrófilos. En las realizaciones más preferidas, la célula es un macrófago.
- La citoquina proinflamatoria a ser medido para la inhibición puede ser cualquier citoquina proinflamatoria que puede ser inducido a ser liberado de la célula. En realizaciones preferidas, la citoquina es TNF.
- 35 Evaluación de la inhibición de la producción de citoquinas puede ser por cualquier medio conocido, incluyendo la cuantificación de la citoquina (por ejemplo, ELISA), o por bioensayo, (por ejemplo, la determinación de si se reduce la actividad de citoquinas proinflamatorias), o por medición del ARNm de citocinas proinflamatorias. El experto en la materia podría utilizar cualquiera de estos ensayos sin experimentación indebida. Véase también la solicitud de patente US nº 09/855.446 para ejemplos de varios ensayos útiles a este respecto.
- 40 Estos procedimientos se pueden llevar a cabo in vivo, donde un animal, por ejemplo, una rata, se trata con el compuesto junto con un agente que estimula una cascada de citoquinas proinflamatorias, y el efecto del agente sobre la inducción de la cascada de citoquinas proinflamatorias se mide, por ejemplo, mediante la medición de los niveles de TNF en suero. Sin embargo, debido a la relativa facilidad de hacer estos tipos de ensayos con células de cultivo en lugar de con animales enteros, los procedimientos se llevan a cabo preferiblemente in vitro, por ejemplo,
- 45 usando cultivos de macrófagos.
- En los ejemplos relacionados de la presente divulgación, la invención está dirigida a procedimientos para determinar si un compuesto es un antagonista colinérgico reactivo con un receptor  $\alpha 7$  nicotínico. Estos procedimientos comprenden la determinación de si el compuesto reduce la capacidad de un agonista colinérgico para inhibir la liberación de una citoquina proinflamatoria de una célula de mamífero. En estos ejemplos, un compuesto que reduce la capacidad de un agonista colinérgico para inhibir la liberación de una citoquina proinflamatoria de una célula de mamífero es un antagonista colinérgico reactivo con un receptor  $\alpha 7$ .
- 50

Estos procedimientos implican preferiblemente el tratamiento de la célula de mamífero con el compuesto junto con un agonista  $\alpha 7$  y un agente que estimula una cascada de citoquinas proinflamatorias. Por lo tanto, estos procedimientos son esencialmente como los procedimientos descritos inmediatamente antes, excepto que el compuesto del ensayo anterior es un agonista  $\alpha 7$  que inhibe la liberación de citoquinas proinflamatorias de la célula que es inducida por el agente de otro modo. El compuesto de ensayo se evalúa para determinar si se puede evitar que el agonista  $\alpha 7$  inhiba la cascada de citoquinas proinflamatorias causada por el agente (por ejemplo, LPS). Las células y el agente pueden ser como se describe para los procedimientos inmediatamente anteriores; el agonista  $\alpha 7$  puede ser cualquier agonista  $\alpha 7$  selectivo, específico o no específico conocido, por ejemplo, la nicotina o DMXB-A. También como con los procedimientos inmediatamente anteriores, estos procedimientos se pueden llevar a cabo in vivo pero se llevan a cabo preferiblemente in vitro.

Al igual que con el procedimiento inmediatamente anterior, el compuesto que está siendo probado para la actividad antagonista  $\alpha 7$  no se limita a compuestos de bajo peso molecular, pero podría incluir cualquier compuesto, incluyendo proteínas, oligopéptidos, o miméticos de oligopéptidos. También como con el procedimiento inmediatamente anterior, la evaluación de la eficacia del compuesto de ensayo, midiendo la inhibición de la producción de citoquinas, puede ser por cualquier medio conocido, incluyendo la cuantificación de la citoquina (por ejemplo, con ELISA), o por bioensayo, (por ejemplo, determinar si la actividad de citoquinas proinflamatorias se reduce), o por medición del ARNm de citocinas proinflamatorias. El experto en la materia podría utilizar cualquiera de estos ensayos sin experimentación indebida.

En otro ejemplo, la presente divulgación se refiere a procedimientos para determinar si un compuesto de ensayo tiene la capacidad de inhibir la inflamación. En algunos aspectos, estos procedimientos comprenden la determinación de si el compuesto de ensayo es un agonista colinérgico reactivo con un receptor  $\alpha 7$  nicotínico. Preferiblemente, los procedimientos comprenden además la determinación de si el compuesto de ensayo es selectivo para  $\alpha 7$  probando el compuesto de prueba por su capacidad para activar al menos otro receptor nicotínico. Estas determinaciones se pueden hacer como se describe anteriormente, por ejemplo, mediante la determinación de si el compuesto inhibe la liberación de una citoquina proinflamatoria de una célula de mamífero, preferiblemente un macrófago.

En otros aspectos, los procedimientos para determinar si un compuesto de ensayo tiene la capacidad de inhibir la inflamación comprenden determinar si el compuesto de ensayo inhibe la unión de un antagonista de un receptor  $\alpha 7$  nicotínico, por ejemplo mediante la determinación de si el compuesto de ensayo inhibe la unión de FITC- $\alpha$ -bungarotoxina de un macrófago. Véase el Ejemplo 1, en donde en algunas realizaciones, el procedimiento utilizaría el procedimiento de la tinción de  $\alpha$ -bungarotoxina y de microscopía confocal, excepto que se añadiría el compuesto de prueba para determinar si el compuesto inhibiría la unión de la  $\alpha$ -bungarotoxina a los macrófagos.

En algunos casos, puede ser deseable restringir la capacidad de una célula de mamífero para inhibir la liberación de citoquinas proinflamatorias. Ejemplos de estos casos son cuando se desean que las citocinas proinflamatorias prevengan o combatan el cáncer, o cuando se está estudiando los efectos fisiológicos de los receptores  $\alpha 7$ . La presente divulgación se dirige por lo tanto también a procedimientos de inhibición de la atenuación de la liberación de una citoquina proinflamatoria de una célula de mamífero tras la exposición de la célula a un agonista colinérgico. Los procedimientos comprenden el tratamiento de la célula con un agente que inhibe la unión del agonista colinérgico a un receptor  $\alpha 7$ . Al igual que con los procedimientos descritos anteriormente, la célula preferida para estos procedimientos es un macrófago.

El experto en la técnica podría imaginar varias maneras para poder inhibir la unión del agonista colinérgico al receptor  $\alpha 7$  en una célula. Ejemplos incluyen el tratamiento de la célula con un antagonista de  $\alpha 7$ ; el tratamiento de la célula con un anticuerpo o aptámero que se une al receptor  $\alpha 7$ , evitando la unión del agonista al receptor colinérgico; o, preferiblemente, el tratamiento de la célula con un oligonucleótido antisentido o mimético que es complementaria al ARNm  $\alpha 7$  y capaz de inhibir la traducción del ARNm para el receptor  $\alpha 7$ . Véase el Ejemplo 1 para la evidencia de la eficacia de un mimético de tales antisentido. Tal como se usa en el presente documento, un mimético es un análogo de oligonucleótido que difiere químicamente a partir de un oligonucleótido de origen natural, pero que es capaz de una unión no covalente del tipo oligonucleótido a una secuencia de nucleótidos complementaria. Véase, por ejemplo, la patente nº 6.436.909 para una discusión de los miméticos útiles. En un ejemplo preferido el agente es un oligonucleótido mimético fosforotionato, complementario al gen  $\alpha 7$  relevante. Se proporciona el gen  $\alpha 7$ , por ejemplo, en Peng et al., 1994. Un ejemplo de una secuencia antisentido útil es 5'-gcagcgatgttgagtcccg-3' (véase el Ejemplo 1) o una secuencia similar, preferentemente rodeando el codón de iniciación de la traducción del gen de la subunidad  $\alpha 7$  humano.

Por lo tanto, la divulgación también se refiere a oligonucleótidos o miméticos capaces de inhibir la atenuación de lipopolisacárido inducida por la liberación de TNF a partir de un macrófago de mamíferos tras la exposición de los macrófagos a un agonista colinérgico. Los oligonucleótidos o miméticos comprenden una secuencia con más de 5 nucleótidos de longitud que es complementaria a un ARNm de un receptor  $\alpha 7$ . Preferiblemente, los oligonucleótidos

o miméticos son complementarios a la región de iniciación de la transcripción del mRNA  $\alpha 7$ . Lo más preferiblemente, el oligonucleótido o mimético comprende la secuencia 5'-gcagcgcattgttgagtcg-3'.

### Ejemplo 1. Receptor nicotínico $\alpha 7$ como sustrato molecular de la sinapsis neuroinmunitaria

#### Resumen del ejemplo

5 En el presente documento, se informa de que se requiere la subunidad  $\alpha 7$  del receptor nicotínico para la inhibición por acetilcolina de la liberación de TNF desde macrófagos. La  $\alpha$ -bungarotoxina se une a agrupaciones diferenciadas de receptores expresadas en la superficie de macrófagos primarios humanos. La inmunotransferencia de tipo Western con anticuerpos específicos para  $\alpha 7$  confirmó la identidad de la subunidad  $\alpha 7$  en proteínas aisladas mediante adherencia a perlas conjugadas con  $\alpha$ -bungarotoxina. La exposición de macrófagos a oligonucleótidos antisentido para  $\alpha 7$  disminuyó la unión a  $\alpha$ -bungarotoxina y restauró la liberación de TNF en presencia de nicotina. 10 Los ratones deficientes en la subunidad  $\alpha 7$  del receptor nicotínico produjeron significativamente más TNF, IL-1 $\beta$  e IL-6 durante endotoxemia, en comparación con ratones de tipo natural. Los macrófagos aislados de ratones deficientes en  $\alpha 7$  no respondieron a los agonistas colinérgicos, y continuaron produciendo TNF. Finalmente, la estimulación eléctrica del nervio vago usando un protocolo que inhibía la liberación de TNF en ratones de tipo natural no inhibió la liberación de TNF en ratones deficientes en  $\alpha 7$ . Por tanto, la subunidad  $\alpha 7$  del receptor nicotínico de acetilcolina es esencial para la inhibición colinérgica de las citocinas proinflamatorias. 15

#### Resultados y discusión

20 Como primera etapa en la identificación del receptor de macrófagos implicado en la inhibición de la liberación de citocinas proinflamatorias, se marcaron macrófagos primarios humanos con FITC- $\alpha$ -bungarotoxina, un antagonista peptídico que se une a un subgrupo de receptores nicotínicos colinérgicos (Lindstrom, 1995; Leonard & Bertrand, 2001). Se observó una fuerte unión de la  $\alpha$ -bungarotoxina en la superficie del macrófago (figura 1a). El pretratamiento con nicotina redujo marcadamente la intensidad de unión (figura 1b). En las uniones neuromusculares y las sinapsis neuronales, los receptores nicotínicos forman agregados o agrupaciones de receptores que facilitan la rápida transmisión de señales (Lin *et al.*, 2001; Feng *et al.*, 1998; Shoop *et al.*, 2000). Pueden observarse claramente 25 agrupaciones diferenciadas de unión a  $\alpha$ -bungarotoxina con alto aumento en la superficie de los macrófagos, concentradas especialmente en la superficie del cuerpo celular (figura 1c, d).

