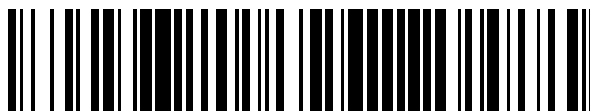


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 563 167**

51 Int. Cl.:

A61K 39/00 (2006.01)

C07K 16/18 (2006.01)

C07K 16/30 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.04.2008 E 08745187 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.11.2015 EP 2155239**

54 Título: **Método para tratar esclerosis múltiple usando anticuerpos anti-S1P neutralizantes**

30 Prioridad:

06.04.2007 US 784417

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

11.03.2016

73 Titular/es:

**LPATH, INC. (100.0%)
4025 Sorrento Valley Blvd.
San Diego, CA 92121, US**

72 Inventor/es:

SABBADINI, ROGER A.

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 563 167 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Método para tratar esclerosis múltiple usando anticuerpos anti-S1P neutralizantes

Campo técnico

5 La presente invención se refiere a métodos de disminución de una respuesta inmunitaria usando agentes que se unen a moléculas de lípidos bioactivos y, por tanto, de disminución de la concentración eficaz de estas moléculas de lípidos bioactivos. Estos lípidos bioactivos desempeñan un papel en la enfermedad en seres humanos y/o animales como moléculas de señalización. Una clase de lípidos de señalización bioactivos considerada según la invención son los lisolípidos. Ejemplos de lisolípidos de señalización son esfingosina-1-fosfato (S1P) y los diversos ácidos lisofosfatídicos (LPA). Pueden usarse anticuerpos y otros agentes que se unen a lípidos de señalización, y derivados y variantes de los mismos, disminuyendo así la concentración eficaz de estos lípidos, para disminuir una respuesta inmunitaria, y en el tratamiento y/o la prevención de enfermedades y estados caracterizados por una respuesta inmunitaria excesiva, aberrante o indeseada, mediante la administración de composiciones farmacéuticas que contienen tales anticuerpos, solos o en combinación con otros agentes terapéuticos y/o tratamientos. Los trastornos autoinmunitarios, rechazo de aloinjerto y enfermedad de injerto contra huésped son ejemplos de enfermedades y estados que pueden tratarse según los métodos de la presente invención. También se considera que trastornos caracterizados por infiltración de linfocitos inapropiada o aberrante son enfermedades caracterizadas por una respuesta inmunitaria excesiva, aberrante o indeseada y, por tanto, pueden tratarse según los métodos de la presente invención.

Antecedentes de la invención

20 I. Introducción

La siguiente descripción incluye información que puede ser útil para entender la presente invención. No es una admisión de que ninguna información de este tipo sea técnica anterior, o relevante, para las invenciones actualmente reivindicadas, o de que cualquier publicación a la que se haga referencia específica o implícitamente sea técnica anterior o ni siquiera sea particularmente relevante para la invención actualmente reivindicada.

25 II. Antecedentes

La presente invención se refiere a métodos de disminución o atenuación de respuestas inmunitarias, incluyendo respuestas autoinmunitarias, aberrantes, excesivas o indeseadas. Estos procesos, por separado o en conjunto, están implicados en muchas enfermedades y estados. Estas enfermedades o estados pueden ser sistémicos o pueden estar relativamente localizados, por ejemplo en los glóbulos rojos, vasos sanguíneos, tejidos conjuntivos, sistema nervioso, órganos principales, glándulas endocrinas tales como la tiroides o el páncreas, músculos, articulaciones o piel.

A. Enfermedades y estados caracterizados por una respuesta inmunitaria aberrante, excesiva o indeseada

35 El sistema inmunitario protege al organismo frente a sustancias posiblemente dañinas tales como microorganismos, toxinas, células cancerosas, y sangre o células foráneas de otra persona o especie. Estos antígenos se destruyen mediante la respuesta inmunitaria, que incluye la producción de anticuerpos y linfocitos sensibilizados, que son glóbulos blancos especializados que reconocen y destruyen antígenos particulares.

1. Enfermedades y estados autoinmunitarios

40 Se desarrollan trastornos autoinmunitarios cuando el sistema inmunitario destruye tejidos corporales normales, que normalmente ignoraría. Normalmente, el sistema inmunitario puede diferenciar tejido propio de no propio. Algunos linfocitos se sensibilizan frente a células de tejidos propios, pero habitualmente esta respuesta se controla o suprime por otros linfocitos. Se producen trastornos autoinmunitarios cuando se altera el proceso de control normal. Normalmente, la mayoría de las células T que reconocen autoantígenos se eliminan en el timo, su lugar de origen, y nunca entran en la circulación general. Las células T normales circulan a través de los ganglios linfáticos y la sangre sin responder nunca a autoantígenos. Sin embargo, se cree que los pacientes con trastornos autoinmunitarios portan células T que pueden activarse por autoantígenos. Una vez activada, la célula T se divide para producir muchas células efectoras que atacan al antígeno activante. Cuando el antígeno es un autoantígeno en vez de un antígeno foráneo, se producen como resultados consecuencias graves y potencialmente mortales. También pueden producirse respuestas autoinmunitarias si se altera tejido corporal normal de modo que ya no se reconoce como propio.

50 Los trastornos autoinmunitarios pueden dar como resultado la destrucción de uno o más tipos de tejidos corporales, crecimiento anómalo de un órgano, o cambios en la función del órgano. El trastorno puede afectar sólo a un tipo de órgano o tejido o puede afectar a múltiples órganos y tejidos, dependiendo de la identidad del antígeno activante. Los órganos y tejidos comúnmente afectados por trastornos autoinmunitarios incluyen componentes de la sangre tales como glóbulos rojos, vasos sanguíneos, tejidos conjuntivos, sistema nervioso, órganos principales, glándulas endocrinas tales como la tiroides o el páncreas, músculos, articulaciones y piel. Una persona puede experimentar

múltiples trastornos autoinmunitarios al mismo tiempo.

Algunos ejemplos no limitativos de enfermedades y estados autoinmunitarios confirmados o sospechados incluyen diabetes mellitus tipo 1, psoriasis, glomerulonefritis autoinmunitaria, anemia hemolítica autoinmunitaria, encefalomielite aguda diseminada, enfermedad de Addison, alopecia universal, espondilitis anquilosante, síndrome de anticuerpos antifosfolípidos, ooforitis autoinmunitaria, orquitis autoinmunitaria, insuficiencia poliendocrina autoinmunitaria, enfermedad de Behcet, enfermedad de Berger, enfermedad de Buerger, pénfigo ampolloso, celiacía, enfermedad de Chagas, enfermedad de Graves, síndrome de Goodpasture, síndrome de Guillain-Barre, tiroiditis de Hashimoto, hepatitis activa crónica, síndrome de fatiga crónica, hepatitis progresiva crónica, púrpura trombocitopénica idiopática, síndrome de Job, artritis psoriásica, artritis reumatoide, enfermedad de Kawasaki, esclerosis múltiple, miastenia grave, penfigoide, pénfigo, pénfigo eritematoso, pénfigo foliáceo, pénfigo vulgar, polimialgia reumática, fibrosis pulmonar, síndrome de Reiter, tiroiditis de Reidel, fiebre reumática, sarcoidosis, síndrome de Sezary; esclerodermia, colitis ulcerosa, anemia hemolítica autoinmunitaria, síndrome de Felty, lupus eritematoso sistémico, lupus eritematoso discoide, poliarteritis nudosa autoinmunitaria, síndrome de Caplan, enfermedad de Crohn, disautonomía, endometriosis, hidradenitis supurativa, cistitis intersticial, enfermedad de Lyme, síndrome de taquicardia ortostática postural, síndrome de opsoclonía-mioclonía, psoriasis, síndrome de Sjogren, síndrome de CREST, miocarditis viral, granulomatosis de Wegener y síndrome de Wiscott-Aldrich. Se ha confirmado que algunos de estos trastornos son trastornos autoinmunitarios mediante la presencia de autoanticuerpos.

a. Esclerosis múltiple (EM)

La EM es una enfermedad inflamatoria del SNC; la aparición se produce entre los 20 y 40 años de edad y en los EE.UU. 350.000 personas tienen EM. El curso de la EM se caracteriza generalmente por empeoramientos agudos de síntomas neurológicos seguidos por una serie de recaídas y remisiones. Estos empeoramientos con frecuencia dan como resultado déficits neurológicos permanentes. Aunque la EM no es una enfermedad mortal, la progresión de la enfermedad con frecuencia da como resultado incapacidad funcional y reducción de la calidad de vida. Los síntomas iniciales de la enfermedad pueden incluir alteraciones oculomotoras, temblores, ataxia, espasticidad, fatiga, alteraciones sensitivas, síndromes de dolor, disfunción de la vejiga o los intestinos, y trastornos psiquiátricos. Los síntomas posteriores incluyen alteraciones de neuronas motoras superiores más prominentes, es decir, aumento de la espasticidad, aumento de la parálisis o cuadriparesia. También se observan comúnmente vértigo, falta de coordinación, depresión, inestabilidad emocional, anomalías de la marcha, fatiga y dolor.

Sigue sin conocerse la patogenia precisa de la EM; se cree que se activan células T en la circulación periférica por antígenos desconocidos y atraviesan la barrera hematoencefálica al interior del SNC. En el SNC, las células T estimulan la producción de citocinas proinflamatorias que pasan a provocar la desmielinización con la posterior disfunción neurológica. En particular, células T CD4+ y macrófagos destruyen los oligodendrocitos, que sintetizan y mantienen vainas de mielina de axones en el sistema nervioso central (SNC).

El tratamiento para pacientes con EM adopta diversas formas, incluyendo modificación del curso de la enfermedad, tratamiento de empeoramientos (también denominados ataques, recaídas o intensificaciones) y tratamiento de síntomas (tanto primario como secundario), así como mejora de la función y la seguridad, y apoyo emocional. El tratamiento de empeoramientos (que son episodios de pérdida de función que surgen de nuevo daño de mielina) se logra con frecuencia con altas dosis de corticosteroides para reducir la inflamación. Algunos esteroides, tales como prednisona, se administran generalmente por vía oral. Otros, tales como metilprednisolona y dexametasona, se administran por vía intravenosa.

Además de debilidad y parálisis motora, hay muchos síntomas primarios y secundarios que afectan a las personas con EM. Estos incluyen fatiga, mareo, náuseas/vómitos, estreñimiento, disfunción eréctil, prurito paroxístico, infecciones de las vías urinarias, depresión, dolor neuropático/disestesia, espasticidad, polaquiuria, disfunción de la vejiga y temblores. Los tratamientos comúnmente usados para tratar uno o más de estos síntomas incluyen meclizina para el mareo y las náuseas/vómitos, antibióticos y antimicrobianos para las infecciones de las vías urinarias, fenazopiridina para el alivio sintomático de infecciones de las vías urinarias, hidroxizina para el prurito paroxístico, papaverina, sildenafil, alprostadil, vardenafilo o tadalafilo para la disfunción eréctil, docusato, fibra de *Psyllium*, supositorios de glicerina, enemas, hidróxido de magnesio, fosfato de sodio o bisacodilo para el estreñimiento, clorhidrato de duloxetina para la depresión o el dolor neuropático, dantroleno para la espasticidad, desmopresina, oxibutinina, terazosina, prazosina, darifenacina, tamsulosina, oxibutinina, cloruro de trospio, imipramina, bromuro de propanetelina, succinato de solifenacina o tolterodina para la polaquiuria o disfunción de la vejiga, fenoína o gabapentina para las disestesias, fluoxetina, venlafaxina, sertralina, bupropión o paroxetina para la depresión, amitriptilina para las parestesias, metenammina para prevenir infecciones de las vías urinarias, tizanidina, diazepam o baclofeno para la espasticidad, clonazepam para los temblores, el dolor o la espasticidad, isoniazida para los temblores, nortriptilina para las parestesias, modafinilo o fluoxetina para la fatiga, carbamazepina para la neuralgia del trigémino, e imipramina para el dolor.

La terapia curativa es el objetivo final en el tratamiento de EM; sin embargo, sigue siendo difícil de lograr ya que se desconoce el mecanismo patológico subyacente y la presentación de la enfermedad es heterogénea. El Comité Ejecutivo de la Junta Médica Asesora de la Sociedad Nacional sobre EM ha adoptado las siguientes recomendaciones referentes al uso de los agentes modificadores de la enfermedad de EM actuales, tales como los

inmunomoduladores Betaseron® (interferón beta 1b), Avonex® (interferón beta 1a), Rebif® (interferón beta 1a), Copaxone® (acetato de glatirámero) y Tysabri® (natalizumab); y el inmunosupresor Novantrone® (mitoxantrona). Las recomendaciones son que el tratamiento con inmunomoduladores debe iniciarse lo antes posible tras el diagnóstico de EM con un curso recidivante. Pueden considerarse los inmunosupresores (mitoxantrona) para

5 pacientes con empeoramiento y/o recidiva seleccionados. La terapia debe continuarse indefinidamente excepto en el caso de una clara ausencia de beneficios, efectos secundarios intolerables, nuevos datos o terapia mejor. Por tanto existe una necesidad médica no satisfecha de un tratamiento mejor de pacientes con EM.

Los tratamientos emergentes tienen en cuenta los diferentes mecanismos inmunopatológicos así como estrategias para proteger frente al daño axonal o fomentar la remielinización.

10 El inmunosupresor fingolimod (FTY720 o clorhidrato de 2-amino-2-(2-[4-octilfenil]etil)-1,3-propanodiol) ha mostrado ejercer efectos terapéuticos considerables en ensayos clínicos en los que participaron pacientes con esclerosis múltiple recidivante, Kappos *et al*, N ENGL J MED, 2006, 355:1124-1140. Los pacientes que recibieron fingolimod oral una vez al día tuvieron una rápida reducción en la actividad de la enfermedad, reflejada como reducciones significativas en la tasa de recidiva y el número de lesiones del SNC. FTY720 también interfiere en la migración de

15 células T e impide que linfocitos abandonen ganglios linfáticos y otros tejidos. El secuestro de linfocitos T y B en tejidos linfoides da como resultado la desaparición casi completa de linfocitos de la sangre y este proceso es reversible, lo que indica que fingolimod no destruye los linfocitos. En cuanto FTY720 entra en el torrente sanguíneo, se fosforila rápidamente. FTY720 fosforilado se une a todos los receptores de S1P excepto por S1P2. S1P1, el receptor de S1P predominante expresado en linfocitos, es un regulador principal de la migración de linfocitos y se requiere para que los linfocitos extravasculares emigren de los tejidos. En el cerebro, se reactivan células T e inducen una reacción inflamatoria perjudicial. FTY720 a 0,1 mg/kg v.o. o dosis superiores previene casi completamente la parálisis en encefalomiелitis autoinmunitaria experimental (EAE) inducida por proteína básica de

20 mielina en ratas LEW. El tratamiento terapéutico con FTY720 inhibe la recidiva de EAE inducida por inmunización con proteína proteolípídica de mielina en ratones SJL. Webb, M *et al*. (2004) J. Neuroimm. 153:108:121.

25 - Natalizumab (Tysabri®), un anticuerpo monoclonal que bloquea la adhesión dependiente de integrina $\alpha 4\beta 1$ de macrófagos y células T encefalitogénicas transportados por la sangre a microvasos en el SNC, bloquea la migración de células T. En los ganglios linfáticos periféricos de pacientes con esclerosis múltiple, se piensa que las células T CD4+ autorreactivas se encuentran con células dendríticas presentadoras de antígeno y se diferencian para dar células efectoras. Las células T encefalitogénicas abandonan los ganglios linfáticos periféricos, acceden al torrente

30 sanguíneo y se adhieren a células endoteliales en el SNC, una etapa que se bloquea mediante natalizumab.

Un anticuerpo anti-S1P monoclonal murino del solicitante, LT1002, ha demostrado modulación de los niveles de linfocitos en ratones. Estos datos sugieren que LT1002 puede ser un agente terapéutico posiblemente beneficioso para enfermedades autoinmunitarias y puede proporcionar una estrategia inmunoterapéutica novedosa para el tratamiento de EM.

35 2. Otros estados caracterizados por una respuesta inmunitaria aberrante, excesiva o indeseada

También se cree que los métodos de la presente invención son útiles en el tratamiento de estados o enfermedades, distintos de estados autoinmunitarios, en los que es deseable disminuir o atenuar la respuesta inmunitaria. Tales estados pueden caracterizarse por una respuesta inmunitaria que es excesiva, aberrante o indeseada. Los ejemplos no limitativos incluyen rechazo de aloinjerto y enfermedad de injerto contra huésped. El aloinjerto es el trasplante de

40 un órgano o tejido (por ejemplo, riñón, corazón, pulmón, córnea, piel, médula ósea, páncreas u otros tejidos u órganos) en un miembro genéticamente no idéntico de la misma especie. Por tanto, la mayoría de los trasplantes de órganos y tejidos en seres humanos son aloinjertos (siendo la mayoría de los demás trasplantes de un gemelo idéntico). Se produce rechazo de aloinjerto cuando el sistema inmunitario del receptor del trasplante reconoce el aloinjerto como foráneo y comienza a destruirlo. Esto puede destruir eventualmente el órgano trasplantado y puede dar como resultado la necesidad de un segundo trasplante. Por tanto, aunque no es necesariamente inesperado, el rechazo de aloinjerto es un ejemplo de una respuesta inmunitaria que es indeseada.

La enfermedad de injerto contra huésped (EICH) es una complicación del trasplante de médula ósea y el trasplante de células madre. Tras un aloinjerto de médula ósea o células madre, las células de donante trasplantadas, por ejemplo, células T, pueden atacar al organismo del paciente (el huésped). La EICH puede ser crónica o aguda, y puede ser potencialmente mortal si no se controla. Por tanto, la EICH es un ejemplo de una respuesta inmunitaria

50 indeseada y/o aberrante.

Se produce infiltración de linfocitos en muchas enfermedades y estados incluyendo cánceres, lesión vascular, lesión de médula espinal, alergia y asma. Schottenfeld y Beebe-Dimmer (2006) CA 56: 69. Zhu *et al*. (2002) Arteriosclerosis, Thrombosis Vasc Biol. 22: 450; (2002) Jones *et al*. (2002) J. Neurosci. 22: 2690; Gaga *et al*. (1991) J Immunol. 147:816-22; Boushey HA y JV Fahy (1995) Environ Health Perspect. 103 sup. 6:229-233. También se considera que trastornos caracterizados por infiltración de linfocitos inapropiada o aberrante son enfermedades

55 caracterizadas por una respuesta inmunitaria excesiva, aberrante o indeseada y, por tanto, pueden tratarse según los métodos de la presente invención.

En determinados cánceres hematológicos, tales como mieloma múltiple, un tumor maligno de células B y células plasmáticas, el tratamiento implica con frecuencia tanto agentes anticancerígenos (por ejemplo, citotóxicos) como inmunosupresores tales como dexametasona para reducir la respuesta inmunitaria aberrante, (es decir, proliferación de células B). Se ha mostrado que un anticuerpo monoclonal que se une a S1P con alta afinidad y especificidad ralentiza la progresión tumoral y la angiogénesis asociada en varios modelos de animales de cáncer humano. Visentin *et al.*, (2006) *Cancer Cell* 9: 225-238. Los solicitantes creen que el anticuerpo anti-S1P puede ser eficaz como agente anticancerígeno gracias no sólo a su actividad antitumorigénica, sino también porque puede ser inmunosupresor. Se cree que es particularmente útil para el tratamiento de mieloma múltiple y otros tumores malignos hematológicos caracterizados por una implicación, infiltración o proliferación aberrante o no deseada de linfocitos y sus productos.

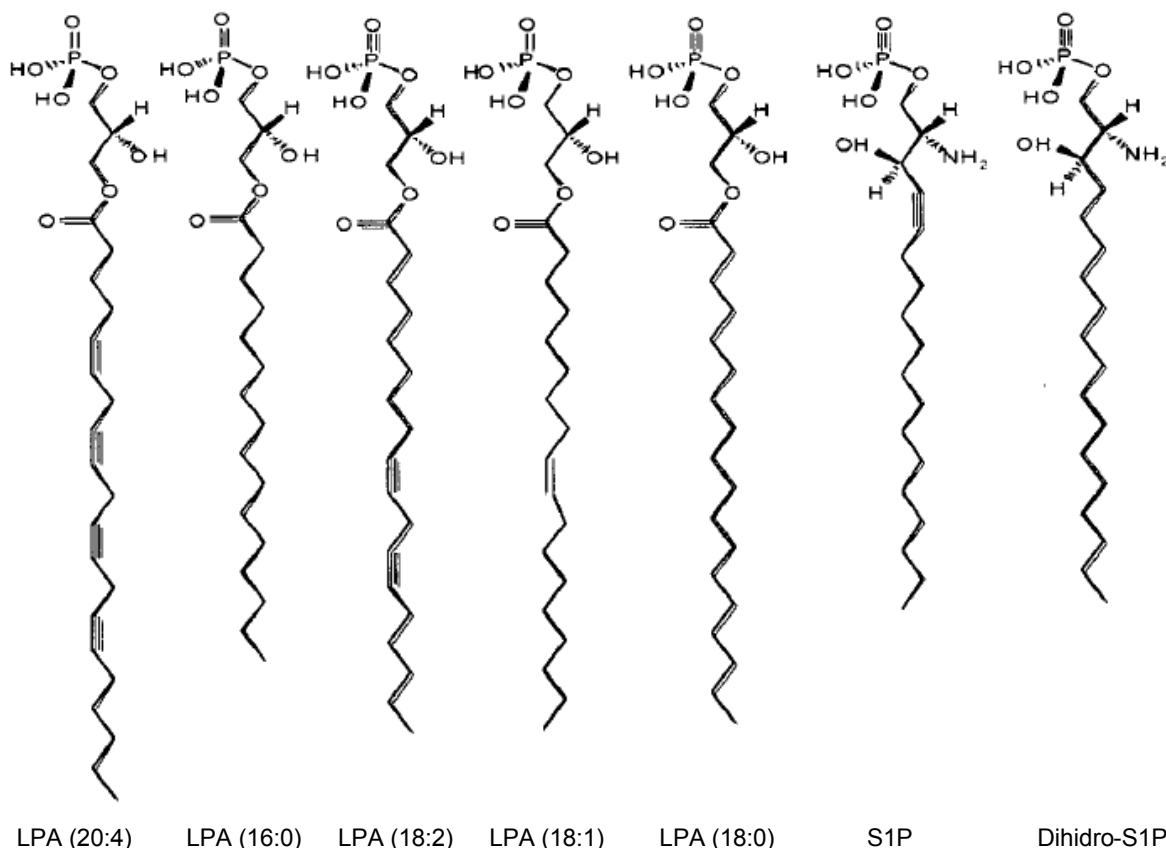
B. Lípidos de señalización bioactivos

Ahora se reconocen los lípidos y sus derivados como importantes dianas para la investigación médica, no sólo como simples elementos estructurales en membranas celulares o como fuente de energía para β -oxidación, glicólisis u otros procesos metabólicos. En particular, determinados lípidos bioactivos funcionan como mediadores de señalización importantes en la enfermedad de animales y seres humanos. Aunque la mayoría de los lípidos de la membrana plasmática desempeñan un papel exclusivamente estructural, una pequeña proporción de ellos están implicados en la retransmisión de estímulos extracelulares al interior de las células. Estos lípidos se denominan "lípidos bioactivos" o, alternativamente, "lípidos de señalización bioactivos". La "señalización lipídica" se refiere a cualquiera de varias rutas de transducción de señales celulares que usan lípidos de membrana celular como segundos mensajeros, así como se refiere a la interacción directa de una molécula de señalización lipídica con su propio receptor específico. Las rutas de señalización lipídica se activan mediante una variedad de estímulos extracelulares, que oscilan entre factores de crecimiento y citocinas inflamatorias, y regulan decisiones de destino celular tales como apoptosis, diferenciación y proliferación. La investigación de la señalización mediante lípidos bioactivos es un área de intensa investigación científica ya que cada vez se identifican más lípidos bioactivos y se caracterizan sus acciones.