Hasta la fecha,  $\alpha 1$ ,  $\alpha 7$  y  $\alpha 9$  son las subunidades del receptor nicotínico de unión a  $\alpha$ -bungarotoxina conocidas en las células humanas (Lindstrom, 1995; Leonard y Bertrand, 2001). Las subunidades  $\alpha 1$  junto con  $\beta 1$ ,  $\delta$  y  $\epsilon$  o bien  $\nu$  (adulto) o bien  $\gamma$  (fetal), forman receptores nicotínicos heteropentaméricos que regulan la contracción muscular;  $\alpha 7$  y  $\alpha 9$  pueden formar cada una receptores nicotínicos homopentaméricos (Lindstrom, 1995; Leonard y Bertrand, 2001). Para determinar si estas subunidades del receptor se expresan en macrófagos, se aisló ARN de macrófagos primarios humanos diferenciados *in vitro* a partir de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y se llevaron a cabo análisis por RT-PCR. Para aumentar la sensibilidad y especificidad de los experimentos, se llevaron a cabo dos rondas de PCR tras la transcripción inversa, usando cebadores anidados específicos para cada subunidad. Se confirmaron las identidades de los productos de PCR mediante secuenciación. Se detectó la expresión tanto de  $\alpha 1$ ,  $\alpha 10$ , (datos no mostrados) como  $\alpha 7$  (figura 2a). Se detectó ARNm en macrófagos humanos derivados de donantes de sangre no relacionados. La misma estrategia de RT-PCR no detectó la expresión de ARNm de la subunidad  $\alpha 9$  en los macrófagos (datos no mostrados). 30

A continuación, se examinó la expresión de proteína de las subunidades  $\alpha 1$  y  $\alpha 7$  mediante inmunotransferencia de tipo Western. El anticuerpo específico de  $\alpha 7$  reconoció una banda clara con un peso molecular aparente de aproximadamente 55 kD (similar al peso molecular publicado para la proteína  $\alpha 7$  [Peng *et al.*, 1994; Drisdell y Green, 2000]) tanto a partir de macrófagos primarios diferenciados como de PBMC no diferenciadas (datos no mostrados). La expresión de la proteína  $\alpha 1$  se reguló por disminución hasta niveles indetectables durante la diferenciación *in vitro* de PBMC en macrófagos (datos no mostrados). La subunidad  $\delta$ , a un componente necesario del receptor nicotínico de acetilcolina heteropentamérico  $\alpha 1$  no pudo detectarse mediante esta estrategia de RT-PCR anidada (datos no mostrados). Para confirmar que las señales positivas en los macrófagos representaban el receptor nicotínico  $\alpha 7$  que se une a  $\alpha$ -bungarotoxina, se usaron perlas conjugadas a  $\alpha$ -bungarotoxina para examinar las interacciones (*pull down*) de proteínas preparadas a partir de o bien macrófagos humanos o bien células PC 12 (células de feocromocitoma de rata, que se ha mostrado que expresan el homopentámero de  $\alpha 7$  [Drisdel y Green, 2000]). Se analizaron las proteínas retenidas mediante inmunotransferencia de tipo Western usando anticuerpos específicos de  $\alpha 7$  policlonales o monoclonales que reconocían la proteína  $\alpha 7$  tanto humana como de rata (las proteínas  $\alpha 7$  humana y de rata contienen el mismo número de aminoácidos y son idénticas en un 94% [Peng *et al.*, 1994; Seguela *et al.*, 1993]). Los resultados mostraron claramente que los macrófagos humanos expresan la proteína  $\alpha 7$  que se une a  $\alpha$ -bungarotoxina con un peso molecular aparente que es similar al de la subunidad  $\alpha 7$  en células PC 12 (figura 2b). Se confirmó la identidad de la subunidad  $\alpha 7$  de macrófagos mediante la clonación de la  $\alpha 7$  expresada por macrófagos de longitud completa mediante procedimientos de RT-PCR. La subunidad  $\alpha 7$  de acetilcolina nicotínica de longitud 55

completa en macrófagos contiene los exones 1 a 10, idénticos a los de la subunidad  $\alpha 7$  de acetilcolina nicotínica expresada en las neuronas (Gault *et al.*, 1998). En conjunto, estos datos identifican la subunidad  $\alpha 7$  de acetilcolina nicotínica como el receptor de unión a  $\alpha$ -bungarotoxina expresado en la superficie de macrófagos humanos.

5 Para estudiar si se requiere el receptor  $\alpha 7$  para la inhibición colinérgica de la liberación de TNF, se sintetizaron oligonucleótidos antisentido de fosforotioato que rodeaban el codón de iniciación de la traducción del gen de la subunidad  $\alpha 7$  humana. Se sintetizaron oligonucleótidos antisentido para regiones similares de los genes de la subunidad  $\alpha 1$  y  $\alpha 10$  como controles. Los macrófagos expuestos a los oligonucleótidos antisentido específicos para  $\alpha 7$  (AS $\alpha 7$ ) respondieron significativamente menos a la acción inhibitoria de TNF de la nicotina (figura 3a). Los oligonucleótidos antisentido para la subunidad  $\alpha 7$  de acetilcolina nicotínica restauraron la liberación de TNF desde  
10 macrófagos en presencia de nicotina. La exposición de macrófagos a AS $\alpha 7$  no estimuló la síntesis de TNF en ausencia de LPS y nicotina. Los oligonucleótidos antisentido para las subunidades  $\alpha 1$  (AS $\alpha 1$ ) y  $\alpha 10$  (AS $\alpha 10$ ), en condiciones similares, no cambiaron significativamente el efecto de la nicotina sobre la liberación de TNF inducida por LPS (figura 3b, c), indicando que la supresión de TNF por nicotina es específica para la subunidad  $\alpha 7$  del receptor nicotínico de acetilcolina. Conjuntos adicionales de oligonucleótidos antisentido para  $\alpha 7$ ,  $\alpha 1$  y  $\alpha 10$   
15 proporcionaron resultados similares (datos no mostrados). La adición de oligonucleótidos antisentido para la subunidad  $\alpha 7$  de acetilcolina nicotínica a cultivos de macrófagos disminuyó la unión en superficie de  $\alpha$ -bungarotoxina marcada con FITC (figura 3d, e). En conjunto, estos datos indican que la subunidad  $\alpha 7$  del receptor nicotínico de acetilcolina es necesaria para la inhibición dependiente de la ruta antiinflamatoria colinérgica de la liberación de TNF en macrófagos.

20 Los macrófagos son la principal fuente de TNF producido en respuesta a la endotoxina bacteriana *in vivo* (Bianchi *et al.*, 1995; Kumins *et al.*, 1996). Para investigar si la subunidad  $\alpha 7$  del receptor nicotínico de acetilcolina es esencial para la ruta antiinflamatoria colinérgica *in vivo*, se midió la producción de TNF en ratones deficientes en el gen de  $\alpha 7$  generados mediante tecnología de desactivación genética (Orr-Urtreger *et al.*, 1997). Los ratones que carecían de la subunidad  $\alpha 7$  del receptor se desarrollaron normalmente y no mostraron defectos anatómicos macroscópicos (id.; Franceschini *et al.*, 2000). El nivel de TNF en suero en los ratones deficientes en la subunidad  $\alpha 7$  expuestos a endotoxina fue más de 5 veces superior al de los ratones control de tipo natural (TNF en suero en el tipo natural =  $2,3 \pm 0,3$  ng ml<sup>-1</sup> frente a TNF en suero en ratones deficientes en  $\alpha 7$  =  $12,2 \pm 4,7$  ng ml<sup>-1</sup>,  $p < 0,05$  (prueba de la t de dos colas) (figura 4a). La producción de TNF en el hígado y el bazo también fue superior en los ratones deficientes (figura 4b, c), lo que indica una función crítica de la subunidad  $\alpha 7$  del receptor nicotínico de acetilcolina en la regulación de las respuestas inflamatorias *in vivo*. Los ratones deficientes en la subunidad  $\alpha 7$  endotoxémicos también produjeron niveles significativamente superiores de IL-1 $\beta$  (figura 4d) e IL-6 (figura 4e) en comparación con los ratones de tipo natural. Los macrófagos derivados de ratones deficientes en la subunidad  $\alpha 7$  tampoco respondieron a los agonistas colinérgicos, y produjeron TNF de forma normal en presencia de nicotina o acetilcolina (tabla 1). Por tanto, la expresión de la subunidad  $\alpha 7$  del receptor nicotínico de acetilcolina en macrófagos es esencial  
35 para la modulación colinérgica de TNF.