Los ejemplos de lípidos bioactivos incluyen los eicosanoides (incluyendo los cannabinoides, leucotrienos, prostaglandinas, lipoxinas, ácidos epoxieicosatrienoicos e isoeicosanoides), mediadores cannabinoides no eicosanoides, fosfolípidos y sus derivados tales como ácido fosfatídico (PA) y fosfatidilglicerol (PG), factor de activación de plaquetas (PAF) y cardiolipinas así como lisofosfolípidos tales como lisofosfatidilcolina (LPC) y diversos ácidos lisofosfatídicos (LPA). Los lípidos de señalización bioactivos también incluyen los esfingolípidos tales como esfingomielina, ceramida, ceramida-1-fosfato, esfingosina, esfingosilfosforilcolina, esfinganina, esfinganina-1-fosfato (dihidro-S1P) y esfingosina-1-fosfato. Los esfingolípidos y sus derivados representan un grupo de moléculas de señalización extracelulares e intracelulares con efectos pleiotrópicos sobre importantes procesos celulares. Otros ejemplos de lípidos de señalización bioactivos incluyen fosfatidilserina (PS), fosfatidilinositol (PI), fosfatidiletanolamina (PEA), diacilglicérido (DG), sulfátidos, gangliósidos y cerebrósidos.

1. Lisolípidos

Los lisofosfolípidos (LPL), también conocidos como lisolípidos, son lípidos de bajo peso molecular (normalmente de menos de aproximadamente 500 Dalton) que contienen un único esqueleto principal hidrocarbonado y un grupo de cabeza polar que contiene un grupo fosfato. Algunos lisolípidos son lípidos de señalización bioactivos. Dos ejemplos particulares de lisolípidos bioactivos médicamente importantes son LPA (esqueleto de glicerol) y S1P (esqueleto de esfingoide). A continuación se presentan las estructuras de S1P, dihidro-S1P y LPA seleccionados.



LPA no es una única entidad molecular sino una colección de variantes estructurales endógenas con ácidos grasos de diversas longitudes y grados de saturación. Fujiwara *et al.* (2005), *J Biol Chem*, 280: 35038-35050. El esqueleto estructural de los LPA se deriva de fosfolípidos basados en glicerol tales como fosfatidilcolina (PC) o ácido fosfatídico (PA). En el caso de lisoesfingolípidos tales como S1P, falta el ácido graso del esqueleto de ceramida. El esqueleto estructural de S1P, dihidro-S1P (DHS1P) y esfingosilfosforilcolina (SPC) se basa en esfingosina, que se deriva de esfingomielina.

LPA y S1P regulan diversas rutas de señalización celular mediante la unión a la misma clase de receptores acoplados a proteínas G (GPCR) con múltiples dominios transmembrana. Chun J, Rosen H (2006), *Current Pharm Des*, 12: 161-171 y Moolenaar WH (1999), *Experimental Cell Research*, 253: 230-238. Los receptores de S1P se designan como S1P1, S1P2, S1P3, S1P4 y S1P5 (anteriormente EDG-1, EDG-5/AGR16, EDG-3, EDG-6 y EDG-8) y los receptores de LPA se designan como LPA1, LPA2, LPA3 (anteriormente EDG-2, EDG-4 y EDG-7). Se ha identificado un cuarto receptor de LPA de esta familia para LPA (LPA4), y también se han notificado otros supuestos receptores para estos lisofosfolípidos.

Se ha mostrado que LPA y S1P desempeñan un papel en la respuesta inmunitaria mediante modulación de células relacionadas con el sistema inmunitario tales como linfocitos T y B. Estos lípidos fomentan la migración de células T a sitios de respuesta inmunitaria y regulan la proliferación de células T así como la secreción de diversas citocinas. Chun J y Rosen H, (2006) *Curr Pharm Des*. 12:161-171; Huang *et al.*, (2002) *Biophys Biochim Acta* 1582:161-167; Rosen H y EJ Goetzl (2005) *Nat Rev Immunol* (2005) 5:560-70. En particular, se piensa que S1P controla la salida de linfocitos a la circulación periférica. Por tanto, se cree que agentes que se unen a LPA y S1P son útiles en métodos para disminuir una respuesta inmunitaria indeseada, excesiva o aberrante, y para tratar enfermedades y estados, incluyendo determinados cánceres hematológicos y trastornos autoinmunitarios que están asociados con una implicación indeseada, excesiva o aberrante de linfocitos y/o una respuesta inmunitaria aberrante.

a. Esfingosina-1-fosfato

S1P es un mediador de la proliferación celular y protege frente a la apoptosis mediante la activación de rutas de supervivencia. Maceyka *et al.* (2002), *Biochim Biophys Acta*, 1585: 192-201; Spiegel S. *et al.* (2003), *Nat Revs Molec Cell Biol*, 4: 397-407. Se ha propuesto que el equilibrio entre los niveles de ceramida/esfingosina (CER/SPH) y S1P proporciona un mecanismo de reóstato que decide si una célula se dirige hacia la ruta de muerte o se protege frente a la apoptosis. La enzima reguladora clave del mecanismo de reóstato es la esfingosina cinasa (SPHK) cuyo papel es convertir lípidos de señalización bioactivos que fomentan la muerte (CER/SPH) en S1P que fomenta el crecimiento. S1P tiene dos destinos: S1P puede degradarse por S1P liasa, una enzima que escinde S1P para dar

fosfoetanolamina y hexadecanal, o, de manera menos común, hidrolizarse por S1P fosfatasa para dar SPH.

S1P se genera en abundancia y se almacena en plaquetas, que contienen altos niveles de SPHK y carecen de enzimas para la degradación de S1P. Cuando se activan las plaquetas, se secreta S1P. Además, también se cree que otros tipos de célula, por ejemplo, mastocitos, pueden secretar S1P. Una vez secretado, se piensa que S1P se une a altas concentraciones a proteínas transportadoras tales como albúmina sérica y lipoproteínas. S1P se encuentra en altas concentraciones en el plasma, habiéndose notificado concentraciones en el intervalo de 0,5 - 5 uM. Aunque principalmente es extracelular, también se han sugerido acciones intracelulares de S1P (véanse, por ejemplo, Spiegel S, Kolesnick R (2002), *Leukemia*, 16: 1596-602; Suomalainen *et al* (2005), *Am J Pathol*, 166: 773-81).

La expresión generalizada de los receptores de S1P de superficie celular permite que S1P influya sobre un diverso espectro de respuestas celulares, incluyendo proliferación, adhesión, contracción, motilidad, morfogénesis, diferenciación y supervivencia. Este espectro de respuesta parece depender de los patrones de expresión solapantes o diferenciados de los receptores de S1P dentro de los sistemas celulares y tisulares. Además, recientemente se ha demostrado la interferencia entre rutas de señalización de S1P y factores de crecimiento, incluyendo factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor de crecimiento transformante beta (TGF β) y factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF) (véase, por ejemplo, Baudhuin, *et al.* (2004), *FASEB J*, 18: 341-3). Dado que la regulación de diversos procesos celulares que implican al S1P tiene un impacto particular sobre la señalización neuronal, el tono vascular, la cicatrización de heridas, el tráfico de células inmunitarias, la reproducción y la función cardiovascular, entre otras cosas, se cree que alteraciones de los niveles endógenos de S1P dentro de estos sistemas pueden tener efectos perjudiciales, provocando diversos estados fisiopatológicos, incluyendo cáncer, insuficiencia cardíaca, enfermedad ocular y enfermedades autoinmunitarias e infecciosas. Se propone que una estrategia posiblemente eficaz para tratar trastornos autoinmunitarios es reducir los niveles extracelulares biológicamente disponibles de S1P. Los solicitantes han desarrollado un anticuerpo monoclonal murino que es específico para S1P. Esto representa el primer anticuerpo monoclonal creado satisfactoriamente contra una diana de esfingolípido de señalización bioactivo. El anticuerpo actúa como esponja molecular para absorber selectivamente S1P del líquido extracelular, reduciendo la concentración eficaz de S1P. Se une selectivamente a, y neutraliza, S1P con afinidad picomolar en matrices biológicas. Visentin *et al.*, (2006) *Cancer Cell* 9:225-238. De manera interesante, S1P se conserva a través de las especies, al contrario que la mayoría de las dianas farmacológicas proteicas. S1P humano es idéntico a S1P murino y de mono, por ejemplo.

Tal como se usa en el presente documento, "esfingosina-1-fosfato" o S1P se refiere a esfingosina-1-fosfato [esfingeno-1-fosfato; D-eritro-esfingosina-1-fosfato; esfing-4-enina-1-fosfato; ácido (E,2S,3R)-2-amino-3-hidroxi-octadec-4-enoxi]fosfónico; CAS 26993-30-6] y sus variantes, S1P y DHS1P (dihidro-esfingosina-1-fosfato [esfinganina-1-fosfato; ácido [(2S,3R)-2-amino-3-hidroxi-octadecoxi]fosfónico; D-eritro-dihidro-D-esfingosina-1-fosfato; CAS 19794-97-9] y esfingosilfosforilcolina. Las variantes de S1P y LPA, tal como se usan en el presente documento, incluyen análogos y derivados de S1P y LPA, respectivamente, que funcionan de manera similar, o que puede esperarse que funcionen de manera similar, a la molécula original.

La inhibición de la señalización de S1P produce la inmunosupresión y mejora útiles de trastornos autoinmunitarios:

FTY720 (FTY; fingolimod; clorhidrato de 2-amino-2-(2-[4-octilfenil]etil)-1,3-propanodiol), un análogo de esfingosina de molécula pequeña, es un fármaco inmunosupresor novedoso que actúa alterando el tráfico de linfocitos, dando como resultado linfopenia de sangre periférica y aumento de recuentos de linfocitos en ganglios linfáticos. FTY media en sus efectos inmunomoduladores mediante la unión a algunos de los receptores de S1P expresados en linfocitos. Bohler T *et al.* (2005), *Transplantation*, 79: 492-5.

Se cree que FTY actúa mediante una interacción con los receptores de S1P, S1P1, S1P3, S1P4 y S1P5 (pero no S1P2). Se cree que inicialmente FTY activa receptores de S1P y actúa como agonista de S1P. Después, FTY provoca una internalización anómala de estos receptores, inactivándolos mediante su retirada de la membrana plasmática. Por tanto, aunque puede actuar inicialmente como agonista de receptores de S1P, sus efectos a largo plazo son los de un antagonista funcional. Massberg, S y U. von Andrian (2006) *New Engl. J. Med.* 355:1088-1091. El fármaco se administra por vía oral y una única dosis oral redujo los recuentos de linfocitos periféricos en un 30-70%. FTY redujo un subconjunto de células T, células CD4(+) más que células CD8(+). Bohler *et al.* (2004), *Nephrol Dial Transplant*, 19: 702-13. Ratones tratados con FTY mostraron una prolongación significativa de la supervivencia de injerto de córnea ortotópico cuando se administró por vía oral. Zhang *et al.* (2003), *Transplantation*, 76: 1511-3. El tratamiento oral con FTY también retrasó significativamente el rechazo y redujo su intensidad en un modelo de rata a ratón de xenotrasplante de córnea. Sedlakova *et al.* (2005), *Transplantation*, 79, 297-303. Dada la patogenia conocida del rechazo de aloinjerto en combinación con estos datos que sugieren que modular los efectos de la señalización de S1P puede mejorar la supervivencia del injerto, se cree que agentes, incluyendo anticuerpos que se unen a, y de ese modo disminuyen la concentración eficaz de, lípidos bioactivos también serán útiles en el tratamiento de rechazo de aloinjerto y otros estados caracterizados por una respuesta inmunitaria aberrante, indeseada o excesiva.

S1P1 está implicado en el tráfico de linfocitos y se requiere para la salida de linfocitos del timo y órganos linfoides

secundarios (bazo, ganglios linfáticos y tejidos linfáticos asociados con la mucosa tales como vegetaciones, amígdalas, apéndice y placas de Peyer), que son sitios de inicio de la respuesta inmunitaria. Los linfocitos circulan de la sangre hacia los ganglios linfáticos y al interior de la linfa. La salida de linfocitos (de vuelta a la circulación) desde la linfa se realiza a través del conducto torácico. Los linfocitos también recirculan a través del bazo. El inhibidor de S1P1, FTY, provoca una rápida linfopenia (reducción de linfocitos en la sangre) que es destacada (pérdida de 10-100 veces en varias horas) y va acompañada por una reducción de linfocitos en la linfa. Puede observarse un aumento de linfocitos en órganos linfoides secundarios y el timo. Por tanto, se cree que los efectos inmunosupresores de FTY se deben al bloqueo de la salida de linfocitos mediada por S1P1 desde estos órganos a la circulación que suministrará los linfocitos al sitio de respuesta inmunitaria. Para una revisión, véase Cyster, J., (2005) *Ann. Rev. Immunol.* 23:127-159. Este bloqueo de la salida de linfocitos también puede denominarse secuestro de linfocitos y se cree que explica la eficacia de FTY en modelos de animales de trastornos autoinmunitarios y de trasplantes.

Agentes y anticuerpos que se unen a S1P e impiden la interacción de ligando con su complemento de receptores pueden tener un efecto similar al de FTY pero mediante un mecanismo diferente. Sin limitarse a ninguna teoría particular, los solicitantes creen que agentes como anticuerpos anti-S1P pueden actuar impidiendo la unión de S1P a su complemento de receptores en linfocitos y otras células implicadas en el tráfico de linfocitos. El silenciamiento de los receptores con un AcM anti-S1P tendrá un efecto similar al de la capacidad de FTY para regular por disminución la presencia de receptores en la membrana de superficie de una célula. Además, se cree que disminuyendo la concentración eficaz de S1P, el AcM anti-S1P puede actuar para reducir el gradiente de S1P entre el tejido linfático y la sangre. Este gradiente puede ser crítico para la salida de linfocitos y puede actuar de manera concertada con la activación de S1P de receptores sobre superficies de linfocitos.

La zona marginal del bazo se encuentra entre la pulpa roja no linfoide y la pulpa blanca linfoide del bazo. Como resultado, las células de linfocitos B en la zona marginal se exponen continuamente a la sangre (y con ella, a antígenos). Los factores que dirigen células B a la zona marginal no se entienden bien. El tratamiento con FTY provoca el desplazamiento de células B desde la zona marginal hacia folículos linfoides, conduciendo a la conclusión de que S1P1 fomenta la localización de células B de la zona marginal en la zona marginal esplénica. Cinamon *et al.*, (2004) *Nature Immunol.* 5:713-720. Por tanto, además de su papel en la salida de linfocitos, la señalización de S1P también desempeña un papel en la compartimentalización de tejido linfoide.

Tal como puede observarse en el ejemplo 1 a continuación en el presente documento, el AcM anti-S1P desarrollado por Lpath, Inc. provoca linfopenia en ratones. Puede argumentarse que al actuar como esponja molecular para reducir la concentración eficaz de S1P, el anticuerpo puede privar a los receptores de S1P de su ligando y reducir el gradiente de S1P entre tejido linfoide y la circulación periférica. Al hacer esto, la salida de linfocitos desde vasos linfáticos y el bazo puede retrasarse o reducirse.

La esclerosis múltiple (EM) es una enfermedad autoinmunitaria en la que una respuesta inmunitaria dirigida hacia oligodendrocitos da como resultado daño focal a las vainas de mielina en el sistema nervioso central (SNC). Esto da como resultado incapacidad y deterioro neurológico intensos, generalmente progresivos. Se ha llevado a cabo un pequeño ensayo clínico controlado con placebo de FTY720 en pacientes con la forma recidivante de EM. Se administró FTY o placebo por vía oral una vez al día durante seis meses y los pacientes que recibieron FTY mostraron una rápida reducción en la actividad de la enfermedad, medida mediante una reducción significativa en la tasa de recidiva. También se demostró una reducción en el número de lesiones del SNC potenciadas por gadolinio medidas mediante IRM. En un estudio de cambio, los pacientes que comenzaron con placebo mostraron una mejora cuando se cambiaron a FTY. Kappos *et al.*, (2006) *N. Engl. J. Med.* 355:1124-1140, y revisión de Massberg S y von Andrian, U. (2006) *N. Engl. J. Med.* 355: 1088-1091.

Se ha mostrado que FTY (FTY o FTY-P) atenúa el desarrollo de colitis inducida por sulfato sódico de dextrano (DSS) y colitis por transferencia de células T CD4+CD62L+. FTY fue eficaz en la prevención de la pérdida de peso corporal en ambos modelos, y el índice de actividad de la enfermedad y la puntuación de colitis histológica fueron significativamente menores en ratones tratados con FTY que en los ratones no tratados. En ambos modelos de colitis, FTY impidió la infiltración de células T GD4+ al interior de la lámina propia del colon inflamada y, por ese motivo, los autores sugieren FTY como posible tratamiento clínico para la enfermedad inflamatoria del intestino (EII). Deguchi *et al.*, (2006) *Oncol Rep.* 16:699-703.

Se cree que FTY interfiere en la señalización de S1P mediante unión a receptores de S1P. Se cree que se obtendrán efectos similares usando agentes tales como el AcM anti-S1P de Lpath, que se une directamente a S1P y de ese modo disminuye la concentración eficaz de S1P. Esto también se denomina neutralizar S1P. Ejemplos de tales agentes son restos inmunoderivados (por ejemplo, anticuerpos y fragmentos de anticuerpos), moléculas pequeñas, aptámeros, fragmentos de receptores de S1P y similares. Por tanto, se cree que tales agentes serán eficaces contra enfermedades autoinmunitarias y otras enfermedades caracterizadas por una respuesta inmunitaria aberrante, excesiva o indeseada.

La patente estadounidense 6.098.631 (Holoshitz *et al.*) da a conocer métodos y composiciones para tratar y diagnosticar enfermedades autoinmunitarias usando compuestos que inhiben la proliferación e inducen la apoptosis, incluyendo compuestos que son inhibidores de la ruta de transducción de señales de esfingomielina.

b. Ácidos lisofosfáticos (LPA)

- Los LPA se conocen desde hace mucho como precursores de la biosíntesis de fosfolípidos en células tanto eucariotas como procariotas, pero los LPA sólo han surgido recientemente como moléculas de señalización que se producen rápidamente y se liberan por células activadas, notablemente plaquetas, para influir en células diana actuando sobre un receptor de superficie celular específico (véase, por ejemplo, Moolenaar *et al.* (2004), *BioEssays*, 26: 870-881 y van Leewen *et al.* (2003), *Biochem Soc Trans*, 31: 1209-1212). Además de sintetizarse y procesarse para dar fosfolípidos más complejos en el retículo endoplasmático, los LPA pueden generarse mediante la hidrólisis de fosfolípidos preexistentes tras la activación celular; por ejemplo, a la posición sn-2 le falta comúnmente un residuo de ácido graso debido a la desacilación, dejando únicamente el hidroxilo en sn-3 esterificado con un ácido graso. Además, una enzima clave en la producción de LPA, autotaxina (lisoPLD/NPP2), puede ser el producto de un oncogén, ya que muchos tipos de tumores regulan por incremento la autotoxina. Brindley (2004), *J Cell Biochem*, 92: 900-12. Se han notificado las concentraciones de LPA en el plasma y suero humanos, incluyendo determinaciones realizadas usando procedimientos de CL/EM sensibles y específicos. Baker *et al.* (2001), *Anal Biochem*, 292: 287-295. Por ejemplo, en suero humano recién preparado que se dejó en reposo a 25°C durante una hora, se estimó que las concentraciones de LPA eran de aproximadamente 1,2 mM, siendo los análogos de LPA 16:0, 18:1, 18:2 y 20:4 las especies predominantes. De manera similar, en plasma humano recién preparado que se dejó en reposo a 25°C durante una hora, se estimó que las concentraciones de LPA eran de aproximadamente 0,7 mM, siendo 18:1 y 18:2 LPA las especies predominantes.
- Los LPA influyen en una amplia gama de respuestas biológicas, incluyendo inducción de proliferación celular, estimulación de migración celular y retracción de neuritas, cierre de unión comunicante, e incluso quimiotaxia de moho mucilaginoso. Goetzl *et al.* (2002), *Scient World J*, 2: 324-338. El conjunto de conocimientos sobre la biología de LPA sigue creciendo a medida que se someten a prueba cada vez más sistemas celulares para determinar la capacidad de respuesta a LPA. Por ejemplo:
- Cicatrización de heridas: se sabe que, además de estimular el crecimiento y la proliferación celulares, LPA fomenta la tensión celular y la unión de fibronectina a la superficie celular, que son acontecimientos importantes en la reparación y regeneración de heridas. Moolenaar *et al.* (2004), *BioEssays*, 26: 870-881.
- Apoptosis: recientemente, también se ha atribuido actividad antiapoptótica a LPA, y recientemente se ha notificado que el receptor gamma de proliferación de peroxisomas es un receptor/diana para LPA. Simon *et al.* (2005), *J Biol Chem*, 280: 14656-14662.
- Maduración de vasos sanguíneos: la autotaxina, una lisofosfolipasa D secretada responsable de producir LPA, es esencial para la formación de vasos sanguíneos durante el desarrollo. van Meeteren *et al.* (2006), *Mol Cell Biol*, 26: 5015-22. Además, se identificaron LPA insaturados como principales agentes contribuyentes a la inducción de la desdiferenciación de células del músculo liso vascular. Hayashi *et al.* (2001), *Circ Res*, 89: 251-8.
- Edema y permeabilidad vascular: LPA induce la exudación plasmática y la liberación de histaminas en ratones. Hashimoto *et al.* (2006), *J Pharmacol Sci*, 100: 82-7.
- Inflamación: LPA actúa como mediador inflamatorio en células epiteliales de córnea humanas. Zhang *et al.* (2006), *Am J Physiol*, 7 de junio. LPA participa en la cicatrización de heridas de la córnea [Liliom K *et al.* (1998), *Am. J. Physiol*, 274: C1065-C1074] y estimula la liberación de ROS en el tejido del cristalino [Rao *et al.* (2004), *Molecular Visions*, 10: 112-121]. LPA también puede reactivar VHS-1 en la córnea de conejo. Martín *et al.* (1999), *Molec Vis*, 5: 36-42.
- Fibrosis y formación de cicatrices: LPA inhibe la estimulación mediada por TGF de la estabilidad de ARNm de colágeno tipo I mediante una ruta dependiente de ERK en fibroblastos dérmicos. Sato *et al.* (2004), *Matrix Biol*, 23: 353-61. Además, LPA tiene algunos efectos fibrogénicos directos mediante estimulación de la expresión y proliferación de genes de colágeno de fibroblastos. Chen, *et al.* (2006) *FEBS Lett.* 580:4737-45.
- Respuesta inmunitaria: se ha mostrado que LPA, al igual que S1P, desempeña un papel en la respuesta inmunitaria mediante modulación de células relacionadas con el sistema inmunitario. Estos lípidos fomentan la migración de células T a sitios de respuesta inmunitaria y regulan la proliferación de células T así como la secreción de diversas citocinas. Chun J y Rosen H, (2006) *Curr. Pharm Des.* 12:161-171; Huang *et al.*, (2002) *Biophys. Biochim. Acta* 1582:161-167; Rosen H y EJ Goetzl (2005) *Nat Rev Immunol.* (2005) 5:560-70. Un artículo reciente (Kanda *et al.*, (2008) *Nature Imm.* 9, 415-423) implica además a LPA y la autotoxina en el tráfico de linfocitos. Por tanto, se cree que agentes que reducen la concentración eficaz de LPA, tales como el AcM anti-LPA de Lpath, son útiles en métodos para disminuir una respuesta inmunitaria indeseada, excesiva o aberrante, y para tratar enfermedades y estados, incluyendo trastornos autoinmunitarios que están asociados con una respuesta inmunitaria indeseada, excesiva o aberrante.
- Recientemente, los solicitantes han desarrollado varios anticuerpos monoclonales contra LPA. Al igual que el anticuerpo anti-S1P, los anticuerpos anti-LPA pueden neutralizar diversos LPA y mitigar su acción biológica y farmacológica. Por tanto, se cree que los anticuerpos anti-LPA son útiles en la prevención y/o el tratamiento de enfermedades y estados relacionados con el sistema inmunitario.

III. Definiciones.

Antes de definir en detalle la presente invención, se definirán varios términos usados en el contexto de la presente invención. Además de estos términos, otros se definen en otra parte en la memoria descriptiva, según sea necesario. A menos que se defina expresamente lo contrario en el presente documento, los términos de la técnica usados en esta memoria descriptiva tendrán sus significados reconocidos en la técnica.

Un “resto inmunoderivado” se refiere a cualquier anticuerpo policlonal o monoclonal o fragmento, variante o derivado de anticuerpo.

Un “anticuerpo anti-S1P” o un “resto inmunoderivado reactivo contra S1P” se refiere a cualquier anticuerpo o molécula derivada de anticuerpo que se une a S1P.

Un “anticuerpo anti-LPA” o un “resto inmunoderivado reactivo contra LPA” se refiere a cualquier anticuerpo o molécula derivada de anticuerpo que se une a todos o a uno o más de los LPA.

Un “lípidio bioactivo” se refiere a una molécula de señalización de lípidos. En general, un lípidio bioactivo no se encuentra en una membrana biológica cuando ejerce sus efectos de señalización, lo cual significa que aunque una especie lipídica de este tipo puede existir en algún momento en una membrana biológica (por ejemplo, una membrana celular, una membrana de un orgánulo celular, etc.), cuando está asociada con una membrana biológica no es un lípidio bioactivo sino en vez de eso una molécula de “lípidio estructural”. Los lípidos bioactivos se distinguen de los lípidos estructurales (por ejemplo, fosfolípidos unidos a membrana) porque median en la señalización extracelular y/o intracelular y, por tanto, están implicados en el control de la función de muchos tipos de células mediante la modulación de la diferenciación, migración, proliferación, secreción, supervivencia y otros procesos. *In vivo*, pueden encontrarse lípidos bioactivos en líquidos extracelulares, en los que pueden estar complejados con otras moléculas, por ejemplo proteínas séricas tales como albúmina y lipoproteínas, o en forma “libre”, es decir, no complejados con otras especies moleculares. Como mediadores extracelulares, algunos lípidos bioactivos alteran la señalización celular mediante activación de canales iónicos unidos a membrana o receptores acoplados a proteínas G que, a su vez, activan sistemas de señalización complejos que dan como resultado cambios en la función o supervivencia celular. Como mediadores intracelulares, los lípidos bioactivos pueden ejercer sus acciones interactuando directamente con componentes intracelulares tales como enzimas y canales iónicos. Los ejemplos representativos de lípidos bioactivos incluyen LPA y S1P.

La “concentración eficaz” de un lípidio bioactivo, tal como esfingosina-1-fosfato, significa la cantidad de dicho lípidio bioactivo que está disponible y activo en procesos biológicos. La concentración eficaz de un lípidio bioactivo puede reducirse de varias maneras, incluyendo la reducción de la concentración real del lípidio (mediante disminución de la producción o aumento de la degradación del lípidio, por ejemplo), reducción de la concentración de lípidio libremente disponible (mediante complejación o unión a otra molécula, por ejemplo), o reducción de la actividad del lípidio (mediante interferencia en la capacidad del lípidio bioactivo para unirse a uno o más receptores, por ejemplo). La reducción de la concentración eficaz de un lípidio bioactivo puede denominarse “neutralización” del lípidio bioactivo. A modo de ejemplo, puede decirse que un anticuerpo que se une a S1P y bloquea o interfiere en sus funciones biológicas (señalización, por ejemplo) neutraliza S1P, porque la unión a anticuerpo sirve para disminuir la concentración eficaz de S1P disponible, impidiendo que lleve a cabo sus funciones de señalización.

El término “agente terapéutico” significa un agente para modular respuestas inmunitarias, particularmente respuestas inmunitarias, incluyendo respuestas autoinmunitarias, indeseadas, excesivas o aberrantes.

El término “terapia de combinación” se refiere al régimen terapéutico que implica proporcionar al menos dos terapias diferenciadas para alcanzar un efecto terapéutico indicado. Por ejemplo, una terapia de combinación puede implicar la administración de dos o más principios activos químicamente diferenciados, por ejemplo, un anticuerpo anti-LPA y un anticuerpo anti-S1P. Alternativamente, una terapia de combinación puede implicar la administración de un resto inmunoderivado reactivo contra un lípidio bioactivo y la administración de uno o más de otros medicamentos o agentes quimioterápicos. Alternativamente, la terapia de combinación puede implicar la administración de un anticuerpo anti-lípido junto con la administración de otro tratamiento, tal como radioterapia y/o cirugía. Además, una terapia de combinación puede implicar la administración de un anticuerpo anti-lípido junto con uno o más de otros agentes biológicos (por ejemplo, agente anti-VEGF, TGF, PDGF o bFGF), agentes quimioterápicos y otro tratamiento tal como radiación y/o cirugía. En el contexto de la terapia de combinación usando dos o más principios activos químicamente diferenciados, se entiende que los principios activos pueden administrarse como parte de la misma composición o como composiciones diferentes. Cuando se administran como composiciones separadas, las composiciones que comprenden los diferentes principios activos pueden administrarse al mismo tiempo o en momentos diferentes, mediante la misma vía o vías diferentes, usando las mismas pautas posológicas o pautas posológicas diferentes, todo según requiera el contexto particular y según determine el médico encargado. De manera similar, cuando una o más especies de anticuerpo anti-lípido, por ejemplo, un anticuerpo anti-LPA, solo o junto con uno o más agentes quimioterápicos, se combinan, por ejemplo, con radiación y/o cirugía, el/los fármaco(s) puede(n) administrarse antes o después del tratamiento con radiación o cirugía.

“Monoterapia” se refiere a un régimen de tratamiento basado en la administración de un compuesto

terapéuticamente eficaz, tanto si se administra como una única dosis o como varias dosis a lo largo del tiempo.

Una composición, procedimiento, máquina o artículo de fabricación "patentable" según la invención significa que el objeto satisface todos los requisitos legales para la patentabilidad en el momento en el que se realiza el análisis. Por ejemplo, con respecto a la novedad, actividad inventiva, o similares, si una investigación posterior revela que una o más reivindicaciones abarca una o más realizaciones que anulen la novedad, actividad inventiva, etc., la(s) reivindicación/reivindicaciones, limitadas por definición a realizaciones patentables, excluyen específicamente la(s) realización/realizaciones no patentable(s). Además, las reivindicaciones adjuntas al presente documento deben interpretarse tanto para proporcionar el mayor alcance razonable, así como para conservar su validez. Además, las reivindicaciones deben interpretarse de una manera que (1) conserve su validez y (2) proporcione la mayor interpretación razonable según las circunstancias, si se modifican uno o más de los requisitos legales de patentabilidad o si cambian las normas para evaluar si se satisface un requisito legal de patentabilidad particular desde el momento en el que se presenta esta solicitud o se concede como patente hasta el momento en el que se cuestiona la validez de una o más de las reivindicaciones adjuntas.

El término "sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a sales que conservan la eficacia biológica y las propiedades de los agentes y compuestos de esta invención y que no son indeseables desde el punto de vista biológico o de otro modo. En muchos casos, los agentes y compuestos de esta invención pueden formar sales de ácido y/o base gracias a la presencia de grupos cargados, por ejemplo, grupos amino y/o carboxilo cargados o grupos similares a los mismos. Pueden prepararse sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables a partir de ácidos orgánicos e inorgánicos, mientras que pueden prepararse sales de adición de base farmacéuticamente aceptables a partir de bases orgánicas e inorgánicas. Para una revisión de sales farmacéuticamente aceptables, véase Berge *et al.* (1977) *J. Pharm. Sci.*, 66, 1-19.

Los términos "separado", "purificado", "aislado" y similares significan que uno o más componentes de una muestra contenida en un recipiente de contención de muestras están retirados o se han retirado físicamente de, o diluido en presencia de, uno o más de otros componentes de muestra presentes en el recipiente. Los componentes de muestra que pueden retirarse o diluirse durante una etapa de separación o purificación incluyen productos de reacción química, compuestos químicos sin reaccionar, proteínas, hidratos de carbono, lípidos y moléculas no unidas.

El término "especie" se usa en el presente documento en diversos contextos, por ejemplo, una especie particular de agente quimioterápico. En cada contexto, el término se refiere a una población de moléculas, no distinguibles químicamente unas de otras, de la clase a la que se hace referencia en el contexto particular.

"Asociar específicamente" y "asociación específica" y similares se refieren a una interacción específica, no aleatoria, entre dos moléculas, interacción que depende de la presencia de características estructurales, hidrófobas/hidrófilas y/o electrostáticas que permiten interacciones químicas o moleculares apropiadas entre las moléculas.

En el presente documento, "estable" se refiere a una interacción entre dos moléculas (por ejemplo, unión de un anticuerpo anti-LPA o anti-S1P a su lípido bioactivo diana) que es lo suficientemente fuerte de tal manera que la interacción de las moléculas puede mantenerse para el fin o la manipulación deseados.

Un "sujeto" o "paciente" se refiere a un animal en el que puede realizarse tratamiento mediante moléculas de la invención. El animal puede tener, o correr el riesgo de tener, o creerse que tiene o que corre el riesgo de tener, una enfermedad o un estado que puede tratarse mediante composiciones y/o métodos de la presente invención. Los animales que pueden tratarse según la invención incluyen vertebrados, siendo mamíferos tales como animales bovinos, caninos, equinos, felinos, ovinos, porcinos y primates (incluyendo seres humanos y primates no humanos) ejemplos particularmente preferidos.

Una "cantidad terapéuticamente eficaz" (o "cantidad eficaz") se refiere a una cantidad de un principio activo, por ejemplo, un agente según la invención, suficiente como para realizar el tratamiento cuando se administra a un sujeto o paciente. Por consiguiente, lo que constituye una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición según la invención puede determinarlo fácilmente un experto habitual en la técnica. En el contexto de terapia para trastornos autoinmunitarios u otros relacionados con el sistema inmunitario, una cantidad terapéuticamente eficaz es una que produce un cambio medido de manera objetiva en uno o más parámetros asociados con una respuesta inmunitaria. Los ejemplos no limitativos de tales parámetros incluyen: número de linfocitos o células T circulantes, secuestro (por ejemplo, acumulación) de células T en el/los órgano(s) linfoides, y nivel de activación de linfocitos.

Evidentemente, la cantidad terapéuticamente eficaz variará dependiendo del sujeto particular y el estado que esté tratándose, el peso y la edad del sujeto, la intensidad del estado patológico, el compuesto particular elegido, la pauta posológica que va a seguirse, el momento de la administración, el modo de administración y similares, todos los cuales puede determinarlos fácilmente un experto habitual en la técnica. Se apreciará que en el contexto de terapia de combinación, lo que constituye una cantidad terapéuticamente eficaz de un principio activo particular puede diferir de lo que constituye una cantidad terapéuticamente eficaz del principio activo cuando se administra como monoterapia (es decir, un régimen terapéutico que sólo emplea una entidad química como principio activo).

El término "tratamiento" o "tratar" una enfermedad o un trastorno incluye prevenir o proteger frente a la enfermedad o el trastorno (es decir, provocar que no se desarrollen los síntomas clínicos); inhibir la enfermedad o el trastorno (es

decir, detener o suprimir el desarrollo de síntomas clínicos); y/o aliviar la enfermedad o el trastorno (es decir, provocar la regresión de síntomas clínicos). Tal como se apreciará, no siempre es posible distinguir entre prevenir y suprimir una enfermedad o un trastorno dado que el acontecimiento o los acontecimientos inductivos finales pueden no conocerse o estar latentes. Por consiguiente, se entenderá que el término "profilaxis" constituye un tipo de tratamiento que abarca tanto prevenir como suprimir. Por tanto, el término tratamiento incluye la profilaxis.

El término "régimen terapéutico" significa cualquier tratamiento de una enfermedad o un trastorno usando fármacos quimioterápicos, radioterapia, cirugía, terapia génica, terapia y vacunas de ADN, terapias basadas en agentes antisentido incluyendo terapia con ARNip, terapia antiangiogénica, inmunoterapia, trasplantes de médula ósea, aptámeros y otros agentes biológicos tales como anticuerpos y variantes de anticuerpos, receptores señuelo y otros agentes terapéuticos basados en proteínas.

Sumario de la invención

Según la presente invención, se proporcionan métodos para disminuir una respuesta inmunitaria en un animal, incluyendo un ser humano, que comprenden administrar al animal un agente que se une a un lípido bioactivo y reduce la concentración eficaz del lípido bioactivo. La respuesta inmunitaria es generalmente una respuesta inmunitaria aberrante, excesiva o indeseada, y puede ser una respuesta autoinmunitaria.

También se proporcionan métodos de tratamiento de enfermedades o estados caracterizados por una respuesta inmunitaria aberrante, excesiva o indeseada, que comprenden administrar un agente que se une a un lípido bioactivo y reduce la concentración eficaz de dicho lípido bioactivo. La enfermedad o el estado puede ser una enfermedad o un estado autoinmunitario o una reacción de rechazo de tejido indeseada. También se considera que trastornos caracterizados por infiltración de linfocitos inapropiada o aberrante son enfermedades caracterizadas por una respuesta inmunitaria excesiva, aberrante o indeseada y, por tanto, pueden tratarse según los métodos de la presente invención.

En algunos aspectos de estos métodos, el lípido bioactivo puede ser un esfingolípido o metabolito de esfingolípido o un lisolípido o metabolito de lisolípido, incluyendo S1P, LPA o una variante de los mismos. En algunas realizaciones el agente que se une al lípido bioactivo es un anticuerpo, tal como un anticuerpo monoclonal, que puede ser un anticuerpo monoclonal humanizado. El agente puede ser un fragmento de anticuerpo u otro tipo de agente tal como se describe a continuación en el presente documento.

Estos y otros aspectos y realizaciones de la invención se comentan con más detalle en las siguientes secciones.

Breve descripción de las figuras

Este documento contiene al menos una figura realizada a color. Se proporcionarán copias de este documento con figura(s) a color a petición y previo pago de la tasa necesaria. A continuación se proporciona un breve resumen de cada una de las figuras.

La figura 1 es un gráfico que representa gráficamente la puntuación de EAE media frente a los días tras la inducción de EAE.

La figura 2 contiene cuatro gráficos que muestran la pureza en porcentaje de diversas muestras de formulación que contienen 11 mg/ml del anticuerpo LT1009. Los datos representados gráficamente se obtuvieron mediante SE-HPLC, y los resultados de las formulaciones estudiadas a tiempo cero, a los 0,5 meses, 1 mes y 2 meses. En cada gráfico, las abscisas indican la pureza en porcentaje de cada punto de datos representado. Partiendo desde la parte inferior, los 6 primeros puntos en las ordenadas en cada gráfico son los resultados para pH 6,0; los puntos 7 a 12 son los resultados para pH 6,5; y los puntos 13 a 18 representan los resultados para pH 7,0. Asimismo, los tres primeros puntos desde la parte inferior muestran los resultados para 200 ppm de polisorbato-80 a pH 6,0, los tres puntos siguientes (4 a 6) representan los resultados para 500 ppm de polisorbato-80 a pH 6,0, los tres puntos siguientes (7 a 9) representan los resultados para 200 ppm de polisorbato-80 a pH 6,5, etc. El efecto de la condición de sal se representa en grupos de tres. El primer punto de cada grupo desde la parte inferior representa la condición de NaCl 148 mM, el siguiente punto (2) representa la condición de NaCl 300 mM y el tercer punto desde la parte inferior representa la condición de NaCl 450 mM, y así sucesivamente.

Descripción detallada de la invención

Una manera de controlar la cantidad de lípidos de señalización bioactivos indeseables es proporcionando una composición que se une a uno o más de estos lípidos. La presente invención describe métodos para disminuir una respuesta inmunitaria y para tratar estados asociados con una respuesta inmunitaria aberrante, no deseada o excesiva. Estos métodos comprenden administrar un agente que se une a un lípido de señalización bioactivo y disminuye la concentración eficaz del lípido bioactivo. Pueden usarse anticuerpos y otros compuestos que se unen a lípidos de señalización bioactivos como esponjas terapéuticas que reducen el nivel eficaz de lípido. Cuando se menciona que un compuesto está libre, no se restringe de ninguna manera que el compuesto alcance el sitio o los sitios en los que ejerce sus efectos indeseables. Normalmente, un compuesto libre está presente en el sistema cardiovascular o LOS vasos linfáticos, que o bien son o bien contienen el/los sitio(s) de acción del compuesto libre, o

desde los cuales un compuesto puede migrar libremente hasta su(s) sitio(s) de acción. Un compuesto libre también puede estar disponible para que actúe sobre él cualquier enzima que convierte el compuesto en un compuesto indeseable.

- 5 La invención se refiere a un agente contra esfingosina-1-fosfato (S1P) para su uso en un método para tratar esclerosis múltiple, en el que el agente es un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se une a, y neutraliza, S1P. Realizaciones adicionales de la invención son tal como se describen en las reivindicaciones adjuntas.

I. Agentes

A. Restos inmunoderivados

- 10 Recientemente se han aprobado varios anticuerpos para su uso terapéutico en seres humanos por la Federal Drug Administration. Kling (1999) *Mod. Drug Disc.* 2:33 45. En un aspecto de terapia basada en lípidos, pueden administrarse anticuerpos que se unen a lípidos de señalización bioactivos a un paciente, por ejemplo, incorporarse en composiciones farmacéuticas, dispositivos médicos, y similares, para su uso en terapia. Tales métodos pueden funcionar, por ejemplo, modulando la concentración eficaz de un lípido bioactivo diana en tejidos o líquidos corporales, o retirando lípido diana de la sangre *in vivo* o *ex vivo*.

- 15 El término "resto inmunoderivado", que incluye anticuerpos (Ac) o inmunoglobulinas (Ig), se refiere a cualquier forma de un péptido, polipéptido derivado de, modelado según o codificado por, un gen de inmunoglobulina, o un fragmento de tal péptido o polipéptido que puede unirse a un antígeno o epítipo [véase, por ejemplo, *Immunobiology*, 5ª edición, Janeway, Travers, Walport, Shlomchik (editores), Garland Publishing (2001)]. En la presente invención, el antígeno es una molécula de lípido bioactivo. Las moléculas de anticuerpo o inmunoglobulinas son grandes moléculas de glicoproteína con un peso molecular de aproximadamente 150 kDa, habitualmente compuestas por dos clases diferentes de cadena de polipéptido. Una cadena de polipéptido, denominada cadena "pesada" (H), es de aproximadamente 50 kDa. El otro polipéptido, denominado cadena "ligera" (L), es de aproximadamente 25 kDa. Cada molécula de inmunoglobulina consiste habitualmente en dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras. Las dos cadenas pesadas están unidas entre sí mediante enlaces disulfuro, cuyo número varía entre las cadenas pesadas de diferentes isotipos de inmunoglobulina. Cada cadena ligera está unida a una cadena pesada mediante un enlace disulfuro covalente. En cualquier molécula de anticuerpo dada que se produce de manera natural, las dos cadenas pesadas y las dos cadenas ligeras son idénticas, alojando dos sitios de unión a antígeno idénticos, y por tanto se dice que son divalentes, es decir, que tienen la capacidad para unirse simultáneamente a dos moléculas idénticas.

- 20 25 30 Las cadenas ligeras de moléculas de anticuerpo de cualquier especie de vertebrado pueden asignarse a uno de dos tipos claramente diferenciados, kappa (κ) y lambda (λ), basándose en las secuencias de aminoácidos de sus dominios constantes. La razón de los dos tipos de cadena ligera varía de una especie a otra. A modo de ejemplo, la razón promedio de κ con respecto a λ es de 20:1 en ratones, mientras que en seres humanos es de 2:1 y en el ganado es de 1:20.