TABLA 1. Producción de TNF por macrófagos peritoneales de tipo natural y deficientes en  $\alpha 7$

| Tratamiento                 | TNF – ng ml <sup>-1</sup> |                          |
|-----------------------------|---------------------------|--------------------------|
|                             | Tipo natural              | Deficiente en $\alpha 7$ |
| Control                     | 0,004 $\pm$ 0,0005        | 0,004 $\pm$ 0,0004       |
| LPS                         | 16,8 $\pm$ 2,3            | 18,1 $\pm$ 4,9           |
| LPS + nicotina (1 $\mu$ M)  | 5,2 $\pm$ 0,9*            | 17,8 $\pm$ 0,6           |
| LPS + nicotina (10 $\mu$ M) | 7,3 $\pm$ 1,0*            | 17,4 $\pm$ 2,9           |
| LPS + Ach (1 $\mu$ M)       | 10,3 $\pm$ 1,1            | 20,4 $\pm$ 3,8           |
| LPS + Ach (1 $\mu$ M)       | 5,7 $\pm$ 0,9*            | 21,4 $\pm$ 2,4           |

40 Se estimularon macrófagos peritoneales aislados de ratones de tipo natural inducidos con tioglicolato o ratones deficientes en la subunidad  $\alpha 7$  del receptor nicotínico de acetilcolina con LPS (100 ng/ml) durante 4 h en cultivo. Control: cultivos de macrófagos no estimulados. Cuando estaba indicado, se añadieron nicotina o acetilcolina (Ach) 5-10 min. antes del LPS. Se midieron los niveles de TNF mediante ELISA; los datos mostrados son la media  $\pm$  e.e.m. n = 8 por grupo. \* = significativamente diferente de LPS a  $p < 0,05$  mediante una prueba de la t de dos colas.

45 Para determinar si se requiere la subunidad  $\alpha 7$  del receptor nicotínico de acetilcolina para la inhibición por el nervio vago del TNF sistémico, se aplicó estimulación eléctrica (Borovikova *et al.*, 2000) a los nervios vagos de ratones deficientes en la subunidad  $\beta 7$  o de tipo natural endotoxémicos. La estimulación eléctrica del nervio vago atenuó significativamente los niveles de TNF en suero inducido por endotoxina en ratones de tipo natural (figura 5). La estimulación del nervio vago usando este protocolo en ratones deficientes en la subunidad  $\alpha 7$  del receptor nicotínico de acetilcolina, sin embargo, no pudo reducir los niveles de TNF en suero durante endotoxemia (figura 5). Por tanto, una respuesta funcional frente a la estimulación del nervio vago *in vivo* requiere las subunidades  $\alpha 7$  del receptor nicotínico de acetilcolina para inhibir la liberación de TNF.

Estas observaciones tienen varias implicaciones en la comprensión de la regulación de la inflamación y la liberación de TNF, y para el diseño de futuros agentes terapéuticos. Los datos previos indican que la subunidad  $\alpha 7$  del receptor nicotínico de acetilcolina forma receptores homopentaméricos que están implicados en la rápida señalización química entre células (Lindstrom, 1995; Leonard & Bertrand, 2001; Le Novère & Changeux, 1995). Los receptores nicotínicos  $\alpha 7$  de acetilcolina neuronales son altamente permeables al calcio (Vijayaraghavan *et al.*, 1992; Shoop *et al.*, 2001), y hemos observado que la nicotina induce un flujo de entrada de calcio transitorio en los macrófagos (datos no mostrados). El/los papel(es) de este aumento del flujo de calcio y los mecanismos intracelulares para inhibir la liberación de TNF requieren un estudio adicional. La perturbación de la expresión de la subunidad  $\alpha 7$  del receptor nicotínico de acetilcolina *in vivo* aumentó significativamente la liberación de TNF inducida por endotoxina e hizo ineficaz el estimulador del nervio vago como procedimiento para inhibir la liberación de TNF. Esto indica que el producto del gen de la subunidad  $\alpha 7$  del receptor nicotínico de acetilcolina es esencial para la regulación por el nervio vago de la liberación aguda de TNF durante la respuesta inflamatoria sistémica frente a la endotoxemia. Parece que la liberación de acetilcolina desde las terminaciones del nervio vago, o quizá otras fuentes (por ejemplo, linfocitos o células epiteliales) puede inhibir específicamente la activación de los macrófagos. Existe la posibilidad de desarrollar agonistas colinérgicos que seleccionan como diana las subunidades  $\alpha 7$  del receptor nicotínico de acetilcolina en células inmunitarias periféricas para su uso como agentes antiinflamatorios para inhibir la liberación de TNF. También puede ser factible desarrollar estimuladores del nervio vago con actividad antiinflamatoria; los dispositivos similares son clínicamente seguros y se usan en el tratamiento de algunos pacientes con trastornos convulsivos. El TNF es una diana farmacológica clínicamente validada para la artritis reumatoide y la enfermedad de Crohn, de modo que parece razonable considerar una estrategia de inhibición de TNF que seleccione como diana la subunidad  $\alpha 7$  del receptor nicotínico de acetilcolina.

#### Procedimientos

Tinción de  $\alpha$ -bungarotoxina y microscopía confocal. Se llevó a cabo el aislamiento y cultivo de macrófagos humanos tal como se describió anteriormente (Borovikova *et al.*, 2000). Se diferenciaron las células durante siete días en presencia de MCSF (2 ng/ml) en medio de cultivo completo (RPMI 1640 con un 10% de suero humano inactivado por calor). Se incubaron los macrófagos diferenciados con  $\alpha$ -bungarotoxina marcada con FITC a 1,5  $\mu\text{g ml}^{-1}$  (SIGMA) en el medio de cultivo celular a 4°C durante 15 min. Cuando estaba indicado, se añadió nicotina a una concentración final de 500  $\mu\text{M}$  antes de la adición de  $\alpha$ -bungarotoxina. Se lavaron las células tres veces con medio RPMI (GIBCO) y luego se fijaron durante 15 min. a temperatura ambiente en disolución de paraformaldehído al 4%-PBS (pH 7,2). Tras la fijación, se lavaron las células con PBS una vez y se montaron para la visualización con el microscopio de fluorescencia confocal.

RT-PCR. Se preparó ARN total a partir de macrófagos humanos diferenciados *in vitro* usando reactivo TRIzol. Se llevó a cabo la transcripción inversa y la primera ronda de PCR usando el kit de RT-PCR Titan One Tube (Roche Molecular Biochemicals) según el protocolo del fabricante. Se llevó a cabo la segunda ronda de PCR anidada usando la mezcla madre para PCR Promega 2x. Se sometieron a electroforesis los productos de PCR procedentes de la PCR anidada sobre un gel de agarosa y se recuperaron usando el kit Gene Clean III (Biolab) y se enviaron a secuenciación para confirmar los resultados. Los conjuntos de cebadores para la transcripción inversa y la primera ronda de PCR fueron:  $\alpha 1$ : cebador sentido 5'-CCAGACCTGAGCAACTTCATGG-3', cebador antisentido 5'-AATGAGTC GACCTGCAAACACG-3';  $\alpha$ : cebador sentido 5'-GACTGTTTCGTTTCCAGATGG-3', cebador antisentido 5'-AC GAAGTTGGGAGCCGACATCA-3';  $\alpha 9$ : cebador sentido 5'-CGAGATCAGTACGATGGCCTAG-3', cebador antisentido 5'-TCTGTGACTAATCCGCTCTTGC-3'. Los conjuntos de cebadores para la PCR anidada fueron:  $\alpha 1$ : cebador sentido 5'-ATCACCTACCACTTCGTCATGC-3', cebador antisentido 5'-GTATGTGGTCCATCACCATTGC-3';  $\alpha 7$ : cebador sentido 5'-CCCGGAAGAGGAGTGAAAGGT-3', cebador antisentido 5'-TGAGATGATGGTGAA GACC-3';  $\alpha$ : cebador sentido 5'-AGAGCCTGTGAACACCAATGTGG-3', cebador antisentido 5'-ATGACTTTCCG CACCTTCTTCC-3'. Para la clonación del ADNc de  $\alpha 7$  de longitud completa, se usaron los siguientes cebadores: 5' AGGTGCCTCTGTGGCCGCA 3' con 5' GACTACTCAG-TGGCCCTG 3'; 5' CGACACGGAGACGTGGAG 3' con 5' GGTACGGATG-TGCCAAGGAGT 3'; 5' CAAGGATCCGGACTCAACATGCGCTGCTCG 3' con 5' CGGCTC GAGTACCAGTGTGGTTACGCAAAGTC 3'.

Inmunotransferencia de tipo Western y ensayo "pull-down" de  $\alpha$ -bungarotoxina. Se prepararon lisados celulares incubando PC12 o macrófagos primarios humanos con tampón de lisis (NaCl 150 mM, EDTA 5 mM, Tris 50 mM pH 7,4, 0,02% de azida sódica, 1% de Triton X-100 y cóctel de inhibidores de proteasas) en hielo durante 90 min. Se cargaron cantidades iguales de proteína total en geles de SDS-PAGE para la inmunotransferencia de tipo Western o bien con anticuerpo específico de  $\alpha 7$  (Santa Cruz sc-1447) o bien anticuerpo monoclonal de  $\alpha 1$  (Oncogene). Para el ensayo "pull-down" de  $\alpha$ -bungarotoxina, se conjugó  $\alpha$ -bungarotoxina (SIGMA) con perlas de Sepharose activadas con CNBr (Pharmacia) y luego se incubaron con los lisados celulares a 4°C durante la noche. Se lavaron las perlas y las proteínas unidas cuatro veces con tampón de lisis y se analizaron mediante inmunotransferencia de tipo Western con anticuerpos específicos de  $\alpha 7$  (policlonal: Santa Cruz H-302, monoclonal: Sigma M-220).