- 35 40 Las cadenas pesadas de moléculas de anticuerpo de cualquier especie de vertebrado pueden asignarse a uno de cinco tipos claramente diferenciados, denominados isotipos, basándose en las secuencias de aminoácidos de sus dominios constantes. Algunos isotipos tienen varios subtipos. Las cinco clases principales de inmunoglobulina son inmunoglobulina M (IgM), inmunoglobulina D (IgD), inmunoglobulina G (IgG), inmunoglobulina A (IgA) e inmunoglobulina E (IgE). IgG es el isotipo más abundante y tiene varias subclases (IgG1, 2, 3, y 4 en seres humanos). El fragmento Fc y las regiones bisagra se diferencian en anticuerpos de diferentes isotipos, determinando por tanto sus propiedades funcionales. Sin embargo, la organización global de los dominios es similar en todos los isotipos.

- 45 50 El término "región variable" se refiere a la parte N-terminal de la molécula de anticuerpo o a un fragmento de la misma. En general, cada una de las cuatro cadenas tiene una región variable (V) en su parte amino-terminal, que contribuye al sitio de unión a antígeno, y una región constante (C), que determina el isotipo. Las cadenas ligeras están unidas a las cadenas pesadas mediante muchas interacciones no covalentes y mediante enlaces disulfuro y las regiones V de las cadenas pesadas y ligeras se emparejan en cada brazo de molécula de anticuerpo para generar dos sitios de unión a antígeno idénticos. Se cree que algunos residuos de aminoácido forman una superficie de contacto entre los dominios variables de cadena ligera y pesada [véase Kabat *et al.* (1991), *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, quinta edición, National Institute of Health, Bethesda, Md. y Clothia *et al.* (1985), *J. Mol. Biol.*, vol. 186: 651].

- 55 Debe observarse que la variabilidad no se distribuye uniformemente en la totalidad de los dominios variables de anticuerpos, sino que se concentra en tres segmentos denominados "regiones determinantes de complementariedad" (CDR) o "regiones hipervariables" en los dominios variables tanto de cadena ligera como de cadena pesada. Las partes más altamente conservadas de los dominios variables se denominan "región de marco" (FR). Los dominios variables de cadenas pesadas y ligeras nativas comprenden cada uno cuatro regiones FR conectadas por tres CDR. Las CDR en cada cadena se mantienen unidas en estrecha proximidad mediante las regiones FR y, con las CDR de las otras cadenas, forman el sitio de unión a antígeno de anticuerpos [véase Kabat *et*

al. (1991), *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, quinta edición, National Institute of Health, Bethesda, Md.]. De manera colectiva, las 6 CDR contribuyen a las propiedades de unión de la molécula de anticuerpo por el antígeno. Sin embargo, incluso un único dominio variable (o la mitad de un Fv, que únicamente comprende tres CDR específicas para un antígeno) tiene la capacidad para reconocer y unirse a antígeno [véase Pluckthun (1994), en *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., Springer-Verlag, Nueva York, págs. 269-315].

El término “dominio constante” se refiere a la región C-terminal de una cadena pesada o ligera de anticuerpo. Generalmente, los dominios constantes no están directamente implicados en las propiedades de unión de una molécula de anticuerpo a un antígeno, sino que muestran diversas funciones efectoras, tales como la participación del anticuerpo en toxicidad celular dependiente de anticuerpos. En este caso, las funciones efectoras se refieren a los diferentes efectos fisiológicos de anticuerpos (por ejemplo, opsonización, lisis celular, desgranulación de mastocitos, basófilos y eosinófilos, y otros procesos) mediados por el reclutamiento de células inmunitarias mediante la interacción molecular entre el dominio de Fc y proteínas del sistema inmunitario. El isotipo de la cadena pesada determina las propiedades funcionales del anticuerpo. Sus propiedades funcionales distintivas las confieren las partes carboxilo-terminal de las cadenas pesadas, en las que no están asociadas con cadenas ligeras.

Tal como se usa en el presente documento, “fragmento de anticuerpo” se refiere a una parte de un anticuerpo intacto que incluye el sitio de unión a antígeno o regiones variables de un anticuerpo intacto, en el que la parte puede estar libre de los dominios constantes de cadena pesada (por ejemplo, CH2, CH3, y CH4) de la región Fc del anticuerpo intacto. Alternativamente, pueden incluirse partes de los dominios constantes de cadena pesada (por ejemplo, CH2, CH3, y CH4) en el fragmento de anticuerpo. Ejemplos de fragmentos de anticuerpos son aquellos que conservan la unión a antígeno e incluyen fragmentos Fab, Fab, F(ab)₂, Fd y Fv; diacuerpos; triacuerpos; moléculas de anticuerpo de cadena sencilla (sc-Fv); minicuerpos, nanocuerpos, y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos. A modo de ejemplo, un fragmento Fab también contiene el dominio constante de una cadena ligera y el primer dominio constante (CH1) de una cadena pesada.

El término “variante” se refiere a una secuencia de aminoácidos que se diferencia de la secuencia de aminoácidos nativa de un anticuerpo en al menos una modificación o un residuo de aminoácido. Una secuencia de aminoácidos “nativa” o “original” o “silvestre” se refiere a la secuencia de aminoácidos de un anticuerpo encontrado en la naturaleza. Las variantes de la molécula de anticuerpo incluyen, pero no se limitan a, cambios dentro de una región variable o una región constante de una cadena ligera y/o una cadena pesada, incluyendo la región hipervariable o CDR, la región Fc, la región Fab, el dominio CH1, el dominio CH2, el dominio CH3, y la región bisagra.

El término “específico” se refiere a la unión selectiva de un anticuerpo a su epítipo diana. Pueden someterse a prueba moléculas de anticuerpo para determinar la especificidad de unión comparando la unión del anticuerpo al antígeno deseado con la unión del anticuerpo a un antígeno no relacionado o antígeno análogo o mezcla de antígenos en un conjunto de condiciones dado. Preferiblemente, un anticuerpo según la invención carecerá de unión significativa a antígenos no relacionados, o incluso análogos del antígeno diana. En este caso, el término “antígeno” se refiere a una molécula que se reconoce por, y a la que se une, una molécula de anticuerpo o resto inmunoderivado que se une al antígeno. La parte específica de un antígeno a la que se une un anticuerpo se denomina “epítipo”. Un “hapteno” se refiere a una molécula pequeña que, en la mayoría de las circunstancias, puede provocar una respuesta inmunitaria (es decir, actuar como antígeno) únicamente cuando está unida a una molécula transportadora, por ejemplo, una proteína, polietilenglicol (PEG), oro coloidal, perlas de sílica, y similares. El transportador puede ser uno que tampoco provoca una respuesta inmunitaria por sí mismo.

El término “anticuerpo” se usa en el sentido más amplio, y abarca anticuerpos monoclonales, policlonales, multiespecíficos (por ejemplo, biespecíficos, en los que cada brazo del anticuerpo es reactivo con un epítipo diferente o el mismo antígeno o antígeno diferente), minicuerpos, heteroconjugados, diacuerpos, triacuerpos, quiméricos y sintéticos, así como fragmentos de anticuerpos que se unen específicamente a un antígeno con una propiedad de unión y/o actividad biológica deseada.

El término “anticuerpo monoclonal” (AcM) se refiere a un anticuerpo, o una población de anticuerpos similares, obtenido a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, y no debe interpretarse como que requiere la producción del anticuerpo mediante ningún método particular. Por ejemplo, pueden prepararse anticuerpos monoclonales mediante el método del hibridoma descrito por primera vez por Kohler y Milstein [(1975), *Nature*, 256: 495-497], o mediante métodos de ADN recombinante.

El término “anticuerpo quimérico” (o “inmunoglobulina quimérica”) se refiere a una molécula que comprende una cadena pesada y/o ligera que es idéntica u homóloga a secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de una especie particular o que pertenecen a una clase o subclase de anticuerpo particular, mientras que el resto de la(s) cadena(s) es idéntico u homólogo a secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de otra especie o que pertenecen a otra clase o subclase de anticuerpo, así como fragmentos de tales anticuerpos, siempre que muestren la actividad biológica deseada. Cabilly *et al.* (1984), citado a continuación; Morrison *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 81:6851.

El término “anticuerpo humanizado” se refiere a formas de anticuerpos que contienen secuencias de anticuerpos no

humanos (por ejemplo, murinos) así como anticuerpos humanos. Un anticuerpo humanizado puede incluir sustituciones de aminoácido conservativas o residuos no naturales de la misma especie o de especies diferentes que no alteran significativamente su actividad de unión y/o biológica. Tales anticuerpos son anticuerpos quiméricos que contienen una secuencia mínima derivada de inmunoglobulinas no humanas. En su mayor parte, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las que se sustituyen residuos de una región determinante de complementariedad (CDR) del receptor por residuos de una CDR de una especie no humana (anticuerpo donador) tal como ratón, rata, camello, bovinos, cabra o conejo que tiene las propiedades deseadas. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender residuos que no se encuentran ni en el anticuerpo receptor ni en las secuencias de CDR o de región de marco importadas. Estas modificaciones se realizan para refinar adicionalmente y maximizar el rendimiento del anticuerpo. Por tanto, en general, un anticuerpo humanizado comprenderá todos de al menos un dominio variable, y en un aspecto dos dominios variables, en donde la totalidad o la totalidad de los bucles hipervariables corresponden a los de una inmunoglobulina no humana y la totalidad o sustancialmente la totalidad de las regiones FR son las de una secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado también comprenderá opcionalmente al menos una parte de una región constante (Fc) de inmunoglobulina, o la de una inmunoglobulina humana. Véase, por ejemplo, Cabilly *et al.*, patente estadounidense n.º 4.816.567; Cabilly *et al.*, patente europea n.º 0.125.023 B1; Boss *et al.*, patente estadounidense n.º 4.816.397; Boss *et al.*, patente europea n.º 0.120.694 B1; Neuberger, M. S. *et al.*, documento WO 86/01533; Neuberger, M. S. *et al.*, patente europea n.º 0.194.276 B1; Winter, patente estadounidense n.º 5.225.539; Winter, patente europea n.º 0.239.400 B1; Padlan, E. A. *et al.*, solicitud de patente europea n.º 0.519.596 A1; Queen *et al.* (1989) Proc. Natl Acad. Sci. USA, vol. 86:10029-10033).

El término “anticuerpo biespecífico” puede referirse a un anticuerpo, o un anticuerpo monoclonal, que tiene propiedades de unión para al menos dos epítopos diferentes. En una realización, los epítopos son del mismo antígeno. En otra realización, los epítopos son de dos antígenos diferentes. En la técnica se conocen métodos para preparar anticuerpos biespecíficos. Por ejemplo, pueden producirse anticuerpos biespecíficos de manera recombinante usando la coexpresión de dos pares de cadena pesada/cadena ligera de inmunoglobulina. Alternativamente, pueden prepararse anticuerpos biespecíficos usando unión química. Los anticuerpos biespecíficos incluyen fragmentos de anticuerpos biespecíficos.

El término “anticuerpo heteroconjugado” puede referirse a dos anticuerpos unidos de manera covalente. Tales anticuerpos pueden prepararse usando métodos conocidos en la química de síntesis de proteínas, incluyendo usar agentes de reticulación. Tal como se usa en el presente documento, el término “conjugado” se refiere a moléculas formadas por la unión covalente de uno o más fragmentos de anticuerpos o restos de unión a una o más moléculas poliméricas.

El término “biológicamente activo” se refiere a un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que puede unirse al epítipo deseado y de alguna manera ejercer un efecto biológico. Los efectos biológicos incluyen, pero no se limitan a, la modulación de una señal de crecimiento, la modulación de una señal antiapoptótica, la modulación de una señal apoptótica, la modulación de la cascada de función efectora, y la modulación de otras interacciones de ligandos.

El término “ADN recombinante” se refiere a ácidos nucleicos y productos génicos expresados a partir de los mismos que se han diseñado mediante ingeniería genética, creado o modificado por el ser humano. Los polipéptidos o las proteínas recombinantes son polipéptidos o proteínas producidos mediante técnicas de ADN recombinante, por ejemplo, a partir de células transformadas mediante un constructo de ADN exógeno que codifica para el polipéptido o la proteína deseados. Los polipéptidos o las proteínas sintéticos son aquellos preparados mediante síntesis química.

El término “casete de expresión” se refiere a una molécula de nucleótidos que puede afectar a la expresión de un gen estructural (es decir, una secuencia codificante de proteína, tal como un anticuerpo) en un huésped compatible con tales secuencias. Los casetes de expresión incluyen al menos un promotor unido operativamente a la secuencia codificante de polipéptido, y, opcionalmente, a otras secuencias, por ejemplo, señales de terminación de la transcripción. También pueden usarse elementos reguladores adicionales necesarios o útiles para realizar la expresión, por ejemplo, potenciadores. Por tanto, los casetes de expresión incluyen plásmidos, vectores de expresión, virus recombinantes, cualquier forma de vector de ADN desnudo recombinante, y similares.

50 1. Anticuerpo frente a S1P

Visentin *et al.* describen un anticuerpo monoclonal murino que se une a S1P con especificidad y afinidad extremadamente altas. Se mostró que este anticuerpo ralentiza la progresión tumoral y la angiogénesis asociada en varios modelos de animales de cáncer humano. Cancer Cell (2006) 9: 225-238.

55 Se ha derivado un anticuerpo monoclonal humanizado (LT1009) a partir del anticuerpo anti-S1P murino (LT1002). En comparación con el anticuerpo anti-S1P murino a partir del cual se deriva, la forma humanizada muestra una afinidad de unión a S1P en el intervalo picomolar, así como una eficacia *in vivo* y estabilidad superiores. La construcción, síntesis, purificación y pruebas de este anticuerpo se describen en las solicitudes de patente estadounidense con n.ºs de serie 60/854.971 y 11/924.890 [n.ºs de expediente del agente LPT-3010-PV y LPT-3010-UT, respectivamente; presentadas el 27 de octubre de 2006 y el 26 de octubre de 2007, respectivamente; cada una

titulada "Compositions and Methods for Binding Sphingosine-1-Phosphate"], que son de titularidad conjunta con la presente invención. Se entenderá que, en general, es preferible un anticuerpo monoclonal humanizado con respecto a un anticuerpo murino u otro anticuerpo no derivado de seres humanos para su administración a un sujeto humano.

2. Anticuerpo frente a LPA

- 5 Se ha desarrollado un anticuerpo monoclonal contra LPA. La construcción, síntesis, purificación y pruebas de este anticuerpo se describen en la solicitud de patente estadounidense con n.º de serie 11/755.721 (n.º de expediente del agente LPT-3100-UT4), que es de titularidad conjunta con la presente invención.

3. Métodos de preparación de anticuerpos y variantes y fragmentos de anticuerpos

10 Los anticuerpos y fragmentos de anticuerpos de la invención pueden producirse mediante cualquier método adecuado, por ejemplo, *in vivo* (en el caso de anticuerpos policlonales y monoespecíficos), en cultivo celular (tal como es normalmente el caso para anticuerpos monoclonales, en los que se cultivan células de hibridoma que expresan el anticuerpo deseado en condiciones apropiadas), en reacciones de traducción *in vitro*, y en sistemas de expresión de ADN recombinante (Johnson *et al.*, *Methods Enz.* 203:88-98, 1991). Pueden producirse anticuerpos y variantes y fragmentos de anticuerpos a partir de una variedad de células de animales, preferiblemente a partir de células de mamíferos, prefiriéndose particularmente células murinas y humanas. Pueden producirse anticuerpos que incluyen variantes de receptores de células T y anticuerpos que no se producen de manera natural que sólo conservan la capacidad de selección como diana del antígeno deseado conferida por un(os) sitio(s) de unión a antígeno de un anticuerpo mediante técnicas de cultivo celular y sistemas de expresión de ADN recombinante conocidos (véase, por ejemplo, Johnson *et al.*, *Methods in Enzymol.* 203:88-98, 1991; Molloy *et al.*, *Mol. Immunol.* 32:73-81, 1998; Schodin *et al.*, *J. Immunol. Methods* 200:69-77, 1997). Normalmente se usan sistemas de expresión de ADN recombinante en la producción de variantes o fragmentos de anticuerpos tales como, por ejemplo, anticuerpos biespecíficos y moléculas de sFv. Los sistemas de expresión de ADN recombinante preferidos incluyen aquellos que usan células huésped y constructos de expresión que se han diseñado mediante ingeniería genética para producir altos niveles de una proteína particular. Las células huésped y los constructos de expresión preferidos incluyen *Escherichia coli*; que alberga constructos de expresión derivados de plásmidos o virus (bacteriófagos); levadura tal como *Sacharomyces cerevisiae* o *Fichia pastora* que albergan constructos de expresión episomales o integrados de manera cromosómica; virus y células de insectos tales como células Sf9 y baculovirus; y células de mamíferos que albergan constructos de expresión episomales o integrados de manera cromosómica (por ejemplo, retrovirales) (para una revisión, véase Verma *et al.*, *J. Immunol. Methods* 216:165-181, 1998). También pueden producirse anticuerpos en plantas (patente estadounidense n.º 6.046.037; Ma *et al.*, *Science* 268:716-719, 1995) o mediante tecnología de presentación en fagos (Winter *et al.*, *Annu. Rev. Immunol.* 12:433-455, 1994).

35 Las cepas Xenomouse son ratones modificados por ingeniería genética en los que los loci de IgH e Igk murinos se han sustituido funcionalmente por sus homólogos de Ig en transgenes YAC artificiales de levadura. Estos transgenes de Ig humanos pueden portar la mayor parte del repertorio variable humano y pueden someterse a cambio de clase de isotipos IgM a IgG. El sistema inmunitario de Xenomouse reconoce antígenos humanos administrados como foráneos y produce una fuerte respuesta humoral. El uso de Xenomouse junto con técnicas de hibridoma bien establecidas da como resultado AcM de IgG completamente humana con afinidades subnanomolares por antígenos humanos. Véanse la patente estadounidense n.º 5.770.429, titulada "Transgenic non-human animals capable of producing heterologous antibodies"; la patente estadounidense n.º 6.162.963, titulada "Generation of Xenogenetic antibodies"; la patente estadounidense n.º 6.150.584, titulada "Human antibodies derived from immunized Xenomice"; la patente estadounidense n.º 6.114.598, titulada "Generation of xenogeneic antibodies"; y la patente estadounidense n.º 6.075.181, titulada "Human antibodies derived from immunized Xenomice"; para revisiones, véanse Green, (1999) *J. Immunol. Methods* 231:11-23; Wells, *Chem Biol* (2000) 7:R185-6; y Davis *et al.*, (1999) *Cancer Metastasis Rev*; 18:421-5).

B. Fragmentos de receptores y fragmentos de canales iónicos

50 Polipéptidos solubles derivados de receptores de lípidos bioactivos, normalmente hidrófobos, unidos a membrana, que conservan la capacidad de los receptores para unirse a lípidos, también pueden usarse para unirse a lípidos bioactivos y metabolitos de lípidos. Por ejemplo, en el caso de receptores Edg (S1P y LPA), en algunos casos, residuos de aminoácido particulares pueden estar implicados en la especificidad de unión a esfingolípido, es decir, los aminoácidos que determinan a qué esfingolípido se une un receptor específico. Parrill *et al.*, (2000) *J. Biol. Chem.* 275:39379-39384; Wang *et al.*, (2001) *J. Biol. Chem.* 276:49213-49220. Tal información puede usarse para proporcionar fragmentos de receptores solubles que comprenden residuos de receptor de interés, es decir, los tramos de aminoácidos que se unen al esfingolípido. Se han preparado fragmentos de receptores solubles derivados del receptor de TNFalfa soluble de manera natural y al menos uno de ellos, ENBREL (etanercept) está en desarrollo como agente terapéutico para artritis. Además, la modificación de tales residuos puede permitir al experto en la técnica ajustar a medida las especificidades de unión y/o la afinidad de fragmentos de receptores solubles.

55 Los fragmentos de receptores solubles de interés particular incluyen fragmentos de Edg-1, Edg-3, Edg-5, Edg-6 y Edg-8, todos los cuales se unen al esfingolípido indeseable, esfingosina-1-fosfato (S-1-P). Los receptores Edg-1, Edg-3, Edg-5 son de particular interés.

5 Pueden prepararse fragmentos de receptores solubles de diversas maneras incluyendo, pero sin limitarse a, digestión proteolítica de células o preparaciones de membrana celular que comprenden el receptor [Bartfeld *et al.*, (1979) *Biochem Biophys Res Commun.* 89:512-9; Borhani *et al.*, (1991) *J Mol. Biol.* 218:685-9], tecnologías de ADN recombinante [Marlovits *et al.*, (1998) *J Mol Recognit.* 11:49-51; Huang *et al.*, (1992) *J Mol Endocrinol.* 8:137-44], o mediante síntesis *in vitro* de oligopéptidos.

Otros agentes que pueden usarse para unirse a lípidos bioactivos y metabolitos de lípidos incluyen fragmentos de canales iónicos que llevan uno o más sitios de unión a S1P, por ejemplo, canales TRP. Los fragmentos de canales que conservan el/los sitio(s) de unión a S1P son agentes útiles para su uso en los métodos de la presente invención.

C. Ácidos nucleicos

10 Tradicionalmente, las técnicas para detectar y purificar moléculas diana han usado polipéptidos, tales como anticuerpos, que se unen específicamente a tales dianas. Aunque se sabe desde hace mucho tiempo que los ácidos nucleicos se unen específicamente a otros ácidos nucleicos (por ejemplo, los que tienen secuencias complementarias), se han dado a conocer aptámeros (es decir, ácidos nucleicos que se unen a moléculas diana no nucleicas). Véanse, por ejemplo, Blackwell *et al.*, *Science* (1990) 250:1104-1110; Blackwell *et al.*, *Science* (1990) 15 250:1149-1152; Tuerk *et al.*, *Science* (1990) 249:505-510; Joyce, (1989) *Gene* 82:83-87; y la patente estadounidense n.º 5.840.867 titulada "Aptamer analogs specific for biomolecules".

20 Según se aplica a aptámeros, el término "unión" excluye específicamente las interacciones de unión de tipo Watson-Crick (es decir, apareamiento de bases A:T y G:C) asociadas tradicionalmente con la doble hélice del ADN. El término "aptámero" se refiere por tanto a un ácido nucleico o un derivado de ácido nucleico que se une específicamente a una molécula diana, en el que la molécula diana o bien (i) no es un ácido nucleico, o bien (ii) es un ácido nucleico o elemento estructural del mismo que se une mediante mecanismos distintos de apareamiento de bases de tipo dúplex o tríplex. Una molécula de este tipo se denomina molécula no nucleica en el presente documento.

Estructuras de ácidos nucleicos

25 "Ácidos nucleicos", tal como se usa en el presente documento, se refiere a ácidos nucleicos que se aíslan de una fuente natural; se preparan *in vitro*, usando técnicas tales como amplificación por PCR o síntesis química; se preparan *in vivo*, por ejemplo, mediante tecnología de ADN recombinante; o mediante cualquier método apropiado. Los ácidos nucleicos pueden tener cualquier forma (lineal, circular, etc.) o topología (monocatenarios, binocatenarios, superenrollados, etc.). El término "ácidos nucleicos" también incluye sin limitación derivados de 30 ácidos nucleicos tales como ácidos nucleicos peptídicos (ANP) y conjugados de polipéptido-ácido nucleico; ácidos nucleicos que tienen al menos un residuo de azúcar, esqueleto, unión internucleotídica, base, nucleósido o análogo de nucleótido químicamente modificado; así como ácidos nucleicos que tienen extremos 5' y/o 3' químicamente modificados; y ácidos nucleicos que tienen dos o más de tales modificaciones. No es necesario que todas las uniones en un ácido nucleico sean idénticas.

35 Los ácidos nucleicos que son aptámeros se preparan con frecuencia, pero no necesariamente, como oligonucleótidos. Los oligonucleótidos incluyen sin limitación ARN, ADN y moléculas mixtas de ARN-ADN que tienen secuencias de longitudes que tienen longitudes mínimas de 2, 4, 6, 8, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 ó 25 nucleótidos, y longitudes máximas de aproximadamente 100, 75, 50, 40, 25, 20 ó 15 o más nucleótidos, independientemente. En general, es necesario un mínimo de 6 nucleótidos, preferiblemente 10 nucleótidos, más 40 preferiblemente de 14 a 20 nucleótidos, para realizar la unión específica.

En general, los oligonucleótidos pueden ser ADN o ARN monocatenario (mc) o bicatenario (bc), o conjugados (por ejemplo, moléculas de ARN que tienen abrazaderas de ADN en 5' y 3') o híbridos (por ejemplo, moléculas apareadas de ARN:ADN) o derivados (formas químicamente modificadas de los mismos). Sin embargo, se prefiere ADN monocatenario, ya que con frecuencia el ADN es menos lábil que el ARN. De manera similar, se prefieren 45 modificaciones químicas que potencian la especificidad o estabilidad de un aptámero.

Modificaciones químicas de ácidos nucleicos

Las modificaciones químicas que pueden incorporarse en aptámeros y otros ácidos nucleicos incluyen, sin limitación ni exclusividad, modificaciones de bases, modificaciones de azúcares y modificaciones de esqueleto.

50 Modificaciones de bases: Los residuos de base en aptámeros pueden ser distintos de las bases que se producen de manera natural (por ejemplo, A, G, C, T, U, 5MC, y similares). En la técnica se conocen derivados de purinas y pirimidinas; una lista a modo de ejemplo, pero no exhaustiva, incluye aziridinilcitosina, 4-acetilcitosina, 5-fluorouracilo, 5-bromouracilo, 5-carboximetilaminometil-2-tiouracilo, 5-carboximetilaminometiluracilo, inosina, N6-isopenteniladenina, 1-metiladenina, 1-metilpseudouracilo, 1-metilguanina, 1-metilinosina, 2,2-dimetilguanina, 2-metiladenina, 2-metilguanina, 3-metilcitosina, 5-metilcitosina (5MC), N6-metiladenina, 7-metilguanina, 5-metilaminometiluracilo, 5-metoxiaminometil-2-tiouracilo, beta-D-manosilqueosina, 5-metoxiuracilo, 2-metil-N-6-isopenteniladenina, éster metílico del ácido uracil-5-oxiacético, pseudouracilo, queosina, 2-tiocitosina, 5-metil-2-tiouracilo, 2-tiouracilo, 4-tiouracilo, 5-metiluracilo, ácido uracil-5-oxiacético y 2,6-diaminopurina. Además de ácidos

nucleicos que incorporan uno o más de tales derivados de bases, también pueden incluirse en aptámeros ácidos nucleicos que tienen residuos de nucleótido que carecen de una base de purina o pirimidina.

Modificaciones de azúcares: Los residuos de azúcar en aptámeros pueden ser distintos de los residuos de ribosa y desoxirribosa convencionales. A modo de ejemplo no limitativo, la sustitución en la posición 2' del residuo de furanosa potencia la estabilidad frente a nucleasas. Una lista a modo de ejemplo, pero no exhaustiva, de residuos de azúcar modificados incluye azúcares sustituidos en 2' tales como 2'-O-metil-, 2'-O-alkil-, 2'-O-alil-, 2'-S-alkil-, 2'-S-alil-, 2'-fluoro-, 2'-halo- o 2'-azido-ribosa, análogos de azúcares carbocíclicos, azúcares alfa-anoméricos, azúcares epiméricos tales como arabinosa, xilosas o lixosas, azúcares de piranosa, azúcares de furanosa, sedoheptulosas, análogos acíclicos y análogos de nucleósidos abásicos tales como metil-ribósido, etil-ribósido o propil-ribósido.

Modificaciones de esqueleto: Los esqueletos químicamente modificados incluyen, a modo de ejemplo no limitativo, fosforotioatos, fosforotioatos quirales, fosforoditioatos, fosfotriésteres, aminoalquilfosfotriésteres, metilfosfonatos y otros alquilfosfonatos incluyendo 3'-alquilen-fosfonatos y fosfonatos quirales, fosfinatos, fosforamidatos incluyendo 3'-amino-fosforamidato y aminoalquilfosforamidatos, tionofosforamidatos, tionoalquilfosfonatos, tionoalquilfosfotriésteres y boranofosfatos que tienen uniones 3'-5' normales, análogos con uniones 2'-5' de los mismos, y aquellos que tienen polaridad invertida en los que los pares adyacentes de unidades de nucleósidos están unidos con uniones 3'-5' a 5'-3' o 2'-5' a 5'-2'. Los esqueletos químicamente modificados que no contienen un átomo de fósforo tienen esqueletos que se forman mediante uniones internucleosídicas de alquilo o cicloalquilo de cadena corta, uniones internucleosídicas de alquilo o cicloalquilo y heteroátomos mixtos, o una o más uniones internucleosídicas heteroatómicas o heterocíclicas de cadena corta, incluyendo sin limitación uniones morfolino; esqueletos de siloxano; esqueletos de sulfuro, sulfóxido y sulfona; esqueletos de formacetoilo y tioformacetoilo; esqueletos de metilen-formacetoilo y tioformacetoilo; esqueletos de que contienen alqueno; esqueletos de sulfamato; esqueletos de metilenoimino y metilenoimidazino; esqueletos de sulfonato y sulfonamida; y esqueletos de amida.

Preparación e identificación de aptámeros

En general, las técnicas para identificar aptámeros implican incubar una molécula diana no nucleica previamente seleccionada con mezclas (de 2 a 50 miembros), combinaciones (de 50 a 5.000 miembros) o bibliotecas (50 o más miembros) de diferentes ácidos nucleicos que son posibles aptámeros en condiciones que permiten que se formen complejos de moléculas diana y aptámeros. Por "diferentes ácidos nucleicos" quiere decirse que la secuencia de nucleótidos de cada posible aptámero puede ser diferente de la de cualquier otro miembro, es decir, las secuencias de los posibles aptámeros son aleatorias unas con respecto a otras. Puede introducirse aleatoriedad de una variedad de maneras tales como, por ejemplo, mutagénesis, que puede llevarse a cabo *in vivo* exponiendo células que albergan un ácido nucleico a agentes mutagénicos, *in vitro* mediante tratamiento químico de un ácido nucleico, o *in vitro* mediante replicación bioquímica (por ejemplo, PCR) que se permite deliberadamente que avance en condiciones que reducen la fidelidad del proceso de replicación; síntesis química aleatorizada, es decir, sintetizando una pluralidad de ácidos nucleicos que tienen una secuencia previamente seleccionada que, con respecto a al menos una posición en la secuencia, es aleatoria. Por "aleatorio en una posición en una secuencia previamente seleccionada" quiere decirse que una posición en una secuencia que se sintetiza normalmente, por ejemplo, para que sea lo más próxima posible al 100% de A (por ejemplo, 5'-C-T-T-A-G-T-3') se permite que se sintetice aleatoriamente en esa posición (5'-C-T-T-N-G-T-3', en la que N indica una posición aleatorizada en la que, por ejemplo, la reacción de síntesis contiene el 25% de cada uno de A, T, C y G; o el x% de A, el w% de T, el y% de C y el z% de G, en la que $x+w+y+z=100$). En fases posteriores del procedimiento, las secuencias están cada vez menos aleatorizadas y pueden aparecer secuencias consenso; en cualquier caso, se prefiere obtener en última instancia un aptámero que tenga una secuencia de nucleótidos única.

Se preparan, identifican, caracterizan y/o purifican aptámeros y combinaciones de aptámeros mediante cualquier técnica apropiada, incluyendo aquellas que usan síntesis *in vitro*, técnicas de ADN recombinante, amplificación por PCR, y similares. Tras su formación, entonces se separan complejos de diana:aptámero de los miembros no complejados de la mezcla de ácidos nucleicos, y los ácidos nucleicos que pueden prepararse a partir de los complejos son aptámeros candidatos (en fases iniciales de la técnica, los aptámeros son generalmente una población de una multitud de secuencias de nucleótidos que tienen grados variables de especificidad por la diana). Entonces se sustituye el aptámero de partida (biblioteca o combinación) por el aptámero resultante (mezcla o combinación) en iteraciones repetidas de esta serie de etapas. Cuando se obtiene un número limitado (por ejemplo, una combinación o mezcla, preferiblemente una mezcla con menos de 10 miembros, lo más preferiblemente 1) de ácidos nucleicos que tienen especificidad satisfactoria, se secuencia y se caracteriza el aptámero. Se generan preparaciones puras de un aptámero dado mediante cualquier técnica apropiada (por ejemplo, amplificación por PCR, síntesis química *in vitro*, y similares).

Por ejemplo, Tuerk y Gold [Science (1990) 249:505-510] dan a conocer el uso de un procedimiento denominado evolución sistemática de ligandos mediante enriquecimiento exponencial (SELEX). En este método, se someten combinaciones de moléculas de ácido nucleico que están aleatorizadas en posiciones específicas a selección para determinar la unión a una proteína de unión a ácido nucleico (véanse, por ejemplo, la publicación internacional PCT n.º WO 91/19813 y la patente estadounidense n.º 5.270.163). Se secuencian los oligonucleótidos así obtenidos y se caracterizan de otro modo. Kinzler *et al.* usaron una técnica similar para identificar moléculas de ADN bicatenario sintéticas a las que se unen específicamente polipéptidos de unión a ADN. Nucleic Acids Res. (1989) 17:3645-3653.

Ellington *et al.* dan a conocer la producción de un gran número de moléculas de ARN de secuencia aleatoria y la selección e identificación de las que se unen específicamente a colorantes específicos tales como azul de Cibacron. Nature (1990) 346: 818-822.

5 Otra técnica para identificar ácidos nucleicos que se unen a moléculas diana no nucleicas es la técnica combinatoria de oligonucleótidos dada a conocer por Ecker, D. J. *et al.* [Nuc. Acids Res. 21, 1853 (1993)] conocida como desaleatorización sintética de fragmentos aleatorizados (SURF), que se basa en la síntesis y el examen repetitivos de conjuntos cada vez más simplificados de bibliotecas, combinaciones y mezclas de análogos de oligonucleótidos [Tuerk, C. y Gold, L. Science 249, 505 (1990)]. La biblioteca de partida consiste en análogos de oligonucleótidos de longitud definida, conteniendo una posición en cada combinación un análogo conocido y conteniendo las posiciones restantes mezclas equimolares de todos los demás análogos. Con cada tanda de síntesis y selección, se determina la identidad de al menos una posición del oligómero hasta que se descubren las secuencias de aptámeros de ligando de ácido nucleico optimizados.

15 Una vez que se ha identificado un aptámero candidato particular mediante SURF, SELEX o cualquier otra técnica, puede determinarse su secuencia de nucleótidos (tal como se conoce en la técnica), y puede examinarse su estructura molecular tridimensional mediante resonancia magnética nuclear (RMN). Estas técnicas se explican en relación con la determinación de la estructura tridimensional de un ligando de ácido nucleico que se une a una trombina en Padmanabhan, K. *et al.*, J. Biol. Chem. 24, 17651 (1993); Wang, K. Y. *et al.*, Biochemistry 32, 1899 (1993); y Macaya, R. F. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 3745 (1993). Pueden volverse a sintetizar aptámeros seleccionados usando una o más bases, azúcares o uniones de esqueleto modificados. Los aptámeros consisten esencialmente en la secuencia de ácido nucleico mínima necesaria para conferir especificidad de unión, pero pueden extenderse en el extremo 5', el extremo 3', o ambos, o pueden derivatizarse o conjugarse de otro modo.

D. Moléculas pequeñas

25 El término "molécula pequeña" incluye cualquier resto químico u otro, distinto de polipéptidos y ácidos nucleicos, que puede actuar para afectar a procesos biológicos. Las moléculas pequeñas pueden incluir una gran variedad de agentes terapéuticos actualmente conocidos y usados, o pueden ser moléculas pequeñas sintetizadas en una biblioteca de tales moléculas con el fin de seleccionar función/funciones biológica(s). Las moléculas pequeñas se distinguen de las macromoléculas por el tamaño. Las moléculas pequeñas de esta invención tienen habitualmente un peso molecular de menos de aproximadamente 5.000 Dalton (Da), preferiblemente menos de aproximadamente 2.500 Da, más preferiblemente menos de 1.000 Da, lo más preferiblemente menos de aproximadamente 500 Da.

30 Las moléculas pequeñas incluyen sin limitación compuestos orgánicos, peptidomiméticos y conjugados de los mismos. Tal como se usa en el presente documento, el término "compuesto orgánico" se refiere a cualquier compuesto basado en carbono distinto de macromoléculas tales como ácidos nucleicos y polipéptidos. Además de carbono, los compuestos orgánicos pueden contener calcio, cloro, flúor, cobre, hidrógeno, hierro, potasio, nitrógeno, oxígeno, azufre y otros elementos. Un compuesto orgánico puede estar en forma aromática o alifática. Los ejemplos no limitativos de compuestos orgánicos incluyen acetonas, alcoholes, anilinas, hidratos de carbono, monosacáridos, oligosacáridos, polisacáridos, aminoácidos, nucleósidos, nucleótidos, lípidos, retinoides, esteroides, proteoglicanos, cetonas, aldehídos, grasas, aceites y ceras saturados, insaturados y poliinsaturados, alquenos, ésteres, éteres, tioles, sulfuros, compuestos cíclicos, compuestos heterocíclicos, imidazoles y fenoles. Un compuesto orgánico tal como se usa en el presente documento también incluye compuestos orgánicos nitrados y compuestos orgánicos halogenados (por ejemplo, clorados). A continuación se describen métodos para preparar peptidomiméticos. Colecciones de moléculas pequeñas, y moléculas pequeñas identificadas según la invención, se caracterizan mediante técnicas tales como espectrometría de masas con aceleradores (EMA; véase Turteltaub *et al.*, (2000) Curr Pharm Des 6:991-1007, y Enjalbal *et al.*, (2000) Mass Spectrom Rev 19:139-61).

45 Las moléculas pequeñas preferidas son relativamente más fáciles y menos caras de fabricar, formular o preparar de otro modo. Las moléculas pequeñas preferidas son estables en una variedad de condiciones de almacenamiento. Las moléculas pequeñas preferidas pueden ponerse en estrecha asociación con macromoléculas para formar moléculas que son biológicamente activas y que tienen propiedades farmacéuticas mejoradas. Las propiedades farmacéuticas mejoradas incluyen cambios en el tiempo de circulación, distribución, metabolismo, modificación, excreción, secreción, eliminación y estabilidad que son favorables para la actividad biológica deseada. Las propiedades farmacéuticas mejoradas incluyen cambios en las características toxicológicas y de eficacia de la entidad química.

E. Peptidomiméticos

55 En general, un "mimético de polipéptido" ("peptidomimético") es una molécula que imita la actividad biológica de un polipéptido, pero que no es de naturaleza química peptídica. Aunque, en determinadas realizaciones, un peptidomimético es una molécula que no contiene enlaces peptídicos (es decir, enlaces amida entre aminoácidos), el término peptidomimético puede incluir moléculas que no tienen carácter completamente peptídico, tales como pseudopéptidos, semipéptidos y peptoides. A continuación se describen ejemplos de algunos peptidomiméticos mediante la definición más amplia (por ejemplo, en los que parte de un polipéptido se sustituye por una estructura que carece de enlaces peptídicos). Tanto si tienen carácter completa o parcialmente no peptídico, los

peptidomiméticos según esta invención pueden proporcionar una disposición espacial de restos químicos reactivos que se asemeja estrechamente a la disposición tridimensional de grupos activos en un polipéptido. Como resultado de esta geometría de sitios activos similar, el peptidomimético puede mostrar efectos biológicos que son similares a la actividad biológica de un polipéptido.

- 5 Hay varias posibles ventajas por usar un mimético de un polipéptido dado en vez del propio polipéptido. Por ejemplo, los polipéptidos pueden mostrar dos atributos indeseables, es decir, escasa biodisponibilidad y corta duración de acción. Los peptidomiméticos son con frecuencia lo suficientemente pequeños tanto como para ser activos por vía oral como para tener una larga duración de acción. También hay problemas asociados con la estabilidad, el almacenamiento y la inmunorreactividad para polipéptidos que pueden evitarse con peptidomiméticos.
- 10 Pueden usarse polipéptidos candidatos, líder y otros que tienen una actividad biológica deseada en el desarrollo de peptidomiméticos con actividades biológicas similares. Se conocen técnicas de desarrollo de peptidomiméticos a partir de polipéptidos. Pueden sustituirse enlaces peptídicos por enlaces no peptídicos que permiten que el peptidomimético adopte una estructura, y por tanto actividad biológica, similar a la del polipéptido original. También pueden realizarse modificaciones adicionales sustituyendo grupos químicos de los aminoácidos por otros grupos
- 15 químicos de estructura, forma o reactividad similar. El desarrollo de peptidomiméticos puede verse ayudado por la determinación de la estructura terciaria del polipéptido original, o bien libre o bien unido a un ligando, mediante espectroscopía de RMN, cristalografía y/o modelado molecular asistido por ordenador. Estas técnicas ayudan en el desarrollo de composiciones novedosas de mayor potencia y/o mayor biodisponibilidad y/o mayor estabilidad que el polipéptido original. Dean (1994), *BioEssays*, 16: 683-687; Cohen y Shatzmiller (1993), *J Mol Graph*, 11: 166-173;
- 20 Wiley y Rich (1993), *Med Res Rev*, 13: 327-384; Moore (1994), *Trends Pharmacol Sci*, 15: 124-129; Hruby (1993), *Biopolymers*, 33: 1073-1082; Bugg *et al.* (1993), *Sci Am*, 269: 92-98, todos incorporados en el presente documento como referencia.

Se dan a conocer ejemplos específicos de peptidomiméticos en la patente estadounidense 7.169.390 que es de titularidad conjunta con la presente solicitud. Estos ejemplos son ilustrativos y no limitativos en cuanto a las otras modificaciones o modificaciones adicionales.

F. Polipéptidos y derivados de polipéptidos

Se dan a conocer ejemplos de polipéptidos y derivados de los mismos en la patente estadounidense 7.169.390 que es de titularidad conjunta con la presente solicitud. Estos ejemplos son ilustrativos y no limitativos en cuanto a las otras modificaciones o modificaciones adicionales.

30 II. Aplicaciones

La invención se refiere a usos médicos para tratar o prevenir enfermedades y estados autoinmunitarios, usando uno o más agentes terapéuticos que alteran la actividad o concentración de uno o más lípidos bioactivos, o precursores o metabolitos de los mismos. Los métodos terapéuticos y las composiciones de la invención actúan cambiando la

35 “concentración eficaz”, es decir, la concentración y/o actividades absolutas, relativas, eficaces y/o disponibles, de lípidos bioactivos. Puede decirse que la reducción de la concentración eficaz de un lípido bioactivo neutraliza el lípido diana o sus efectos indeseados, incluyendo efectos posteriores.

Sin desear limitarse por ninguna teoría particular, se cree que lípidos de señalización bioactivos, incluyendo S1P y/o LPA, y/o sus metabolitos o efectores posteriores, pueden provocar o contribuir al desarrollo de diversas enfermedades y trastornos caracterizados por una respuesta inmunitaria aberrante, no deseada o excesiva. Como

40 tales, las composiciones y los métodos pueden usarse para tratar estas enfermedades y trastornos relacionados con el sistema inmunitario, particularmente disminuyendo la concentración *in vivo* eficaz de un lípido diana particular, por ejemplo, S1P o LPA. En particular, se cree que las composiciones y los métodos de la invención son útiles en el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias, que por definición se caracterizan, al menos en parte, por una respuesta inmunitaria aberrante, excesiva o no deseada. En este caso, “no deseada” se refiere a una respuesta inmunitaria que es indeseada debido a su implicación en un proceso patológico, por ejemplo, una respuesta autoinmunitaria, o a una respuesta inmunitaria por lo demás normal que contribuye a la enfermedad cuando está presente en exceso, como en el caso de rechazo de trasplante o enfermedades caracterizadas por infiltración de linfocitos inapropiada.

A continuación se describen ejemplos de varias clases de enfermedades relacionadas con la respuesta inmunitaria que pueden tratarse según la invención. Se apreciará que muchas enfermedades y estados se caracterizan, al menos en parte, por múltiples procesos patológicos y que las clasificaciones proporcionadas en el presente documento son por conveniencia descriptiva y no limitan la invención.

A. Reducción de la concentración eficaz de lípidos bioactivos para el tratamiento de esclerosis múltiple

Tal como se comentó anteriormente en el presente documento, se ha mostrado que el análogo de esfingosina FTY720 es eficaz en la reducción de recidivas y lesiones del SNC en pacientes con esclerosis múltiple, un trastorno autoinmunitario. Dado que FTY es un antagonista de receptor de S1P, y por tanto bloquea la señalización de S1P, se cree que agentes que se unen a lípidos de señalización bioactivos, tales como los lisolípidos S1P y LPA, y

reducen su concentración eficaz, también demostrarán eficacia en el tratamiento de EM y otras enfermedades y estados autoinmunitarios. Esto puede demostrarse usando modelos de animales, incluyendo el modelo de encefalomiелitis autoinmunitaria experimental (EAE) aguda, que se usa ampliamente como EM de modelo de animales convencional. En el modelo de EAE de rata, FTY proporcionó una protección casi completa contra la aparición de la enfermedad EAE, y estuvo acompañado por una reducción en la infiltración de células T en la médula espinal. Normalmente en EAE, linfocitos T específicos de proteína básica de mielina atacan el tejido mielinizado en el SNC. También estaban ausentes lesiones inflamatorias en el SNC en animales tratados con FTY, pero estaban presentes en animales control. Fujino *et al.*, (2003) *Pharm and Exp Therap.* 305:70-77.