Experimentos con oligonucleótidos antisentido. Se sintetizaron oligonucleótidos antisentido de fosforotioato y se purificaron mediante Genosys. Las secuencias de los oligonucleótidos son: AS $\alpha 7$ : 5'-gcagcgcgatgttgagcccg-3'; AS $\alpha 1$ :

5'-gggctccatgggctaccgga-3'; AS $\alpha$ 10: 5'-ccccatggccctggcactgc-3'. Estas secuencias cubren las regiones de iniciación de la traducción divergentes de los genes de  $\alpha$ 7,  $\alpha$ 1 y  $\alpha$ 10. Se llevó a cabo el suministro de los oligonucleótidos antisentido como en Cohen *et al.* (1997) a una concentración 1  $\mu$ M de los oligonucleótidos durante 24 h. Para experimentos de cultivo celular, se lavaron los cultivos de macrófagos pretratados con oligonucleótidos con medio nuevo y se estimularon con LPS 100 ng ml<sup>-1</sup> con o sin nicotina (1  $\mu$ M, añadida 5-10 min. antes del LPS). Cuatro horas después de añadir LPS, se midieron las cantidades de TNF liberado mediante el ensayo de L929 y luego se verificaron mediante ELISA para TNF. Para la tinción de la  $\alpha$ -bungarotoxina, se lavaron las células pretratadas y se procesaron para la tinción de FITC- $\alpha$ -bungarotoxina tal como se describió anteriormente. La nicotina y otros agonistas de la subunidad  $\alpha$ 7 del receptor nicotínico de acetilcolina también inhibieron significativamente la liberación de TNF inducida por LPS en la línea de células similares a macrófagos murina RAW264.7 (datos no mostrados).

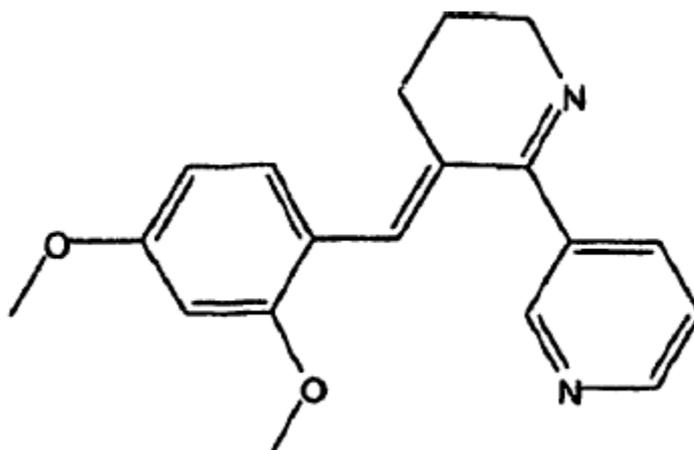
Ratones deficientes en el receptor nicotínico  $\alpha$ 7. Se adquirieron ratones deficientes en el receptor nicotínico  $\alpha$ 7 (origen C57BL/6) y crías de tipo natural de The Jackson Laboratory (B6.1297-Chrna<sup>7tm1Bay</sup>, n<sup>o</sup> 003232). Se establecieron líneas reproductoras de ratones de tipo natural o ratones deficientes homocigóticos para obtener las progenies. Se usaron ratones macho o hembra de aproximadamente 8 a 12 semanas de edad (junto con controles de tipo natural con edad y sexo coincidentes) para los experimentos con endotoxina. Se pesaron individualmente los ratones y se les administró en consecuencia LPS 0,1 mg kg<sup>-1</sup> (i.p.). Para los experimentos con TNF, se extrajeron sangre, el hígado y el bazo una hora tras la administración de LPS. Para los experimentos con IL-1 $\beta$  e IL-6, se extrajeron muestras de sangre cuatro horas tras la administración de LPS. Se midieron las cantidades de TNF, IL-1 $\beta$  e IL-6 mediante ELISA. Se confirmaron los genotipos de los ratones mediante estrategias de PCR genómicas. Se aislaron los macrófagos peritoneales de ratones macho y hembra de tipo natural y deficientes en  $\alpha$ 7 inducidos con tioglicolato (48 horas) de aproximadamente 8 semanas de edad (n = 8/grupo). Se reunieron los macrófagos para cada grupo y se cultivaron durante la noche. Se añadieron nicotina y acetilcolina 5-10 min. antes de la administración de LPS (100 ng ml<sup>-1</sup>). Se añadió bromuro de piridostigmina (100  $\mu$ M) con acetilcolina. Cuatro horas tras la inducción con LPS, se midieron los niveles de TNF mediante ELISA.

Estimulación del nervio vago. Se anestesiaron ratones deficientes en el receptor nicotínico  $\alpha$ 7 (origen C57BL/6, machos y hembras) y ratones C57BL/6 de tipo natural con edad y sexo coincidentes con ketamina (100 mg kg<sup>-1</sup>, por vía intramuscular) y xilazina (10 mg kg<sup>-1</sup>, por vía intramuscular). Los ratones se sometieron o bien a una operación simulada o bien a estimulación del nervio vago (nervio vago izquierdo, 1 voltio, 2 ms, 1 Hz) con un módulo de estimulación eléctrica (STM100A, Harvard Apparatus). Se llevó a cabo la estimulación durante 20 min. (10 min. antes y 10 min. después de la administración de LPS). Se administró LPS a una dosis letal (75 mg kg<sup>-1</sup>, por vía intraperitoneal). Se extrajo sangre dos horas tras la administración de LPS. Se midieron los niveles de TNF mediante ELISA.

Análisis estadístico. Se llevó a cabo un análisis estadístico usando una prueba de la t de dos colas cuando estaba indicado; P < 0,05 se considera significativo. Se realizaron los experimentos por duplicado o triplicado; para experimentos *in vivo* y *ex vivo*, "n" se refiere al número de animales en cada condición.

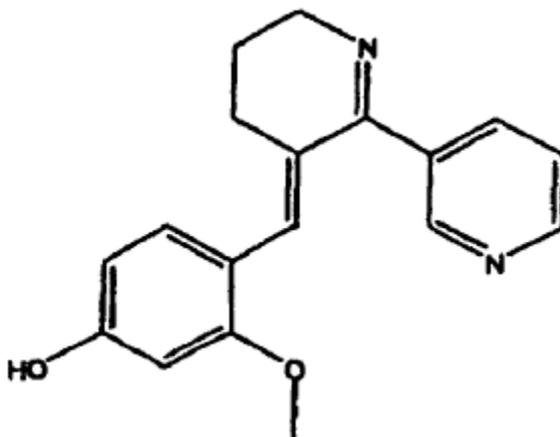
#### Ejemplo 2. Los compuestos (V) y (VI) son protectores en el modelo murino de ligadura cecal y punción de sepsis

Se mostró que los compuestos de fórmulas (V) y (VI) eran particularmente eficaces en el tratamiento de la sepsis en el modelo murino de ligadura cecal y punción.



3-(2,4-dimetoxibenciliden)anabaseína (V)

40



3-(4-hidroxi-2-metoxi-benciliden)anabaseína (VI)

5 Se llevó a cabo la ligadura cecal y punción (CLP) tal como se describe en Fink y Heard, J. of Surg. Res. 49:186-196 (1990), Wichman *et al.*, Crit. Care Med. 26:2078-2086 (1998) y Remick *et al.*, Shock 4:89-95 (1995). Brevemente, se anestesiaron ratones Balb/c con ketamina 75 mg/kg (Fort Dodge, Fort Dodge, Iowa) y 20 mg/kg de xilazina (Bohringer Ingelheim, St. Joseph, MO) por vía intramuscular. Se llevó a cabo una incisión en la línea media, y se aisló el ciego. Se situó una ligadura de sutura con Prolene 6-0 a un nivel a 5,0 mm de la punta cecal alejada de la válvula ileocecal.

10 Entonces se sometió a punción el muñón cecal ligado una vez con una aguja de calibre 22, sin extrusión directa de las heces. Entonces se colocó de nuevo el ciego en su posición intrabdominal normal. Luego se cerró el abdomen con una sutura continua de Prolene 6-0 en dos capas, peritoneo y fascia por separado para evitar la fuga de fluido. Se reanimaron todos los animales con una solución salina normal administrada por vía subcutánea a 20 ml/kg de peso corporal. Cada ratón recibió una inyección subcutánea de imipenem (0,5 mg/ratón) (Primaxin, Merck & Co., Inc., West Point, PA) 30 minutos tras la cirugía. Entonces se permitió que se recuperasen los animales.

15 Se trataron los ratones con o bien 3-2,4-dimetoxibenciliden-anabaseína (compuesto (V)) a 4 mg/kg o bien 3-(4-hidroxi-2-metoxibenciliden-anabaseína (compuesto (VI)) a 4 mg/kg o bien con control de vehículo. Se administraron los compuestos y el control de vehículo por vía intraperitoneal (i.p.) dos veces al día en el día 1 y el día 2 (24 y 48 horas después de la cirugía, respectivamente) y se administraron una vez el día 3. Se monitorizó la mortalidad diariamente durante catorce días tras la cirugía. Los resultados se presentan en la figura 6, que muestra el porcentaje de animales supervivientes tras el tratamiento con o bien el compuesto (V), el compuesto (VI) o bien control de vehículo. En el día 14, sobrevivió el 91% ( $p < 0,01$ ) de los ratones tratados con el compuesto (V) y el 82% ( $p < 0,02$ ) de los ratones tratados con el compuesto (VI) mientras que sólo había sobrevivido el 30% de los ratones tratados con el control de vehículo. Estos resultados demuestran que los compuestos (V) y (VI) mejoraron significativamente la supervivencia del modelo murino de CLP de sepsis.

25 Ejemplo 3. El compuesto (V) y la nicotina inhiben la liberación de TNF- $\alpha$  inducida por LPS desde células similares a macrófagos RAW 264.7 murinas

30 Se hicieron crecer células similares a macrófagos RAW 264.7 murinas (Colección Americana de Cultivos Tipo, Rockville, Md., EE.UU.) en DMEM complementado con un 10% de suero bovino fetal, penicilina y estreptomycin. Se sembraron las células en placas de cultivo tisular de 24 pocillos en medio Opti-MEM 1 y se usaron a una confluencia del 90%. Se trataron las células con o bien el compuesto (V) o bien nicotina (Sigma) a 0,001, 0,01, 0,1, 1, 10 ó 100  $\mu$ M. Cinco minutos después de la adición del compuesto (V) o la nicotina, se trataron las células con LPS (500 ng/ml). Se recogieron los sobrenadantes tras 4 horas y se midió el TNF- $\alpha$  mediante ELISA (kit de ELISA para ratón de R&D Systems Inc., Mineápolis, MN).

35 Se muestran los resultados en la figura 7, que demuestran que como la nicotina, el compuesto (V) inhibe de manera dependiente de la dosis la liberación de TNF- $\alpha$  desde células RAW 264.7.

Ejemplo 4. El compuesto (VI) inhibe la liberación de TNF- $\alpha$  inducida por LPS desde células similares a macrófagos RAW 264.7 murinas

Se hicieron crecer células similares a macrófagos RAW 264.7 murinas (Colección Americana de Cultivos Tipo, Rockville, Md., EE.UU.) en DMEM complementado con un 10% de suero bovino fetal, penicilina y estreptomycin. Se

sembraron las células en placas de cultivo tisular de 24 pocillos en medio Opti-MEM 1 y se usaron a una confluencia del 90%.

5 En la figura 8A, se trataron las células con el compuesto (VI) a 0,1, 1 y 10  $\mu\text{M}$ . A las 0, 1, 4 ó 24 horas tras la preincubación con el compuesto (VI), se trataron las células con LPS (500 ng/ml). Se recogieron los sobrenadantes tras 4 horas y se midió el TNF- $\alpha$  mediante ELISA (kit de ELISA para ratón de R&D Systems Inc., Mineápolis, MN). Se presentan los resultados mostrados en la figura 8a como inhibición en porcentaje de TNF- $\alpha$ . El compuesto (VI) inhibe TNF- $\alpha$  de manera dependiente de la dosis.

La figura 8B presenta los resultados de la condición de preincubación de 0 horas de la figura 8A y se presenta como la inhibición en porcentaje de TNF- $\alpha$ . La  $\text{CI}_{50}$  estimada para el compuesto (VI) es de 0,9  $\mu\text{M}$ .

#### 10 Ejemplo 5. El tratamiento con compuesto (VI) antes de la exposición a LPS inhibe el TNF circulante en ratones

Se trataron ratones C57B/6 con compuesto (VI) 4 mg/kg o control de vehículo por vía intraperitoneal (i.p.). Cinco minutos después del tratamiento con compuesto (VI) o control de vehículo, se les inyectó a los ratones con LPS 100  $\mu\text{g}$  i.p. Se sacrificaron los ratones 2 horas después del tratamiento con LPS y se extrajeron muestras de sangre para la medición de TNF- $\alpha$ . Se midió el TNF- $\alpha$  mediante ELISA tal como se describió anteriormente.

15 Tal como se muestra en la figura 9, el tratamiento con compuesto (VI) antes de la exposición a LPS disminuyó el nivel de TNF- $\alpha$  circulante en aproximadamente un 50% comparado con los ratones tratados con control de vehículo.

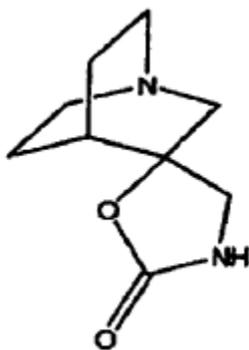
#### Ejemplo 6. El compuesto (VI) reduce la inflamación de colon en la colitis por DSS murina

20 Se produjo colitis inducida por sulfato sódico de dextrano (DSS) tal como se describe en Hove *et al.*, Dig. Dis. Sci. 47(9): 2056-2063 (2002). Se alimentaron ratones C57B/6 con DSS al 3% (p/v) (peso mol. de 40 kDa; TdB Consultancy, Uppsala, Suecia) en su agua para beber durante siete días. 12 horas tras el comienzo de la administración de DSS, se les inyectó a los ratones compuesto (VI) 4 mg/kg i.p. dos veces al día durante 7 días. Se sacrificaron los ratones en el día 7.

25 Se les extirpó el colon tras su muerte y se extrajeron a través de una incisión en la línea media. Se midió la longitud total del colon y se presentan los resultados en la figura 10(B). El acortamiento del colon es indicativo de una mayor gravedad de la colitis. Los ratones tratados con compuesto (VI) tuvieron una longitud del colon ligeramente superior que los ratones control ( $p = 0,07$ ), lo que indica una menor gravedad de la colitis en los ratones tratados con compuesto (VI). También se midió otro indicador de la gravedad de la enfermedad, el peso del colon. Se registró el peso húmedo del colon y se usó como un índice de edema inflamatorio. Los resultados se muestran en la figura 10 (A). El peso del colon en los ratones tratados con compuesto (VI) disminuyó en comparación con los ratones en la condición de control. Estos resultados sugieren que el compuesto (VI) reduce la inflamación del colon en la colitis por DSS murina.

#### Ejemplo 7. El compuesto (VII) inhibe la liberación de TNF- $\alpha$ desde células similares a macrófagos RAW 264.7 murinas estimuladas con LPS

El compuesto (VII) mostró un efecto significativo en la inhibición de la liberación de TNF- $\alpha$



35 (-)-espiro-1-azabicyclo[2.2.2]octano-3,5'-oxazolidin-2'-ona (VII)

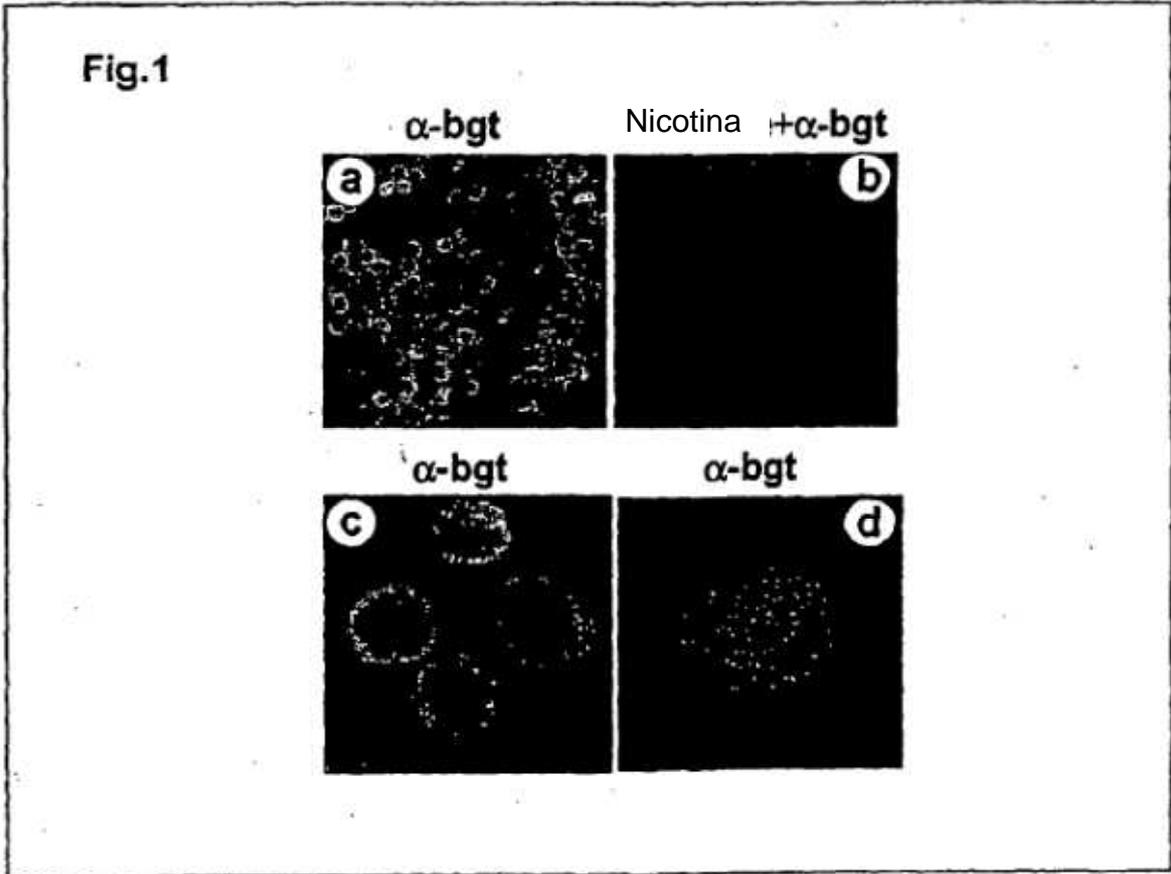
Se hicieron crecer células similares a macrófagos RAW 264.7 murinas (Colección Americana de Cultivos Tipo, Rockville, Md., EE.UU.) tal como se describió anteriormente en el ejemplo 3. Se trataron las células con (-)-espiro-[1-

azabicyclo[2.2.2]octano-3,5'-oxazolidin-2'-ona] (compuesto (VII)) a 0, 0,01, 0,1, 1, 10 y 100  $\mu$ M. Cinco minutos después de la adición del compuesto (VII), se trataron las células con LPS (500 ng/ml). Se midió el TNF- $\alpha$  mediante ELISA tal como se describió anteriormente.

5 Se muestran los resultados en la figura 11, que demuestran que las concentraciones superiores del compuesto (VII) inhiben la liberación de TNF- $\alpha$  desde células RAW 264.7. La liberación de TNF- $\alpha$  disminuyó en más de cuatro veces en las células tratadas con compuesto (VII) 100  $\mu$ M en comparación con las células control.