B. Reducción de la concentración eficaz de lípidos bioactivos para el tratamiento de artritis

La artritis reumatoide (AR) es una enfermedad autoinmunitaria que provoca dolor e incapacidad debido a inflamación y degradación de las articulaciones. En dos modelos de animales de artritis reumatoide, se comparó FTY con los compuestos antiartríticos mizoribina y prednisolona en modelos de rata de artritis inducida por adyuvante (AA) y artritis inducida por colágeno (AIC). La eficacia de FTY720 a algunas dosis fue casi igual o mayor en comparación con mizoribina y prednisolona en los modelos tanto de AA como de AIC. FTY, pero no los demás compuestos, disminuyó significativamente los niveles de linfocitos circulantes en animales tratados. FTY también demostró ausencia de efectos secundarios anómalos, conduciendo a los autores a concluir que tiene un mayor margen de seguridad superior al de los otros dos compuestos, ambos de los cuales demostraron efectos adversos. Matsuura, M. *et al.*, (2000), *Int. J. Immunopharmacol.*, 22:323-331. Dado que FTY es un antagonista de receptor de S1P, y por tanto bloquea la señalización de S1P, se cree que agentes que se unen a lípidos de señalización bioactivos, tales como los lisolípidos S1P y LPA, y reducen su concentración eficaz, también demostrarán eficacia en el tratamiento de AR y otras enfermedades y estados autoinmunitarios.

C. Reducción de la concentración eficaz de lípidos bioactivos para el tratamiento de diabetes

La diabetes tipo I es un trastorno autoinmunitario en el que el sistema inmunitario daña y/o destruye las células beta en los islotes de Langerhans del páncreas, eliminando la producción de insulina. Basándose en la eficacia de FTY720 en otros estados autoinmunitarios y en la prevención del rechazo de aloinjerto, se examinó el efecto de este compuesto sobre el desarrollo de diabetes autoinmunitaria en ratones diabéticos no obesos (NOD). Se administró FTY a los animales por vía oral comenzando a las 4 semanas de edad. Las dosis de FTY diarias previnieron el desarrollo de diabetes en casi todos los ratones tratados, mientras que la mayoría de los ratones NOD no tratados se volvieron diabéticos a las 35 semanas de edad. La retirada de FTY a las 35 semanas de edad condujo al desarrollo de diabetes en el plazo de 2 semanas en cinco ratones, mientras que los ratones restantes mantuvieron estados libres de diabetes durante hasta 44 semanas de edad. No se observó ningún efecto secundario del fármaco en la totalidad del periodo de tratamiento. FTY720 también previno la diabetes inducida por ciclofosfamida en ratones NOD. Esto condujo a los autores a concluir que FTY es un tratamiento seguro y eficaz y que puede ser útil para el tratamiento a largo plazo de individuos prediabéticos. Maki T. *et al.* (2002) *Transplantation*, 74:1684-6. También se ha mostrado que el tratamiento con FTY720 oral continuo en ratones NOD claramente diabéticos conduce a una completa reversión de la diabetes. Maki, T. *et al.*, (2005) *Transplantation*, 79:1051-5. Dado que FTY es un antagonista de receptor de S1P, y por tanto bloquea la señalización de S1P, se cree que agentes que se unen a lípidos de señalización bioactivos, tales como los lisolípidos S1P y LPA, y reducen su concentración eficaz, también demostrarán eficacia en el tratamiento de diabetes tipo 1 y otras enfermedades y estados autoinmunitarios.

D. Reducción de la concentración eficaz de lípidos bioactivos para el tratamiento de esclerodermia

La esclerodermia es una enfermedad autoinmunitaria que provoca cicatrización patológica o engrosamiento de la piel, y algunas veces afecta a otras zonas del organismo, incluyendo los pulmones, el corazón y/o los riñones. La esclerodermia se caracteriza por la formación de tejido cicatricial (fibrosis) en la piel y órganos del cuerpo, que puede conducir al engrosamiento y la dureza de las zonas afectadas, con la consiguiente reducción en la función. En la actualidad, aproximadamente 300.000 estadounidenses tienen esclerodermia, según la Fundación de la Esclerodermia. Una tercera parte o menos de los afectados tienen enfermedad generalizada, mientras que los dos tercios restantes tienen principalmente síntomas en la piel. Cuando la enfermedad afecta a los pulmones y provoca cicatrización patológica, la respiración puede verse limitada debido a que los pulmones ya no pueden expandirse como deberían. Para medir la capacidad respiratoria, los médicos usan un dispositivo que evalúa la capacidad vital forzada (CVF). En personas con una CVF de menos del 50 por ciento de la lectura esperada, la tasa de mortalidad a los 10 años debido a enfermedad pulmonar relacionada con esclerodermia es de aproximadamente el 42 por ciento. Un motivo por el que la tasa de mortalidad es tan alta es que actualmente no se dispone de ningún tratamiento eficaz.

Tal como se describe en los ejemplos de esta solicitud, las evidencias existentes indican que S1P y LPA son factores de crecimiento profibróticos que pueden contribuir a la activación de fibroblastos, proliferación, y el resultante aumento de la actividad de fibroblastos asociada con cicatrización patológica y remodelado inadaptados. Además, se han demostrado posibles papeles para S1P y LPA en la actividad de fibroblastos de la piel y otros tipos de fibroblastos. Por ejemplo, se ha mostrado que LPA estimula la migración de fibroblastos de piel murinos [Hama, *et al.*, (2004) *J Biol Chem* 279:17634-9], y fibroblastos de piel humanos expresan varios subtipos de receptor de S1P [Zhang, *et al.*, (1999) *Blood* 93:2984-90]. Además de los muchos efectos directos de S1P sobre la actividad de

fibroblastos, S1P también puede tener muchos posibles efectos indirectos sobre la actividad de fibroblastos. Por ejemplo, S1P puede facilitar la acción de otros factores profibróticos bien conocidos, tales como TGF- β y factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF). TGF- β es uno de los agentes contribuyentes a la fibrosis más ampliamente estudiados y reconocidos. Desmouliere, *et al.*, (1993) *J Cell Biol* 122: 103-111. TGF- β regula por incremento la expresión y actividad de SphK1 conduciendo a un aumento de la expresión de inhibidores tisulares de metaloproteinasas 1 (TIMP-1), una proteína que inhibe la degradación de la MEC. Yamanaka, *et al.*, (2004) *J Biol Chem* 279: 53994-54001. El aumento de la expresión de TIMP-1 está asociado con fibrosis intersticial y disfunción diastólica en pacientes con insuficiencia cardíaca. Heymans, *et al.*, (2005) *Am J Pathol* 166: 15-25. A la inversa, S1P estimula la expresión y liberación de TGF- β , Norata, *et al.*, (2005) *Circulation* 111: 2805-2811. También hay una clara evidencia de interferencia entre S1P y PDGF. S1P estimula directamente la expresión de PDGF. Usui, *et al.*, (2004) *J Biol Chem* 279: 12300-12311. Además, el receptor S1P1 y el receptor de PDGF se unen entre sí y su asociación es necesaria para la activación de PDGF de señalización posterior que contribuye a la proliferación y migración de diversos tipos de células. Long, *et al.*, (2004) *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 80: 74-80; Baudhuin *et al.*, (2004) *Faseb J* 18: 341-343. Como tales, los efectos de TGF- β y PDGF sobre la fibrosis pueden deberse en parte a la interferencia con la ruta de señalización de S1P. Como tales, las composiciones y los métodos de la invención pueden usarse para tratar esclerodermia, particularmente disminuyendo la concentración *in vivo* eficaz de un lípido diana particular, por ejemplo, S1P y/o LPA.

Se piensa que la esclerodermia sistémica se empeora por autoanticuerpos estimulantes contra receptores de PDGF [Baroni, *et al.*, (2006) *N Engl J Med.* 354:2667-76], y los receptores de PDGF se regulan por incremento en fibroblastos con esclerodermia en respuesta a TGF- β . Yamakage, *et al.*, (1992) *J Exp Med.* 175:1227-34. Debido a la interferencia sustancial entre los sistemas de señalización de S1P, PDGF y TGF- β , el bloqueo de la bioactividad de S1P con un agente anti-S1P (por ejemplo, un AcM anti-S1P) puede mitigar indirectamente los efectos proescleróticos de PDGF y TGF- β . Además, el tratamiento con un agente anti-S1P de este tipo puede beneficiar a pacientes con esclerodermia mitigando los efectos directos de S1P, incluyendo fibrosis, en fibroblastos de la piel y otras formas de fibroblastos que contribuyen a la progresión de la enfermedad. Por tanto se cree que agentes que se unen a lípidos de señalización bioactivos, tales como los lisolípidos S1P y LPA, y reducen su concentración eficaz, también demostrarán eficacia en el tratamiento de esclerodermia y otras enfermedades y estados autoinmunitarios, particularmente aquellos con una componente fibrótica. Esto proporciona a estos agentes una clara ventaja con respecto a agentes terapéuticos que modulan o bien la fibrosis o bien una respuesta inmunitaria sola. La "cicatrización patológica inflamatoria" es un nombre dado a una combinación de inflamación y fibrosis, originalmente en el contexto de la nefropatía crónica. Para comentarios, véase Peters *et al.*, (2004), *Kidney Intl.* 66: 1434-1443. Se cree que agentes que disminuyen la concentración eficaz de lípidos de señalización bioactivos, serán particularmente eficaces en estados caracterizados tanto por una componente de cicatrización patológica como por una autoinmunitaria y/o inflamatoria.

E. Reducción de la concentración eficaz de lípidos bioactivos para la prevención y el tratamiento de rechazo de aloinjerto

En modelos de animales de trasplantes de córnea, ratones tratados con FTY720 mostraron una prolongación significativa de supervivencia de injerto de córnea ortotópico cuando se administró por vía oral. Zhang *et al.* (2003), *Transplantation*, vol. 76: 1511-3. El tratamiento oral con FTY también retrasó significativamente el rechazo y disminuyó su intensidad en un modelo de rata a ratón de xenotrasplante de córnea. Sedlakova *et al.* (2005), *Transplantation*, vol. 79, 297-303. Dada la patogenia conocida del rechazo de aloinjerto en combinación con estos datos que sugieren que la modulación de los efectos de la señalización de S1P puede mejorar la supervivencia del injerto, se cree que agentes que se unen a, y de ese modo disminuyen la concentración eficaz de, lípidos bioactivos también serán útiles en el tratamiento de rechazo de aloinjerto, enfermedad de injerto contra huésped y otros estados caracterizados por una respuesta inmunitaria aberrante, indeseada o excesiva.

Se ha mostrado que FTY720 previene el rechazo de injerto y facilita la aceptación de injerto a largo plazo en modelos de animales (rata, perro) de aloinjertos de corazón, intestino delgado, riñón e hígado. En un ensayo clínico con seres humanos de FTY en pacientes con trasplante renal estable, FTY se toleró bien y provocó la linfopenia reversible esperada. Budde, K. *et al.*, (2002) *J. Am. Soc. Nephrol.* 13:1073-1083. En un ensayo clínico de fase 2a inicial para evaluar la eficacia y seguridad de FTY en trasplante renal *de novo*, en combinación con micofenolato de mofetilo (MMF), se encontró que FTY era tan eficaz como MMF en combinación con ciclosporina para la prevención de rechazo agudo tras trasplante renal, y se toleraba bien. Tedesco-Silva H., *et al.*, (2005) *Transplantation*, 79:1553-60.

Dado que FTY es un antagonista de receptor de S1P, y por tanto bloquea la señalización de S1P, se cree que agentes que se unen a lípidos de señalización bioactivos, tales como los lisolípidos S1P y LPA, y reducen su concentración eficaz, también demostrarán eficacia en el tratamiento de rechazo de aloinjerto, enfermedad de injerto contra huésped y otros estados caracterizados, al menos en parte, por una respuesta inmunitaria aberrante, excesiva o no deseada.

F. Reducción de la concentración eficaz de lípidos bioactivos para la prevención y el tratamiento de glomerulonefritis

Las enfermedades inmunitarias del glomérulo, tales como glomerulonefritis, están entre las principales causas de

nefropatía en fase terminal. Estas enfermedades comparten un curso progresivo caracterizado por fibrosis e inflamación del compartimento tubulointersticial. La “cicatrización patológica inflamatoria” es un nombre dado a una combinación de inflamación y fibrosis, originalmente en el contexto de la nefropatía crónica. Para comentarios, véase Peters *et al.*, (2004), *Kidney Intl.* 66: 1434-1443. Se cree que agentes que disminuyen la concentración eficaz de lípidos de señalización bioactivos, serán particularmente eficaces en estados caracterizados tanto por una componente de cicatrización patológica como por una autoinmunitaria y/o inflamatoria.

En un modelo de rata de glomerulonefritis, el tratamiento con FTY720 redujo los recuentos de linfocitos circulantes así como la infiltración renal de linfocitos. El curso de progresión de la enfermedad se ralentizó significativamente. Peters, *et al.*, citado anteriormente. Dado que FTY es un antagonista de receptor de S1P, y por tanto bloquea la señalización de S1P, se cree que agentes que se unen a lípidos de señalización bioactivos, tales como los lisolípidos S1P y LPA, y reducen su concentración eficaz, también demostrarán eficacia en el tratamiento de glomerulonefritis, otras nefropatías basadas en el sistema inmunitario y otros estados caracterizados, al menos en parte, por una respuesta inmunitaria aberrante, excesiva o no deseada.

III. MÉTODOS DE ADMINISTRACIÓN

El tratamiento de enfermedades y estados tales como los ejemplos facilitados anteriormente puede administrarse mediante diversas vías empleando diferentes formulaciones y dispositivos. En la técnica se conocen diluyentes, portadores y excipientes farmacéuticamente aceptables adecuados.

Un experto en la técnica apreciará que las cantidades que van a administrarse para cualquier protocolo de tratamiento particular pueden determinarse fácilmente. Puede esperarse que cantidades adecuadas se encuentren dentro del intervalo de 10 µg/dosis a 10 g/dosis, preferiblemente dentro de 10 mg/dosis a 1 g/dosis.

Pueden administrarse principios activos mediante técnicas conocidas en la técnica, incluyendo, pero sin limitarse a, administración sistémica, subcutánea, intradérmica, mucosa, incluyendo por inhalación, y tópica. La mucosa se refiere al tejido epitelial que reviste las cavidades internas del organismo. Por ejemplo, la mucosa comprende el tubo digestivo, incluyendo la boca, el esófago, el estómago, los intestinos y el ano; las vías respiratorias, incluyendo las fosas nasales, la tráquea, los bronquios y pulmones; y los genitales. Para el fin de esta memoria descriptiva, la mucosa también incluirá la superficie externa del ojo, es decir la córnea y la conjuntiva. La administración local (en oposición a la administración sistémica) puede ser ventajosa porque este enfoque puede limitar los posibles efectos secundarios sistémicos, pero todavía permitir efecto terapéutico.

Las composiciones farmacéuticas usadas en la presente invención incluyen, pero no se limitan a, disoluciones, emulsiones y formulaciones que contienen liposomas. Estas composiciones pueden generarse a partir de una variedad de componentes que incluyen, pero no se limitan a, líquidos previamente formados, sólidos autoemulsionantes y semisólidos autoemulsionantes.

Las formulaciones farmacéuticas usadas en la presente invención pueden prepararse según técnicas convencionales bien conocidas en la industria farmacéutica. Tales técnicas incluyen la etapa de poner en asociación los principios activos con el/los portador(s) o excipiente(s) farmacéutico(s). Los portadores preferidos incluyen aquellos que son farmacéuticamente aceptables, particularmente cuando la composición está prevista para uso terapéutico en seres humanos. Para aplicaciones terapéuticas no en seres humanos (por ejemplo, en el tratamiento de mascotas, ganado, peces o aves de corral), pueden emplearse portadores aceptables desde el punto de vista veterinario. En general, las formulaciones se preparan poniendo en asociación de manera uniforme e íntima los principios activos con portadores líquidos o portadores sólidos finamente divididos o ambos, y después, si es necesario, conformando el producto.

Las composiciones de la presente invención pueden formularse en cualquiera de muchas formas de dosificación posibles tales como, pero sin limitarse a, comprimidos, cápsulas, jarabes líquidos, geles blandos, supositorios y enemas. Las composiciones de la presente invención también pueden formularse como suspensiones en medios acuosos, no acuosos o mixtos. Las suspensiones acuosas pueden contener además sustancias que aumentan la viscosidad de la suspensión incluyendo, por ejemplo, carboximetilcelulosa sódica, sorbitol y/o dextrano. La suspensión también puede contener estabilizadores.

En una realización, las composiciones farmacéuticas pueden formularse y usarse como espumas. Las espumas farmacéuticas incluyen formulaciones tales como, pero sin limitarse a, emulsiones, microemulsiones, cremas, gelatinas y liposomas.

Aunque son de naturaleza básicamente similar, estas formulaciones varían en cuanto a los componentes y la consistencia del producto final. Los expertos en las técnicas farmacéuticas y de formulación conocen generalmente el saber hacer en cuanto a la preparación de tales composiciones y formulaciones y puede aplicarse a la formulación de las composiciones de la presente invención.

También pueden añadirse diversos excipientes al anticuerpo formulado para mejorar el rendimiento de la terapia, hacer que la terapia sea más conveniente o garantizar claramente que el anticuerpo formulado se usa únicamente para su fin previsto y aprobado. Los ejemplos de excipientes incluyen compuestos químicos para controlar el pH,

agentes antimicrobianos, conservantes para impedir la pérdida de potencia del anticuerpo, colorantes, por ejemplo, para identificar la formulación únicamente para la vía de administración particular, agentes solubilizantes para aumentar la concentración del anticuerpo en la formulación, potenciadores de la penetración y el uso de agentes para ajustar la isotonicidad y/o viscosidad. Pueden añadirse inhibidores, por ejemplo, de proteasas para prolongar la semivida del anticuerpo.

El anticuerpo también puede modificarse químicamente para proporcionar un profármaco que se administra en una de las formulaciones o los dispositivos descritos anteriormente. Entonces se libera la forma activa del anticuerpo mediante la acción de una enzima endógena. Posibles enzimas oculares que deben considerarse en esta aplicación son los diversos citocromos p450, aldehído reductasas, cetona reductasas, esterases o N-acetil-β-glucosamidasa. Otras modificaciones químicas del anticuerpo pueden aumentar su peso molecular, y como resultado, aumentar el tiempo de residencia del anticuerpo en el ojo. Un ejemplo de una modificación química de este tipo es la pegilación [Harris y Chess (2003), *Nat Rev Drug Discov*; 2: 214-21], un procedimiento que puede ser general o específico para un grupo funcional tal como disulfuro [Shaunak *et al.* (2006), *Nat Chem Biol*; 2:312-3] o un tiol [Doherty *et al.* (2005), *Bioconj Chem*; 16: 1291-8].

15 Ejemplos

La invención se describirá adicionalmente mediante referencia a los siguientes ejemplos detallados. Estos ejemplos no deben considerarse de ninguna manera limitativos del alcance de la invención.

Ejemplo 1: Efecto de agentes que disminuyen la concentración eficaz de lípidos bioactivos sobre linfopenia

Tal como se resume en las tablas 1 y 2, se realizó un estudio de toxicología de 28 días con el anticuerpo murino monoclonal LT1002 (SPHINGOMAB) a dosis de 0, 30, 75 y 200 mg/kg. Tal como se muestra en las tablas de datos 1-7 a continuación, hubo una disminución relacionada con la dosis de linfocitos a todos los niveles de dosis y de basófilos a la dosis más alta. Esta disminución se reflejó en un aumento en el % de neutrófilos, el % de monocitos y el % de reticulocitos y una disminución paralela en el % de linfocitos. Esta disminución en los neutrófilos circulantes es comparable al efecto observado con FTY720, un análogo de esfingosina de molécula pequeña, que es un fármaco inmunosupresor novedoso que actúa alterando el tráfico de linfocitos, dando como resultado linfopenia de sangre periférica.

Tabla 1 – Diseño de estudio de toxicología general de 28 días

Estudio de toxicología general de 28 días	
Artículo de prueba	LT1002
Especie	Ratón C57Bl
Número de animales	10/sexo/grupo
Dosis	0, 30, 75 y 200 mg/kg
Vía de administración	Bolo i.v. mediante inyección en la vena de la cola*
Duración	28 administraciones diarias consecutivas
BPL	Sí
Criterios de valoración del estudio	Observaciones clínicas, pesos corporales y de órganos, consumo de alimentos, autopsia de 48 tejidos, frotis de médula ósea, bioquímicas clínicas, hematología, paneles de coagulación y análisis de formulación de dosis
* Dosificación i.p., en lugar de dosificación i.v., iniciada en el día 14 debido a daño en la vena de la cola tras múltiples inyecciones i.v. del artículo de prueba	

Tabla 2- Resumen de hallazgos

Parámetro	Grupo de dosis	Efecto	Significación (valor de p)
WBC	30	Reducido	0,007
	75	Reducido	0,043
	200	Reducido	0,013
HGB	30	Reducido	0,037
VCM	200	Aumentado	0,040
Linf.	30	Reducido	0,001
	75	Reducido	0,003
	200	Reducido	0,002
BASO	30	Reducido	0,047
NEUT (%)	30	Aumentado	0,004
	75	Aumentado	0,001
	200	Aumentado	0,000
LINF (%)	30	Reducido	0,001
	75	Reducido	0,000

	200	Reducido	0,000
MONO (%)	30	Aumentado	0,010
	75	Aumentado	0,000
	200	Aumentado	0,000
RETIC (%)	75	Aumentado	0,042
GLOB	30	Aumentado	0,027
	75	Aumentado	0,007
	200	Aumentado	0,000
Razón A/G	30	Reducido	0,012
	75	Reducido	0,007
	200	Reducido	0,000
Ca	75	Aumentado	0,045
	200	Aumentado	0,000
Bazo (% de peso corporal)	200	Reducido	0,020

Ejemplo 2: Estudio de toxicología de 28 días en ratones con el anticuerpo monoclonal anti-S1P – efecto sobre el bazo

Se realizó un estudio de 28 días de LT1002 en ratones por LAB Preclínica (estudio 1005-2615), en el que se evaluaron cuarenta órganos y el sitio de la inyección (cola) para determinar la patología macroscópica en todos los animales control y de nivel de dosis alto (grupo 4; 200 mg/kg/día). LT1002 es la versión murina de LT 1009, el anticuerpo monoclonal anti-S1P de Lpath.