**REIVINDICACIONES**

1. Un procedimiento para determinar si un compuesto es un agonista colinérgico selectivo para un receptor  $\alpha 7$  nicotínico, comprendiendo el procedimiento  
5 determinar si el compuesto inhibe la liberación del factor de necrosis de tumor (TNF) desde un macrófago, y determinar si el compuesto es un agonista colinérgico reactivo con por lo menos un receptor nicotínico que no es  $\alpha 7$ ,  
10 en el que el compuesto que inhibe la liberación del TNF desde un macrófago, pero que no es un agonista colinérgico reactivo con por lo menos un receptor nicotínico que no es  $\alpha 7$ , y que activa alfa 7 a una medida más grande que el compuesto que activa el por lo menos otro receptor nicotínico, es un agonista colinérgico selectivo para un receptor  $\alpha 7$  nicotínico.
2. El procedimiento según la reivindicación 1 que comprende además tratar el macrófago con un reactivo que estimula una cascada de TNF.
3. El procedimiento según la reivindicación 2 en el que el reactivo es LPS.
4. El procedimiento según la reivindicación 1 en el que la determinación de la inhibición de la liberación de TNF  
15 comprende la medición de ARNm del TNF.
5. El procedimiento según la reivindicación 1 en el que la determinación de la inhibición de la liberación de TNF comprende la medición de la proteína del TNF.
6. El procedimiento según la reivindicación 1 en el que la determinación de la inhibición de la liberación de TNF  
20 comprende la medición de la actividad del TNF.



**Fig.2**

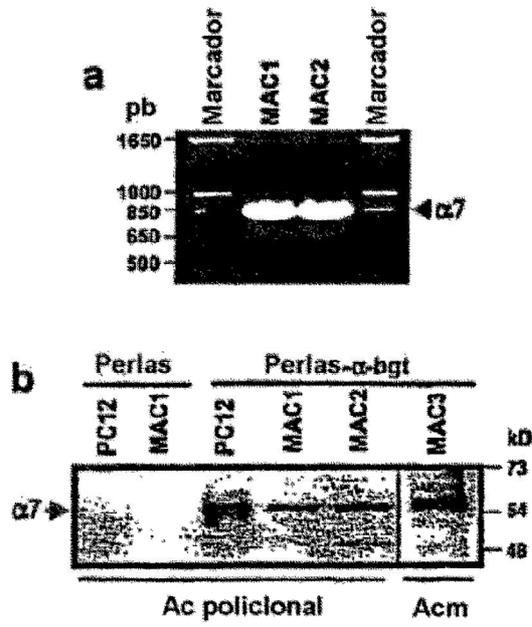
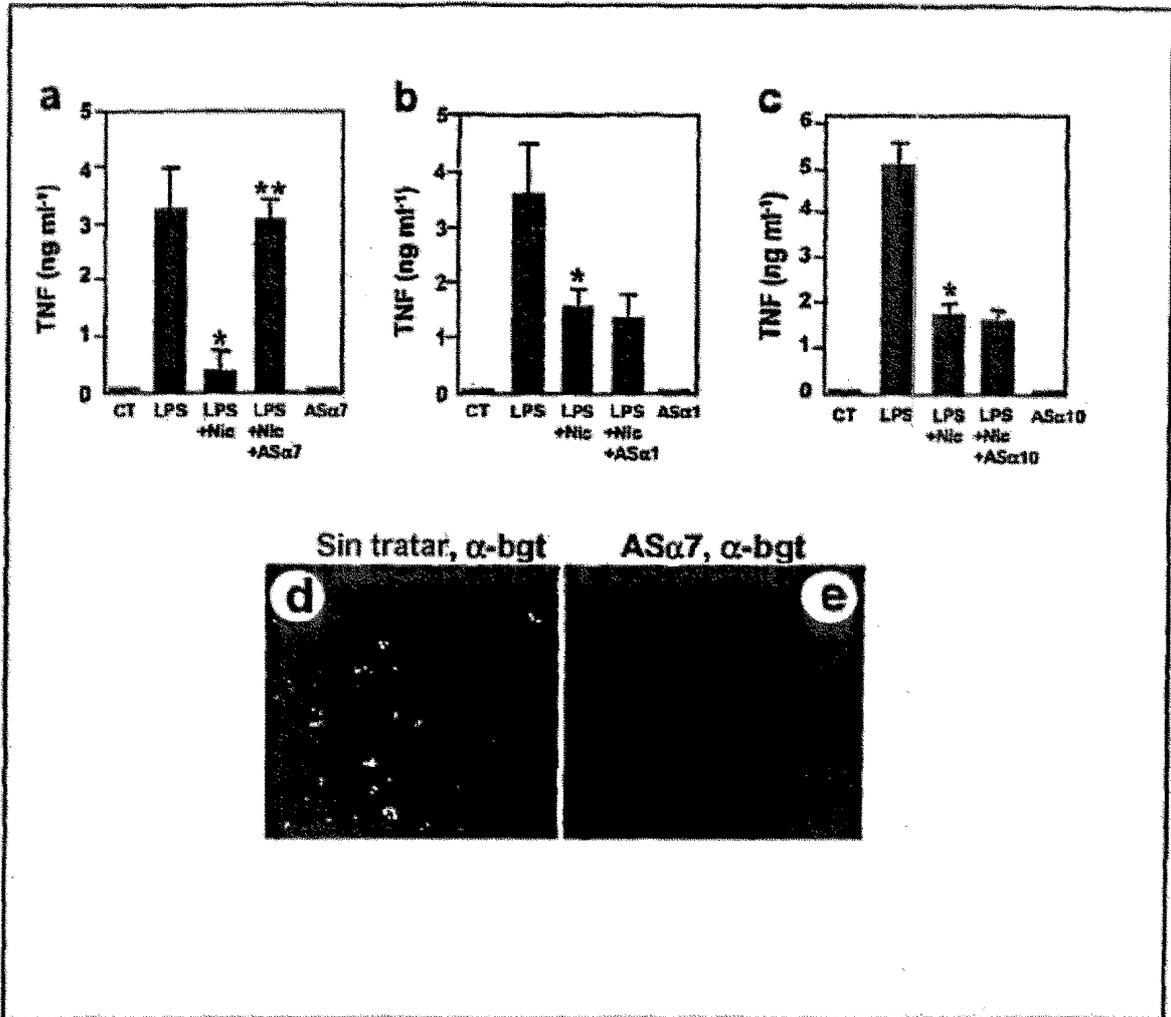


Fig. 3



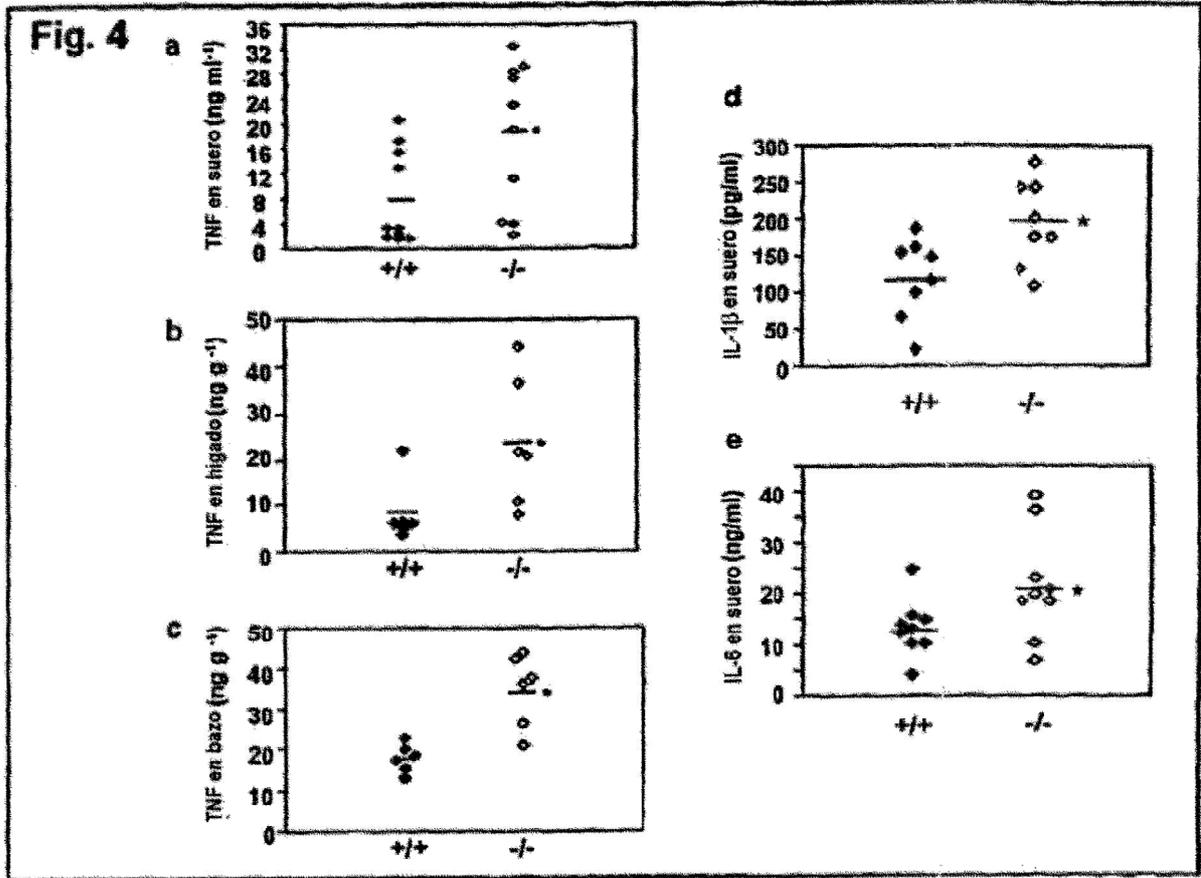
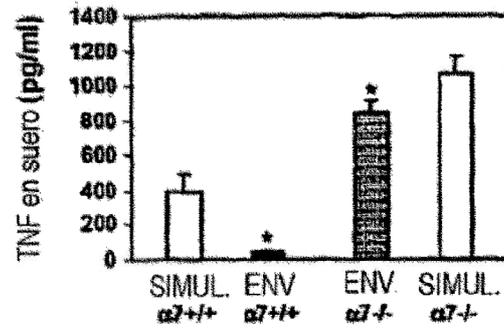