Los órganos evaluados incluyeron glándulas suprarrenales, aorta (torácica), cerebro (corteza cerebral, mesencéfalo, cerebelo y médula), ciego, colon, epidídimos, esófago, ojos, fémur con médula, vesícula biliar, corazón, riñones, hígado (2 lóbulos), pulmones con bronquios, ganglios linfáticos (mandibulares y mesentéricos), glándulas mamarias (inguinales), nervios ópticos, ovarios, páncreas, hipófisis, próstata, recto, glándulas salivares (mandibulares), nervio ciático, vesículas seminales, músculo esquelético (muslo), piel/hipodermis (inguinal), intestino delgado (duodeno, íleon y yeyuno), médula espinal (cervical, lumbar y torácica), bazo, esternón con médula, estómago, testículos, timo, tiroides con paratiroides, lengua, tráquea, vejiga urinaria, útero (trompas, cuerpo y cuello uterino) y vagina.

Los siguientes cambios histopatológicos preliminares los observó el patólogo de LAB para animales del grupo 4 (200 mg/kg/día). “Se observó una disminución del tamaño de leve a moderada de la zona marginal folicular de la pulpa blanca esplénica en 6/10 ratones macho y 5/10 hembra del grupo 4. Aunque este hallazgo no sugirió toxicidad linfocitaria esplénica, no puede excluirse como cambio relacionado con LT1002. La disminución del tamaño de la zona marginal folicular esplénica se caracterizó por un estrechamiento variable del manto linfocitario (es decir, la zona marginal), que recubre los folículos linfocitarios de la pulpa blanca.

Un aumento de leve a marcado de la hematopoyesis extramedular de la pulpa roja esplénica en 3/10 ratones macho y 5/10 hembra del grupo 4 y un aumento leve de la hematopoyesis extramedular de la pulpa roja esplénica en un macho y una hembra del grupo 3 (75 mg/kg/día) (los únicos bazos examinados en ratones del grupo 3) se consideraron posiblemente relacionados con LT1002, pero no con significación toxicológica”.

Está realizándose el examen histopatológico de todos los ratones del grupo 2 (30 mg/kg/día) y el grupo 3 (75 mg/kg/día), y una evaluación histopatológica completa de todos los ratones en fase preterminal. LAB no notifica ningún otro hallazgo de la evaluación histopatológica de tejidos de animales del grupo 4 (200 mg/kg/día). Según el protocolo, no se estudió ningún tejido de animales en otros grupos de dosis además de animales tratados con 200 mg/kg/día y con solución salina excepto por el tejido en animales que mostraron anomalías macroscópicas (es decir, irritación local en el sitio de la inyección).

FTY720, un superagonista/antagonista funcional de molécula pequeña de al menos uno, o más, de los receptores GPCR para S1P, está en desarrollo clínico final para el tratamiento de esclerosis múltiple remitente, recidivante. Se piensa que FTY720 actúa en animales y en el ser humano alterando patrones de migración dirigida/tráfico de linfocitos. FTY también proporciona protección en modelos de animales de cáncer humano. Los efectos a largo plazo de FTY720 incluyen linfopenia sistémica y disminución de las respuestas de células T tras 2 semanas de administración oral de 1 mg/kg/día a ratones hembra normales C57BL o C3H: disminuyeron todos de linfocitos en sangre periférica, ganglios linfáticos periféricos, ganglios linfáticos mesentéricos, placas de Peyer y bazo. Los efectos a largo plazo de FTY720 en ratones también incluyen una reducción en los pesos del bazo en un 65% tras 2 semanas de administración oral de 1 mg/kg/día a ratones hembra normales C57BL o C3H.

En el presente estudio, la disminución de pesos del bazo observada en el estudio de LAB 1005-2615 en animales tratados con LT1002 200 mg/kg/día concuerda con el mismo hallazgo notificado con la administración diaria de FTY720. Dado que FTY720 y LT1002 afectan al mismo conjunto de receptores celulares, aunque mediante mecanismos diferentes, y dado que los dos compuestos presentan perfiles farmacológicos solapantes, la reducción en los pesos del bazo y la morfología del bazo en el presente estudio con LT1002 no era inesperada.

Ejemplo 3: Efecto de agentes que disminuyen la concentración eficaz de lípidos bioactivos sobre el tráfico de linfocitos

5 Se cree que el inhibidor de señalización de S1P, FTY720, actúa de manera inmunosupresora alterando patrones de migración dirigida/tráfico de linfocitos y aceleración de la migración dirigida de linfocitos. Chiba *et al.*, (1998) J. Immunol. 160: 5037. También se examina el efecto del anticuerpo anti-S1P sobre el tráfico de linfocitos, esencialmente tal como en métodos publicados. Schwab *et al.*, (2005) Science 309: 1735 - 1739.

10 Se tratan ratones con el anticuerpo monoclonal frente a S1P murino o un anticuerpo monoclonal de control de isotipo coincidente. Los tratamientos consisten en inyección intravenosa del anticuerpo diluido en 200-300 μ l de solución salina normal. Se sacrifican animales en diversos momentos tras la administración del anticuerpo. Se realizan recuentos de linfocitos en ganglios linfáticos, bazo, timo, sangre y linfa. La inhibición mediante anticuerpo de S1P provoca una disminución en los linfocitos circulantes (es decir, linfopenia) y se espera un aumento correspondiente en linfocitos en órganos linfoides, de manera similar a lo observado tras el tratamiento con FTY.

Ejemplo 4: Eficacia de agentes que disminuyen la concentración eficaz de lípidos bioactivos en un estudio de exposición inmunitaria

15 Ensayos de CTL de liberación de 51 Cr

Se realizan ensayos de linfocitos citotóxicos (CTL) *ex vivo* primarios usando células MC-57 marcadas con 51 Cr incubadas en presencia o ausencia del péptido inmunodominante como dianas, tal como se describe en Murali-Krishna, K., *et al.*, (1998) Immunity 8(2): 177-87. Se determinan los resultados aplicando la siguiente ecuación y multiplicando por el 100%:

$$\frac{(\text{Lisis experimental} - \text{Lisis espontánea})}{\text{Lisis máxima} - \text{Lisis espontánea}}$$

20

$$\text{Lisis experimental} - \text{Lisis espontánea}$$

Tinción intracelular de citocinas (ICCS)

25 Se incuban esplenocitos (4×10^6) durante 12 h en 250 μ l de RPMI-1640 que contiene FBS al 10% y Golgi Stop (Pharmingen, San Diego, CA.) en presencia de 2 μ g/ml del péptido de epítipo de células T CD8+ restringido para H-2^p inmunodominante. Se incuban controles negativos sin péptido. Tras la estimulación, se tiñen las células para CD8 e IFN- γ intracelular según especifica el fabricante (Pharmingen). Tras la tinción, se analizan las células mediante citometría de flujo usando un dispositivo FACScan o FACSCalibur y se analizan los datos para determinar la expresión de CD8 e IFN- γ usando el software CellQuest™ (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, CA). Se calcula el porcentaje de activación específica de péptido de células T CD8+ dividiendo el número de células T CD8+ que expresan IFN- γ entre el número total de células T CD8+. Como control positivo para la inducción de células T para producir IFN- γ , se incubó un número equivalente de esplenocitos de animales control no sometidos previamente a tratamiento durante 6 h en presencia de 12-miristato-13-acetato de forbol 20 ng/ml (PMA, Calbiochem, La Jolla, CA.) e ionomicina 3 μ M (Calbiochem) antes de la tinción.

30

Ejemplo 5: Eficacia de agentes que disminuyen la concentración eficaz de lípidos bioactivos en un modelo murino de encefalomiелitis alérgica experimental (EAE) de esclerosis múltiple:

35 EAE es una enfermedad autoinmunitaria experimental del sistema nervioso central (SNC) (Zamvil *et al.*, (1990) Ann. Rev. Immunol., 8:579) y es un modelo de enfermedad para el estado autoinmunitario humano, esclerosis múltiple (EM) [Alvord *et al.*, Experimental Allergic Model for Multiple Sclerosis, NY 511 (1984)]. Se induce fácilmente en especies de mamíferos [por ejemplo, los ratones SJL/J son una cepa propensa de ratones (H-2^S)] mediante inmunizaciones de proteína básica de mielina purificada a partir del SNC (por ejemplo, una emulsión de columna

40 vetebreal de bobinos o de cobaya) o un proteolípido encefalitogénico (PLP) o un fragmento peptídico de glicoproteína oligodendrocítica de mielina (MOG₃₅₋₅₅). La encefalomiелitis alérgica experimental (EAE) en ratones, inducida mediante inyección de materia blanca, es un modelo útil de inflamación del SNC, y se ha usado en el estudio de esclerosis múltiple (Spahn *et al.* 1999; véanse también más de 40 artículos sobre diversos modelos de ratón de EAE de Howard Weiner).

45 Los animales con EAE desarrollan una enfermedad parálitica aguda y puede identificarse un infiltrado celular agudo dentro del SNC. Por tanto, además de servir como modelo convencional para EM, este modelo también se ha usado para determinar la infiltración de células T en el SNC. Los linfocitos T se encuentran con poca frecuencia en el SNC normal, pero durante EM, encefalomiелitis inducida por VIH u otros estados inflamatorios del SNC, estas células están presentes. Los síntomas observados incluyen debilidad muscular, parálisis y falta de coordinación.

50 Protocolo experimental – los siguientes experimentos se realizaron en el laboratorio del Dr. Howard Weiner en colaboración con Lpath, Inc.

Se usa un fragmento peptídico de glicoproteína oligodendrocítica de mielina (MOG₃₅₋₅₅; MEVGWYRSPFSRVVHLYRNGK) para provocar EAE experimental en ratones. Mendel, I. *et al.*, A myelin oligodendrocyte glycoprotein peptide induces typical chronic experimental autoimmune encephalomyelitis in H-2b mice: fine specificity and T cell receptor V beta expression of encephalitogenic T cells, *Eur J Immunol.* julio de 1995; 25(7):1951-9. Se indujo EAE en ratones mediante inmunización con un péptido correspondiente a los aminoácidos 35-55 del péptido de glicoproteína oligodendrocítica de mielina (MOG) (MOG₃₅₋₅₅) para inducir encefalomiélitis autoinmunitaria experimental (EAE) crónica. Tras la inmunización con MOG₃₅₋₅₅, los ratones desarrollan un episodio agudo de EAE que va seguido por una enfermedad progresiva de desarrollo gradual que se piensa que modeliza varias características de la esclerosis múltiple progresiva. Se trataron los ratones con el anticuerpo frente a S1P y se realizó un seguimiento de los ratones tratados para estudiar los efectos del anticuerpo específico para S1P sobre las manifestaciones clínicas de este modelo agudo de EAE. Al final del experimento, también se usaron los ratones tratados para analizar el efecto de la administración del anticuerpo anti-S1P sobre la respuesta inmunitaria.

En una primera serie de experimentos, usando 10 ratones por grupo con un peso promedio de 20 g, se indujo EAE en ratones C57BL/6J con MOG₃₅₋₅₅ 150 ug/ratón en CFA junto con toxina pertussis 150 pg/ratón en los días 0 y 2. Se administró por vía i.v. el anticuerpo anti-S1P, LT1002 (Sphingomab™) a una dosificación de 75 mg/kg en el día -1, seguido por dosificación i.p. a 25 mg/kg cada 2 días. Se realizó un seguimiento de los ratones tratados durante 25 días para estudiar los efectos de anticuerpos específicos para S1P sobre las manifestaciones clínicas de este modelo agudo de EAE. Las manifestaciones clínicas de la enfermedad incluyen cola flácida y parálisis de las extremidades que pueden puntuarse para dar una evaluación objetiva de los síntomas clínicos. La evaluación convencional de la intensidad de la enfermedad en el modelo de EAE mide el comportamiento clínico en una escala de 0-6: 0) normal; 1) cola flácida; 2) marcha anómala, debilidad en las patas traseras; 3) parálisis parcial, ataxia intensa; 4) movimiento mínimo de las patas traseras tras estímulo doloroso; 5) sin movimiento de las patas traseras; 6) estado moribundo con poco o nada de movimiento. Se compararon las medias entre grupos para determinar el efecto del tratamiento sobre las puntuaciones clínicas y el aumento de peso corporal. Se resolvió la significación estadística de puntuaciones clínicas y el peso usando análisis bioestadístico.

En el día 17, se sacrificaron dos ratones representativos para estudiar la respuesta inmunitaria celular (proliferación y citocinas) y para analizar la patología del SNC. Se disecaron y seccionaron médulas espinales. Se tiñeron las secciones con hematoxilina y eosina (H&E) para revelar células inflamatorias, con Luxol para visualizar la mielina, o con tinción de plata para visualizar los axones. Se evaluaron los niveles totales de células T_{reg} CD4+FoxP3+ mediante análisis de FACS de muestras de sangre extraídas de la cola en el día 17. En el día 25, se analizaron los ratones tratados para ver el efecto de la administración del anticuerpo anti-S1P sobre la respuesta inmunitaria.

Se encontró que la administración del anticuerpo anti-S1P (LT1002; Sphingomab™) conducía a una inhibición significativa del desarrollo de EAE ($p < 0,001$). Esto puede considerarse una disminución de los síntomas de EAE, puntuados tal como se describió anteriormente, lo cual se muestra en la figura 1. Tras el tratamiento con el anticuerpo, las puntuaciones de EAE se estabilizaron a aproximadamente 2 (marcha anómala, debilidad en las patas traseras) en la escala de intensidad de la enfermedad, mientras que los animales control no tratados tenían una puntuación de intensidad de EAE de aproximadamente 3 (parálisis parcial, ataxia intensa). Este efecto clínico se confirma histológicamente, con una disminución cuantificable en la desmielinización (menos del 1% de desmielinización en animales tratados con el anticuerpo frente al 9% de desmielinización en controles no tratados con EAE, una disminución de aproximadamente el 92% tras el tratamiento), disminución en la pérdida de axones (menos del 2% de pérdida de axones en ratones tratados con el anticuerpo frente al 18% de pérdida de axones en animales control no tratados con EAE, una disminución de aproximadamente el 91% tras el tratamiento) y disminución de aproximadamente el 85% en el número de células inflamatorias/mm² en médulas espinales de animales tratados con el anticuerpo en comparación con controles no tratados con EAE.

Además, la administración del anticuerpo anti-S1P condujo a una disminución en el número de linfocitos circulantes y células T CD4+ del bazo. Los linfocitos circulantes representaron en total aproximadamente el 10% en animales tratados con el anticuerpo, y aproximadamente el 13,5% en animales control con EAE. Esta disminución fue significativa y representa una disminución de aproximadamente el 26% en los linfocitos circulantes tras el tratamiento con el anticuerpo. Las células T CD4+ del bazo representaron en total aproximadamente el 7,6% de los linfocitos en el bazo en animales tratados con el anticuerpo, en comparación con aproximadamente el 11,7% de los linfocitos en animales control. Esta disminución también fue significativa y representa una disminución de aproximadamente el 35% tras el tratamiento con el anticuerpo.

Una clase de células T especializadas que inhiben la proliferación y activación de células T efectoras se conoce como células T supresoras o reguladoras (células T_{reg}). Una clase principal de células T_{reg} son las células T CD4+CD25+ que desempeñan un papel en el mantenimiento de la autotolerancia. La depleción de células T_{reg} CD4+CD25+ en ratones da como resultado la aparición de enfermedades autoinmunitarias sistémicas, y en tales condiciones, aumentó la intensidad de la EAE murina; por tanto se cree que el deterioro de células T_{reg} puede contribuir a la enfermedad. Kumar *et al.*, (2006) *J. Neuroimm.* 178:184; Sakaguchi *et al.* (1985) y Stephens *et al.*, (2005), ambos citados en Kumar *et al.* Kumar *et al.* también encontraron una reducción o pérdida de actividad supresora de células T_{reg} en pacientes con EM.

Las células T_{reg} CD4+CD25+ expresan el gen de factor de transcripción *Foxp3* a niveles relativamente altos. CD25+

y Fox P3+ juntos son marcadores específicos de células T_{reg}. Se encontró que la administración del anticuerpo anti-S1P a ratones con EAE estaba asociada con un aumento significativo en las células T_{reg} CD4+CD25+Foxp3+ en el bazo y un aumento similar pero estadísticamente no significativo en las células T_{reg} CD4+CD25+Foxp3+ circulantes. Estos resultados indican un aumento en las células T_{reg} tras el tratamiento con el anticuerpo.

- 5 La inyección de péptido MOG sintético (aminoácidos 35-55 de glicoproteína oligodendrocítica de mielina, denominada MOG₃₅₋₅₅) provoca que los ratones desarrollen respuestas de células T específicas significativas además de síntomas neurológicos. Spahn *et al.*, (1999) Eur. J. Immunol 29:4060-4071. La administración del anticuerpo anti-S1P se asoció con una disminución significativa en esta respuesta de memoria proliferativa frente a MOG₃₅₋₅₅. Se sensibilizaron ratones mediante inyecciones de péptido MOG. Se extirparon los bazos y se
10 homogeneizaron, y se sometieron a pulsos los esplenocitos con diferentes cantidades de péptido MOG. Posteriormente, se sometieron a pulsos las células con radiomarcador y se incubaron antes de recoger las células y se evaluó la incorporación de marcador mediante recuento de centelleo. Se encontró que la sensibilización de células T frente a MOG se reducía tras el tratamiento con el anticuerpo frente a S1P. Tal como se midió en cpm, la respuesta proliferativa de memoria disminuyó en aproximadamente un 36%, 38% y 22% tras el tratamiento con el
15 anticuerpo anti-S1P (a 4 ug/ml, 20 ug/ml y 100 ug/ml de MOG₃₅₋₅₅, respectivamente). Este bloqueo de la proliferación de linfocitos mediante el anticuerpo frente a S1P sugiere que el anticuerpo puede bloquear la respuesta autoinmunitaria frente a MOG en estos ratones.

Los esplenocitos de ratones tratados con el anticuerpo anti-S1P secretaron niveles inferiores de IL-17 e IFN γ y niveles superiores de IL-10 tras la estimulación con MOG₃₅₋₅₅. Usando métodos esencialmente tal como en Spahn *et al.* (1999) Eur. J. Immunol. 29:4060-4071, se aumentó la citocina protectora IL-10 mediante tratamiento con el anticuerpo, en comparación con esplenocitos de control de animales no tratados, mientras que se disminuyeron las citocinas perjudiciales.

Por tanto, se ha mostrado que el tratamiento con el anticuerpo frente a S1P disminuye los síntomas de EAE, un modelo de animal bien aceptado de EM. Se disminuyen la parálisis y la debilidad, y esto está respaldado por hallazgos histológicos que muestran neurodegeneración, desmielinización e inflamación en el SNC. La administración del anticuerpo anti-S1P también condujo a una disminución significativa en el número de células T CD4+ del bazo y linfocitos circulantes, lo que indica el efecto de este anticuerpo sobre el tráfico de linfocitos. También se asoció la administración del anticuerpo anti-S1P con un aumento significativo en las células T reguladoras. Por tanto, el anticuerpo anti-S1P actúa a través de varios mecanismos, todos los cuales se cree que son útiles en la reducción de indicadores de la enfermedad en este modelo de EM.

También se espera que el anticuerpo anti-S1P (LT1002; Sphingomab™) sea eficaz en el modelo de intervención SJL/PLP (recidivante-remitente) de EM. Se induce EAE en ratones SJL/J (10 ratones/grupo) mediante inmunización con un péptido correspondiente a la región de aa 139-151 de la proteína proteolipídica (PLP139-151). Véase Webb *et al.* (2004) J. Neuroimmunol. 153:108-121. Tras la inmunización con PLP139-151, los ratones SJL/J desarrollan una enfermedad que se piensa que modeliza varias características de la esclerosis múltiple. Se administra tratamiento con el anticuerpo tras aparecer los síntomas neurológicos. Se usarán las mismas dosis del anticuerpo anti-S1P (LT1002) que en el experimento anterior: 75 mg/kg en el día 17 por vía i.v. (pico de enfermedad) seguido por una dosis de 25 mg/kg cada dos días.

Ejemplo 6: Eficacia de agentes que disminuyen la concentración eficaz de lípidos bioactivos en un modelo de artritis inducida por colágeno (AIC) de artritis reumatoide:

La artritis inducida por colágeno (AIC) es un modelo de animal para la enfermedad autoinmunitaria humana artritis reumatoide (AR). Trenthorn *et al.*, (1977) J. Exp. Med., 146:857. Esta enfermedad puede inducirse en muchas especies mediante la administración de colágeno tipo II heterólogo [Courtenay *et al.*, (1980) Nature, 283:665; Cathcart *et al.*, (1986) Lab. Invest., 54:26], y es un modelo aceptado para el estudio de la enfermedad.

45 La artritis inducida por colágeno (AIC) en el ratón se induce mediante inmunización de cepas de ratones propensos con colágeno tipo II nativo. Se produce artritis macroscópicamente evidente entre los días 28-35 tras la inmunización y persiste durante varios meses hasta que las articulaciones se anquilosan. La AIC comparte varias características histopatológicas con la AR incluyendo infiltración de células mononucleares e hiperplasia de células sinoviales con destrucción de hueso y cartilago. Tanto en AR como en AIC, la propensión a la enfermedad está limitada por alelos de clase II del CMH y las células T autorreactivas son prominentes en la articulación. Debido a estas similitudes, la AIC es un modelo experimental ampliamente usado para AR. Normalmente, se induce AIC en el día 1 en ratones macho de 6-7 semanas de edad mediante inyección intradérmica en la base de la cola de colágeno II (CII) bovino o de pollo suplementado con *M. tuberculosis* 2,0 mg/ml emulsionado en adyuvante completo de Freund (CFA). En el día 21, los ratones reciben una inyección intradérmica en la base de la cola de CII en adyuvante incompleto de Freund. Se evalúa la intensidad clínica de la enfermedad cada 4 días. Se puntúa la inflamación en cada pata en una escala de 0-4: 0, normal; 1, eritema y leve hinchazón confinada al tobillo, o tarsos, o dedos individuales; 2, eritema moderado e hinchazón de tarsos y tobillo; 3, eritema intenso e hinchazón leve de tobillo, tarsos y dedos; 4, eritema intenso e hinchazón intensa de tobillo, tarsos y dedos. Se obtienen puntuaciones diarias totales para cada ratón sumando las puntuaciones de las cuatro patas. En el día 60, se sacrifican los ratones y se pesan las patas delanteras. Para la histología, se fijan las patas con formalina al 10%, se descalcifican en Decal (Fisher), se
60

incrustan en parafina y se tiñen secciones de 5 µm con hematoxilina/eosina.

La artritis inducida por colágeno y la artritis inducida por adyuvante (AA) son modelos de animales ampliamente usados para la evaluación de nuevos fármacos antiartríticos. El desarrollo de la enfermedad de estos modelos también se acepta para homólogos dependientes de células T de artritis reumatoide en seres humanos. Por ejemplo, el anticuerpo anti-CD4 suprime el desarrollo de la enfermedad de AA y AIC, lo que indica que las células T positivas para CD4+ desempeñan un papel importante en la inducción de AA y AIC.