Fig. 5



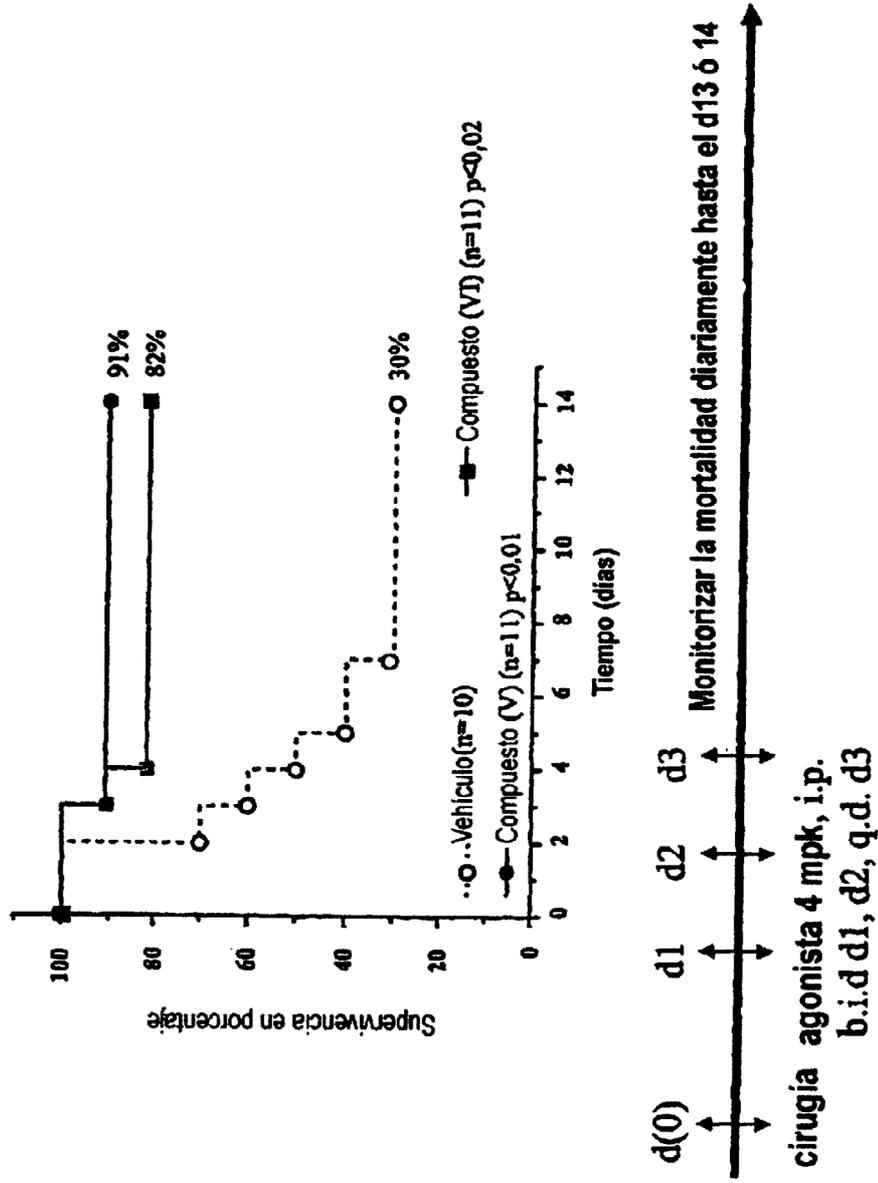
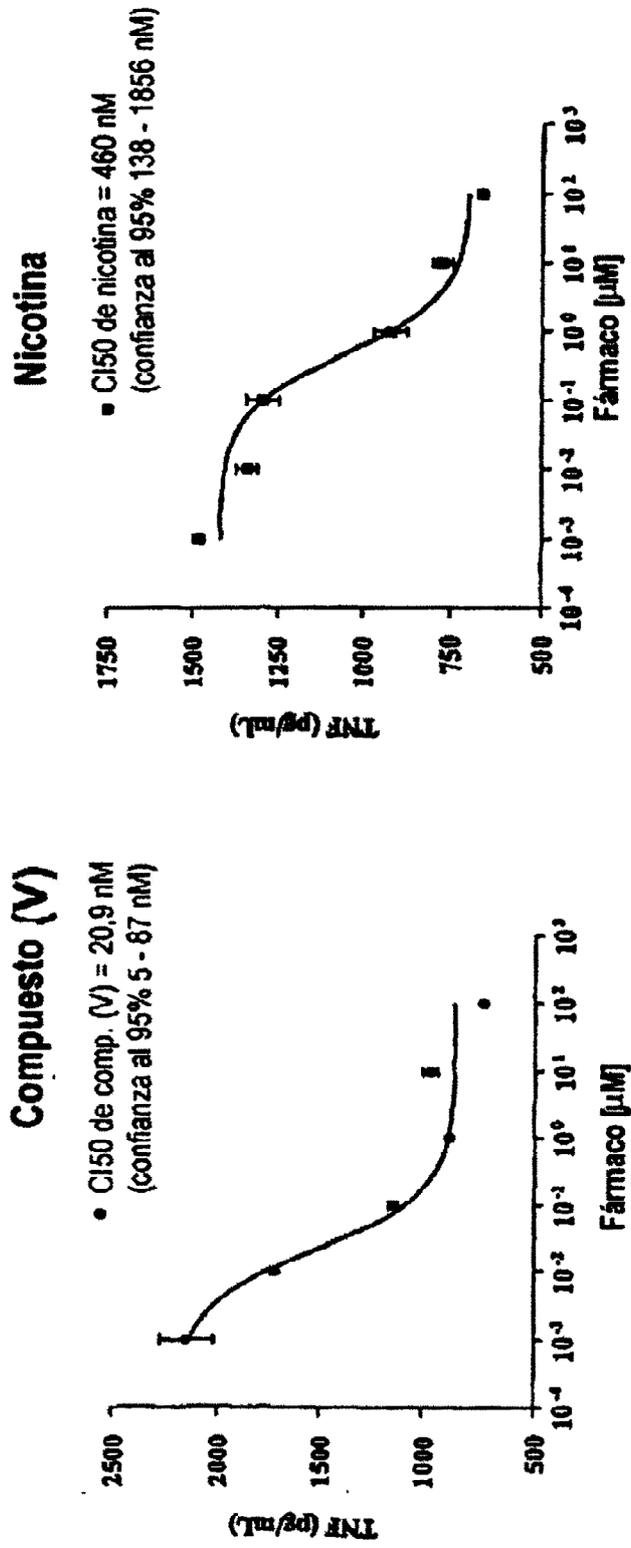


FIG. 6



Bloqueo de la producción de TNF en células RAW264.7 estimuladas con LPS

FIG. 7

A. Inhibición en porcentaje de TNF-alfa por el compuesto (VI) tras estimulación con LPS durante 4 horas

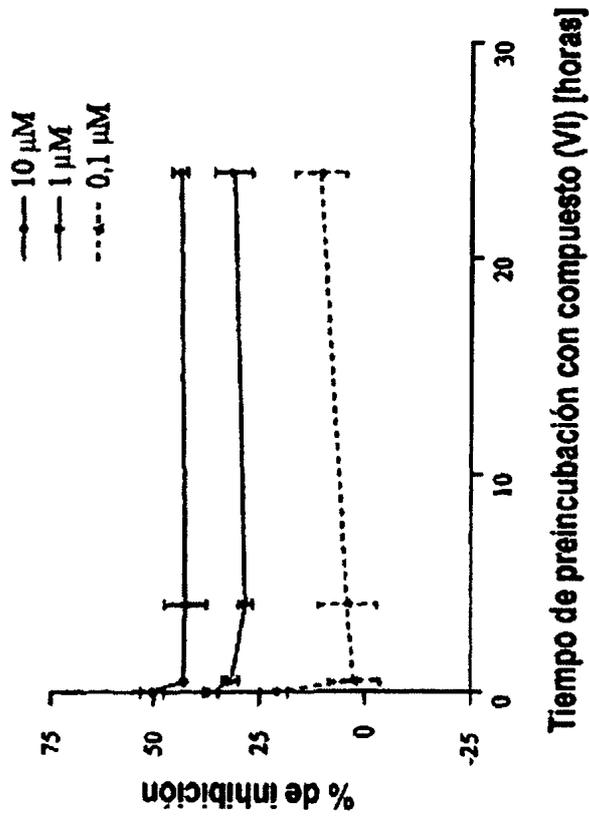


FIG. 8A

B. Bloqueo de la respuesta a la dosis de la producción de TNF desde células RAW264.7 estimuladas con LPS sin preincubación con compuesto (VI)

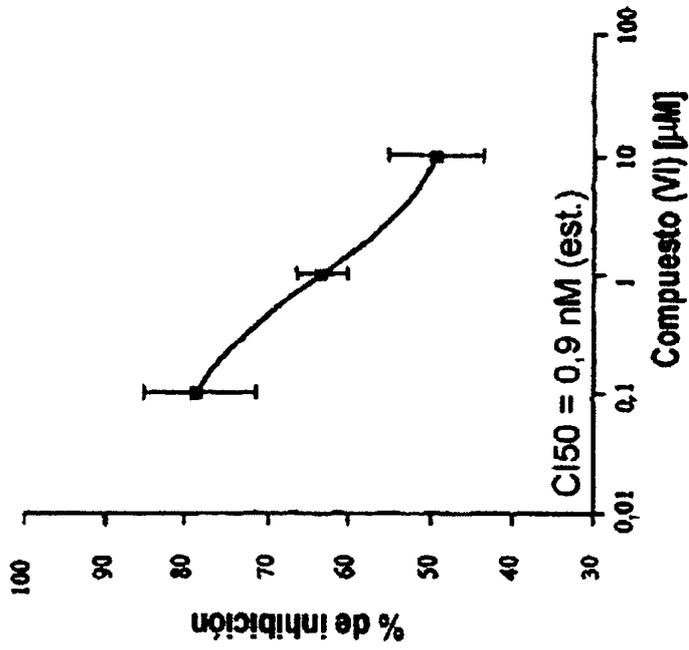


FIG. 8B

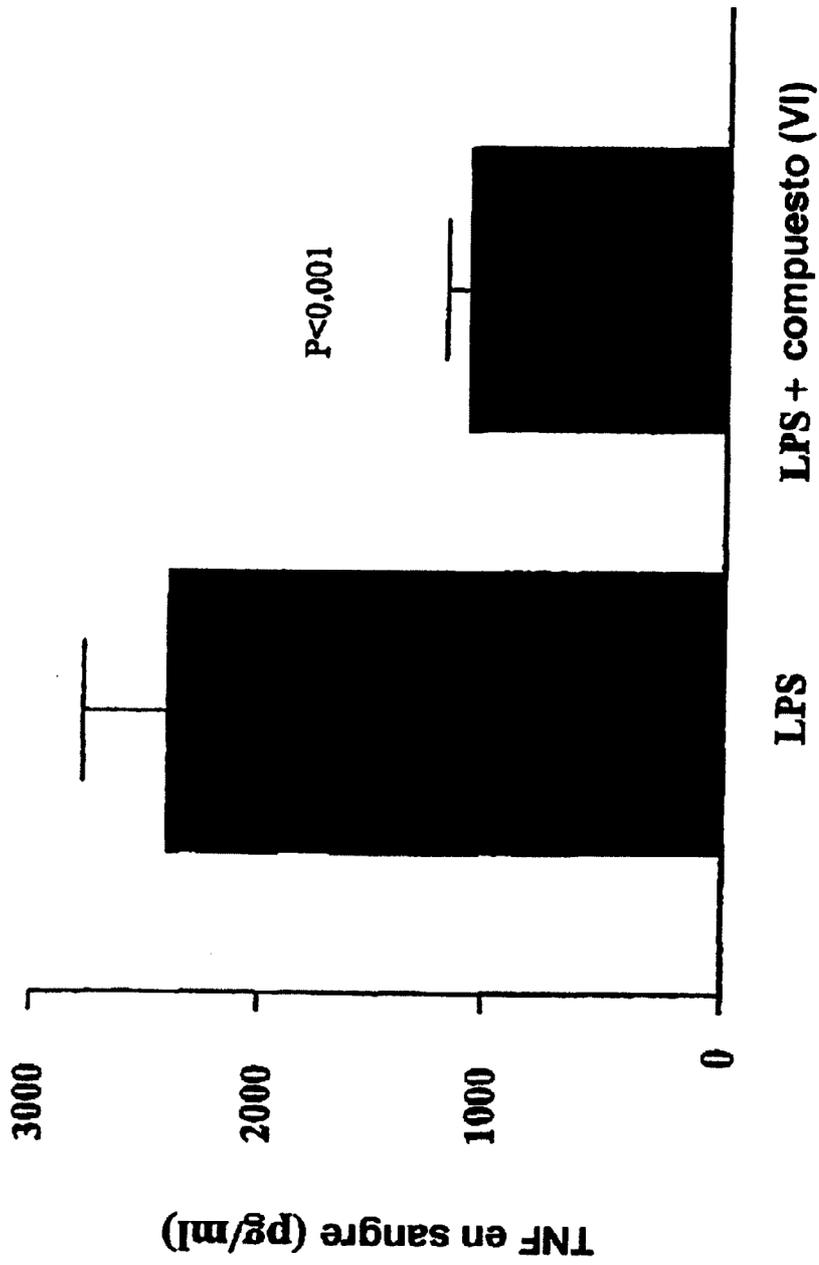
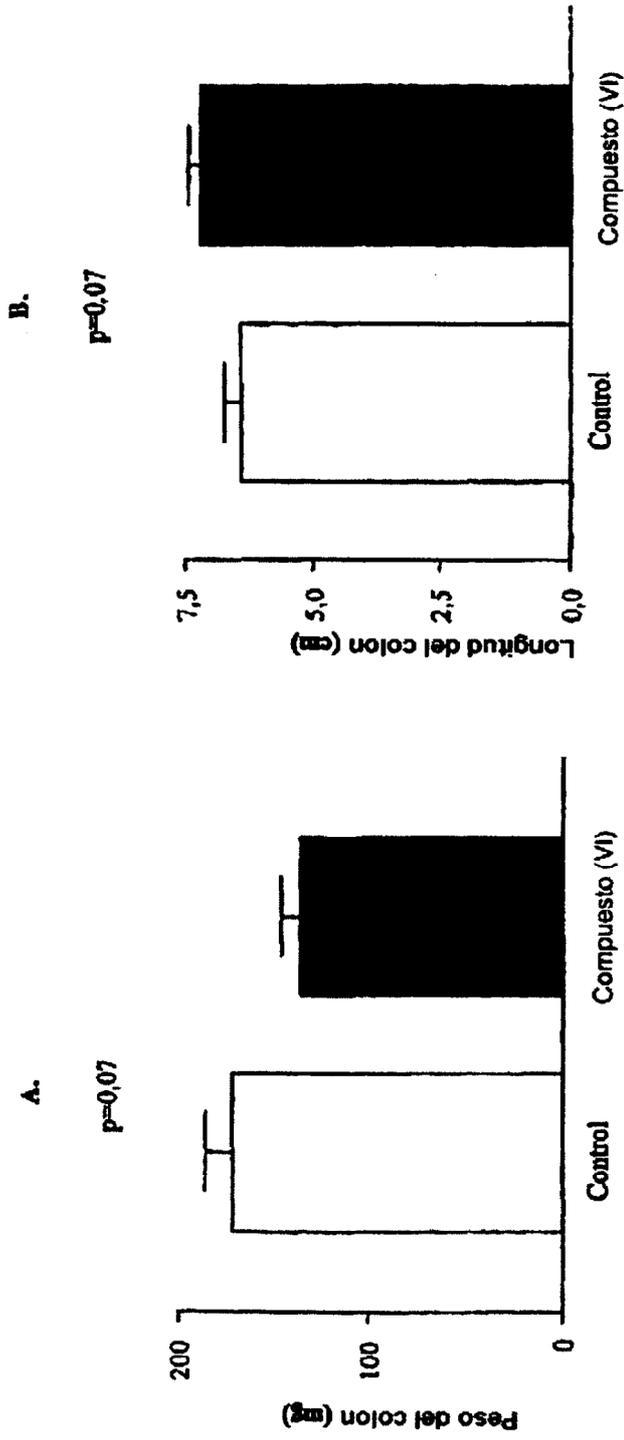


FIG. 9



Compuesto (VI) dosificado a 4 mg/kg i.p., empezando 12 h tras DSS, b.i.d., durante 7 días

FIG. 10

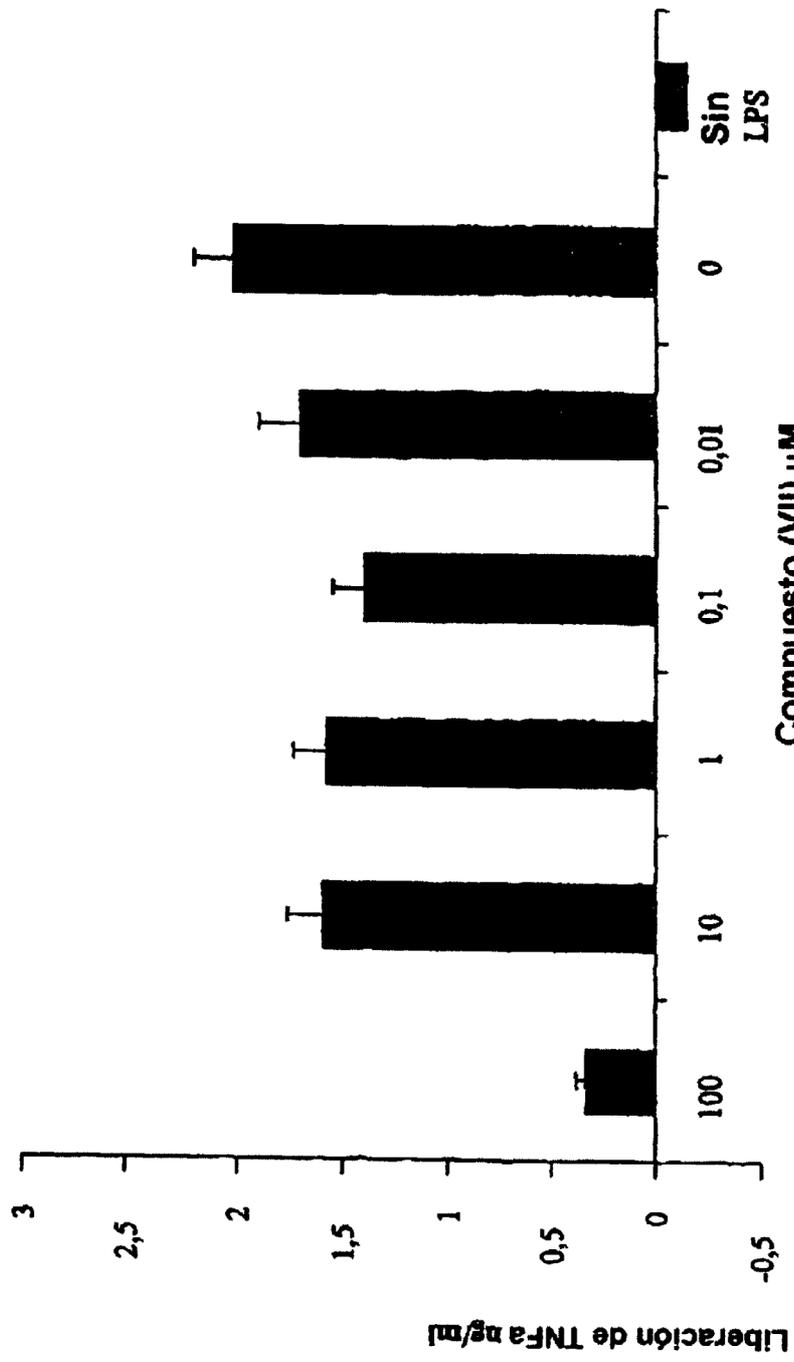


FIG. 11