Otro modelo de ratón aceptado para artritis es el modelo de transgén de TNF. Ratones transgénicos que expresan un transgén de TNF- α humano modificado desarrollan de manera espontánea una poliartritis crónica proporcionando evidencias adicionales de la implicación directa de TNF en la patogenia de AR en seres humanos. Ratones que portan un transgén de TNF humano con una región en 3' modificada de un gen de globina humano muestran una expresión de TNF humano desregulada que da como resultado una expresión de bajo nivel de TNF en las articulaciones y una variedad de otros órganos. En cambio, ratones que portan un transgén de TNF humano silvestre mostraron expresión de TNF regulada de manera apropiada. Ratones con expresión de TNF desregulada desarrollaron una poliartritis simétrica crónica con características histológicas similares a la AR de seres humanos. Este proceso no requiere un contexto genético específico en los ratones diana. Otros modelos de animales bien aceptados para AR se revisan en Kannan, K. *et al.*, (2005), *Pathophysiology* 12:167-181.

Se evalúa la eficacia del anticuerpo monoclonal anti-S1P en el modelo de animal de AIC de artritis reumatoide. Se adquieren ratones DBA1/J macho de 6-8 semanas de edad de Jackson Laboratory (Bar Harbor, Maine). Se alimentan con comida para ratones con alto contenido en grasa (comida para ratones 5015 de Purina) y se les facilita agua desionizada a voluntad.

Se aleatorizan los animales a grupos de tratamiento (10 ratones/grupo) basándose en el peso corporal. Los animales reciben vehículo (solución salina), anticuerpo monoclonal anti-S1P o control positivo (dexametasona) comenzando en el día 21. La dosificación es por v.o. excepto para la dexametasona que se administra por vía s.c. Se usan tres grupos de dosis (baja, media y alta) de anticuerpo. Se someten a prueba todos los artículos de prueba para determinar la presencia de endotoxina dado que la contaminación de LPS puede tener un efecto estimulante sobre la progresión de la enfermedad y puede interferir en la evaluación de la eficacia del fármaco. Se miden puntuaciones de intensidad/volumenes de pata tres veces por semana comenzando en el día 21 y continuando hasta el día 42.

Para inducir la artritis, se administra colágeno tipo II de pollo en adyuvante completo de Freund (CFA) (mezclado a 1:1) a todos los animales por vía intradérmica en la cola en el día 1 y se administra un refuerzo con colágeno tipo II en adyuvante incompleto de Freund (IFA) en el día 21. Comenzando en el día 21 y continuando hasta el día 42, se miden la puntuación de intensidad clínica y los volúmenes de pata en las dos patas traseras tres veces por semana. Se mide el grosor de la pata usando un calibre calibrado. Se monitorizan los pesos corporales semanalmente. Se monitorizan observaciones generales al lado de la jaula al menos una vez al día. En la autopsia, se recogen ambas patas traseras y se conservan en formalina tamponada al 10%. Se someten las patas traseras recogidas en la autopsia a microrradiografía usando una máquina de Faxitron.

Se descalcifica la pata/el tobillo en ácido fórmico hasta que se vuelve radiotraslúcido. Se preparan secciones de cuatro micrómetros y se tiñen con Safranin O y fosfatasa ácida resistente a tartrato. Se evalúan cualitativamente las secciones de histología para determinar su grado de inflamación, daño de cartílago articular, resorción y destrucción ósea, y cambios de tejido sinovial.

Ejemplo 7: Eficacia de agentes que disminuyen la concentración eficaz de lípidos bioactivos en un modelo de ratón de diabetes tipo 1

Se ha mostrado que el tratamiento de ratones diabéticos no obesos (NOD) con FTY720 previene la aparición de diabetes. El tratamiento con FTY720 oral continuo en ratones NOD claramente diabéticos también da como resultado la reversión de la diabetes. Véase Maki *et al.*, citado anteriormente. Se cree que agentes, tales como el anticuerpo monoclonal anti-S1P, que disminuyen la concentración eficaz de lípidos bioactivos, tendrán un efecto similar sobre la diabetes. Esto se someterá a prueba en modelos de ratón NOD convencionales usando métodos convencionales.

Ejemplo 8: Eficacia de agentes que disminuyen la concentración eficaz de lípidos bioactivos en un modelo de esclerodermia murina

La esclerodermia, una enfermedad del tejido conjuntivo adquirida debilitante, se caracteriza por fibrosis, particularmente de la piel y los pulmones. Se ha desarrollado un modelo de enfermedad de injerto contra huésped esclerodérmica murina (EICH escl) para esclerodermia, para el estudio de mecanismos inmunológicos básicos que impulsan enfermedades fibrosantes y la propia EICH. Este modelo reproduce importantes características de esclerodermia incluyendo engrosamiento de la piel, fibrosis pulmonar y regulación por incremento de ARNm de colágeno cutáneo, lo cual está precedido por infiltración de monocitos y la regulación por incremento de ARNm de TGF-1 cutáneo. McCormick, L.L. (1999) *J. Immunol.* 163: 5693-5699. En resumen, se irradian de manera mortal ratones receptores y después se les inyecta suspensión de células de médula ósea y bazo de donante alogénico. El

engrosamiento esclerodérmico de la piel puede detectarse en el día 21 tras el TMO mediante análisis de imágenes de secciones histopatológicas de rutina. Otros modelos de animales para esclerodermia se comentan en una revisión de Varga: Lakos G, Takagawa S, Varga J. (2004) *Methods Mol Med*.102:377-93.

- 5 Se administran el anticuerpo anti-S1P u otros agentes que se unen a, y reducen, la concentración eficaz de lípido bioactivo mediante inyección en la vena de la cola en el día 1 y de nuevo en el día 6 tras el trasplante de médula ósea. Se sacrifican ratones en el día 21 y se recogen piel y otros tejidos, se mide el engrosamiento, y se analizan para detectar colágeno y células inmunitarias.

Ejemplo 9: Eficacia de agentes que disminuyen la concentración eficaz de lípidos bioactivos en modelos de aloinjerto de animales

- 10 Aloinjertos de corazón:

Para determinar los efectos terapéuticos del anticuerpo anti-S1P y otros agentes que disminuyen la concentración eficaz de lípidos bioactivos en la prevención del rechazo de aloinjerto, se someten a prueba estos compuestos para determinar la actividad en un modelo de trasplante de corazón heterotópico vascularizado murino. Se trasplantan corazones de ratones Balb/c en la cavidad abdominal de ratones C3H como injertos vascularizados primarios esencialmente tal como se describe por Isobe *et al.*, *Circulation* 1991, 84, 1246-1255. Se administran compuestos de prueba mediante inyección en la vena de la cola, o mediante bombeo continuo, y se monitoriza el tiempo de supervivencia de aloinjerto mediante la detección de un segundo latido cardiaco. Se espera que el tiempo de supervivencia medio del aloinjerto aumente con el anticuerpo anti-S1P u otros agentes que disminuyen la concentración eficaz de lípidos bioactivos.

- 20 Aloinjertos de riñón:

Un modelo bien establecido para estudiar el rechazo crónico en aloinjertos de riñón es el modelo de rata F344 a LEW. Todos los receptores LEW de injertos F344 desarrollan rechazo agudo aproximadamente en el día 30 dando como resultado una pérdida de injerto del 50%. Los animales supervivientes muestran características histopatológicas y funcionales de RC a partir del día 50. Joosten, S.A. *et al.*, (2002) *American Journal of Pathology* 160:1301-1310. Para determinar los efectos terapéuticos del anticuerpo monoclonal anti-S1P y otros agentes que disminuyen la concentración eficaz de lípidos bioactivos en la prevención del rechazo de aloinjerto, se someten a prueba estos compuestos para determinar la actividad en el modelo de rata F344 a LEW, esencialmente tal como se describe por Joosten *et al.* (citado anteriormente).

Aloinjertos de córnea:

- 30 El trasplante de córnea (queratoplastia penetrante (QP)) es el procedimiento de trasplante de tejido más satisfactorio en seres humanos, aunque el rechazo de aloinjerto de córnea todavía es la causa principal de fallo de injerto de córnea. [Ing JJ *et al.* (1998), *Ophthalmology*, vol. 105: 1855-1865]. Recientemente se ha descubierto que las células T CD4(+) funcionan directamente como células efectoras y no células cooperadoras en el rechazo de aloinjertos de córnea. [Hegde S *et al.* (2005), *Transplantation*, vol. 79: 23-31]. Estudios murinos han mostrado números aumentados de neutrófilos, macrófagos y mastocitos en el estroma de córneas que experimentan rechazo. Yamagami S *et al.* (2005), *Mol Vis*, vol. 11, 632-40.

FTY720 es un fármaco inmunosupresor que actúa alterando el tráfico de linfocitos; sus efectos inmunomoduladores están mediados por la unión a algunos de los receptores de S1P expresados en linfocitos. [Bohler T *et al.* (2005), *Transplantation*, vol. 79: 492-5]. Ratones tratados con FTY mostraron una prolongación significativa de la supervivencia de injerto de córnea ortotópico cuando se administró por vía oral. [Zhang *et al.* (2003), *Transplantation*, 76: 1511-3]. El tratamiento oral con FTY también retrasó significativamente el rechazo y disminuyó su intensidad en un modelo de rata a ratón de xenotrasplante de córnea [Sedlakova *et al.* (2005), *Transplantation*, 79: 297-303]. Dada la patogenia conocida del rechazo de aloinjerto en combinación con los datos que sugieren que modular los efectos de la señalización de S1P puede mejorar la supervivencia del injerto de córnea, se cree que agentes, por ejemplo, el anticuerpo monoclonal anti-S1P u otros anticuerpos, que disminuyen la concentración eficaz de lípidos bioactivos, también serán útiles en el tratamiento de estados inmunológicos tales como rechazo de aloinjerto, por ejemplo atenuando la respuesta inmunitaria, y por tanto probablemente mejorarán la supervivencia del injerto de córnea. Estos agentes se administran mediante inyección en la vena de la cola o se administran directamente en el ojo y se espera que prolonguen la supervivencia del injerto.

- 50 Ejemplo 10: Eficacia de agentes que disminuyen la concentración eficaz de lípidos bioactivos en modelos de animales de glomerulonefritis

Las enfermedades inmunitarias del glomérulo, tales como glomerulonefritis, están entre las principales causas de enfermedad renal en fase terminal. Estas enfermedades comparten un curso progresivo caracterizado por fibrosis e inflamación del compartimento tubulointersticial. Para comentarios véase Peters *et al.*, (2004), *Kidney Intl*. 66: 1434-1443. Se cree que agentes, tales como el anticuerpo anti-S1P u otros agentes que disminuyen la concentración eficaz de lípidos de señalización bioactivos, serán particularmente eficaces en estados caracterizados tanto por una componente de cicatrización patológica como por una autoinmunitaria y/o inflamatoria.

En un modelo de rata de glomerulonefritis, el tratamiento con FTY720 redujo los recuentos de linfocitos circulantes así como la infiltración renal de linfocitos. El curso de progresión de la enfermedad se ralentizó significativamente. Peters *et al.*, citado anteriormente. Dado que FTY es un antagonista de receptor de S1P, y por tanto bloquea la señalización de S1P, se cree que agentes que se unen a lípidos de señalización bioactivos, tales como los lisolípidos S1P y LPA, y reducen su concentración eficaz, también demostrarán eficacia en el tratamiento de glomerulonefritis, otras enfermedades renales basadas en el sistema inmunitario y otros estados caracterizados, al menos en parte, por una respuesta inmunitaria aberrante, excesiva o no deseada.

Existen modelos de ratón para glomeruloesclerosis, un sistema de modelo para glomerulonefritis. Gao *et al.* (2004) Molec. Cell. Biol. 24: 9899. Se somete a prueba el efecto del anticuerpo monoclonal anti-S1P sobre la inflamación y la fibrosis renal en un modelo de ratón de glomeruloesclerosis esencialmente según Gao. Debido a su efecto tanto sobre la respuesta inmunitaria como sobre la fibrosis, se espera que el anticuerpo monoclonal anti-S1P y otros agentes que disminuyen la concentración eficaz de lípidos bioactivos sean particularmente eficaces en la ralentización de la progresión de la enfermedad autoinmunitaria renal.

Ejemplo 11: Estudio de estabilidad de formulación

1. Introducción

Este ejemplo describe experimentos para evaluar la estabilidad de varias formulaciones que contienen el anticuerpo monoclonal humanizado LT1009, que es reactivo contra el lípido de señalización bioactivo esfingosina-1-fosfato (S1P). LT1009 es un anticuerpo de isotipo IgG1k de longitud completa diseñado por ingeniería genética que contiene dos cadenas ligeras idénticas y dos cadenas pesadas idénticas, y tiene un peso molecular total de aproximadamente 150 kDa. Se derivaron las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de las cadenas ligeras y pesadas de un anticuerpo monoclonal murino generado contra S1P, e incluyen además una sustitución de Cys por Ala en una de las CDR. En LT1009, regiones de marco humanas contribuyen en aproximadamente el 95% de las secuencias de aminoácidos totales en el anticuerpo, que se une a S1P con alta afinidad y especificidad.

El propósito de las pruebas descritas en este ejemplo fue desarrollar una o más formulaciones preferidas adecuadas para su administración sistémica que pudieran mantener estabilidad y bioactividad de LT1009 a lo largo del tiempo. Tal como se conoce, el mantenimiento de la conformación molecular, y por tanto la estabilidad, depende al menos en parte del entorno molecular de la proteína y de las condiciones de almacenamiento. Las formulaciones preferidas no sólo deben estabilizar el anticuerpo, sino también tolerarse por los pacientes cuando se inyectan. Por consiguiente, en este estudio las diversas formulaciones sometidas a prueba incluyeron o bien 11 mg/ml o bien 42 mg/ml de LT1009, así como diferente pH, concentraciones de sal y de tensioactivo no iónico. Adicionalmente, también se examinaron tres temperaturas de almacenamiento diferentes (5°C, 25°C y 40°C) (que representan condiciones reales, aceleradas y de estrés térmico, respectivamente). Se evaluó la estabilidad usando muestras representativas tomadas de las diversas formulaciones en cinco puntos de tiempo diferentes: al inicio del estudio y tras dos semanas, 1 mes, 2 meses y 3 meses. En cada punto de tiempo, las pruebas implicaron inspección visual, inyectabilidad (extrayendo a través de una aguja de calibre 30) y cromatografía de líquidos de alta resolución con exclusión molecular (SE-HPLC). También se usó espectroscopía de dicroísmo circular (DC) para evaluar la estabilidad de la proteína dado que, por encima de una determinada temperatura, las proteínas experimentan desnaturalización, seguido por cierto grado de formación de agregados. La transición observada se denomina temperatura de "fusión" (T_f) o desnaturalización aparente e indica la estabilidad relativa de una proteína.

2. Materiales y métodos

a. LT1009

Se generaron las muestras de formulación (~0,6 ml cada una) a partir de una disolución madre acuosa que contenía LT1009 42 mg/ml en fosfato de sodio 24 mM, NaCl 148 mM, pH 6,5. Se prepararon muestras que contenían LT1009 11 mg/ml diluyendo un volumen de disolución madre acuosa hasta la concentración deseada usando una disolución de fosfato de sodio 24 mM, NaCl 148 mM, pH 6,5. Para preparar muestras que tenían los diferentes valores de pH, se ajustó el pH de cada concentración de LT1009 (11 mg/ml y 42 mg/ml) a 6,0 ó 7,0 con HCl 0,1 M o NaOH 0,1 M, respectivamente, a partir del valor original de 6,5. Para preparar muestras que tenían diferentes concentraciones de NaCl, se añadió NaCl 5 M a las muestras para llevar la concentración de sal o bien a 300 mM o bien a 450 mM a partir de los 148 mM originales. Para preparar muestras que tenían diferentes concentraciones de tensioactivo no iónico, se añadió polisorbato-80 a las muestras hasta una concentración final de o bien 200 ppm o bien 500 ppm. Se filtraron todas las muestras de manera aséptica a través de filtros de jeringa de membrana de PVDF de 0,22 μ m en viales de suero de 10 ml, despirogenizados, estériles. Se sellaron cada uno de los viales con un tapón revestido de PTFE que no desprende compuestos que se fijó en su sitio y se protegió frente a la contaminación con una tapa engarzada. Antes de la colocación en cámaras de estabilidad, se almacenaron brevemente los viales a 2-8°C; posteriormente, se colocaron verticalmente en una cámara de estabilidad ajustada a una de tres condiciones de almacenamiento especificadas: 40°C(\pm 2°C)/75%(\pm 5%) de humedad relativa (HR); 25°C(\pm 2°C)/60%(\pm 5%) de HR; o 5°C(\pm 3°C)/HR ambiental. En la tabla 3 a continuación se presenta un resumen de las variables de formulación sometidas a prueba.

Tabla 3. Resumen de formulaciones

LT1009, 11 mg/ml			LT1009, 42 mg/ml		
Polisorbato 80	NaCl	pH	Polisorbato 80	NaCl	pH
Polisorbato al 0,02%	NaCl 148 mM	7	Polisorbato al 0,02%	NaCl 148 mM	7
		6,5			6,5
		6			6
	NaCl 300 mM	7		NaCl 300 mM	7
		6,5			6,5
		6			6
	NaCl 450 mM	7		NaCl 450 mM	7
		6,5			6,5
		6			6
Polisorbato al 0,05%	NaCl 148 mM	7	Polisorbato al 0,05%	NaCl 148 mM	7
		6,5			6,5
		6			6
	NaCl 300 mM	7		NaCl 300 mM	7
		6,5			6,5
		6			6
	NaCl 450 mM	7		NaCl 450 mM	7
		6,5			6,5
		6			6

b. Toma de muestras

5 Se analizaron muestras de cada formulación según el calendario indicado en la tabla 4 a continuación. Se usó un vial para cada condición de almacenamiento para todos los puntos de tiempo. En una fecha en la que iban a tomarse muestras, se sacaron los viales de cada cámara de estabilidad y se transfirieron 150 µl de cada muestra a viales separados etiquetados de manera correspondiente que se colocaron en la mesa durante 1 hora antes de las pruebas. Se colocó inmediatamente el vial original de vuelta en la cámara de estabilidad especificada tras extraer la alícuota que iba a someterse a prueba.

Tabla 4. Matriz de estabilidad del estudio de formulaciones de producto terminado

Concentración de proteína	LT1009, 11 mg/ml				
	Intervalos (meses)				
Condiciones de almacenamiento	T=0	0,5	1	2	3
40°C	x, y	x, y	x	x	x, y
25°C		x, y	x	x	x, y
5°C		x, y	x	x	x, y
Concentración de proteína	LT1009, 42 mg/ml				
Condiciones de almacenamiento	Intervalos (meses)				
	T=0	0,5	1	2	3
40°C	x, y	x, y	x	x	x, y
25°C		x, y	x	x	x, y
5°C		x, y	x	x	x, y

10 x = Aspecto, pH, SDS-PAGE, SE-HPLC, UV DO-280, IEF
 y = Inyectabilidad (realizado mediante extracción aséptica de 200 µl de una muestra con una aguja de calibre 30 conectada a una jeringa desechable de 1 ml)

c. Procedimientos analíticos

15 Para un punto de tiempo dado, se sometieron alícuotas de cada muestra a una serie de análisis convencionales, incluyendo inspección visual, inyectabilidad, pH, SDS-PAGE (en condiciones tanto reductoras como no reductoras), SE-HPLC e IEF. Se determinaron las concentraciones de proteína mediante espectroscopía UV (DO-280). También se realizaron estudios de dicroísmo circular (DC).

20 Se realizó espectroscopía de dicroísmo circular por separado de los estudios de formulaciones. Se usó un espectrómetro Aviv 202 CD para realizar estos análisis. Se recogieron espectros de DC de UV cercano desde 400 nm hasta 250 nm. En esta región, los disulfuros y las cadenas laterales aromáticas contribuyen a las señales de DC. En la región de longitud de onda de UV lejano (250-190 nm), los espectros están dominados por el esqueleto peptídico. Se generaron curvas de desnaturalización térmica mediante monitorización a 205 nm, una longitud de onda comúnmente usada para proteínas de lámina b. Se recogieron datos usando muestras a 0,1 mg/ml con calentamiento desde 25°C hasta 85°C. Se recogieron datos en incrementos de 1°C. El tiempo total para tal barrido

de desnaturalización fue de entre 70 y 90 minutos. El tiempo de promediado fue de 2 segundos.

3. Resultados y discusión

5 Para todas las muestras analizadas, el aspecto visual no cambió a lo largo del tiempo. Asimismo, las pruebas de inyectabilidad demostraron que las muestras podían extraerse al interior de una jeringa equipada con una aguja de calibre 30 sin dificultades. Los resultados de las diversas pruebas analíticas fueron compatibles, y se determinó que la SE-HPLC era un método excelente de indicación de la estabilidad para LT1009. Estos resultados mostraron que aumentar la concentración de sal redujo tanto la generación de agregados como la generación de impurezas distintas de agregados más pequeñas. También se encontró que disminuir el pH también redujo la formación de agregados e impurezas. Además, se determinó que aumentar la concentración de polisorbato-80 por encima de 200 ppm no estabilizó adicionalmente LT1009. La figura 2 ilustra los resultados de los experimentos de SE-HPLC realizados con muestras que contenían LT1009 11 mg/ml. Se obtuvieron resultados comparables para muestras que contenían LT1009 42 mg/ml, aunque concentraciones de LT1009 menores mostraron menos potencial de formación de agregados en comparación con la concentración mayor, lo que indica que el anticuerpo pareció ser ligeramente menos estable en todas las condiciones sometidas a prueba a la concentración mayor.

15 A partir de los estudios de dicroísmo circular, se encontró que LT1009 adopta una estructura terciaria bien definida en disolución acuosa, con entornos bien ordenados alrededor de residuos tanto de Tyr como de Trp. También pareció que al menos algunos de los disulfuros en moléculas de anticuerpo experimentan cierto grado de tensión de enlaces, aunque esto no es poco común cuando están presentes disulfuros tanto intra como intercatenarios. Se encontró que la estructura secundaria de LT1009 era ordinaria, y mostró un espectro de DC de UV lejano compatible con una estructura de láminas β . La transición observada se denomina temperatura de "fusión" (T_f) o desnaturalización aparente. Al calentar, LT1009 presentó una T_f aparente de aproximadamente 73°C a pH 7,2. La T_f aparente aumentó hasta aproximadamente 77°C a pH 6,0. Estos resultados indican que un pH ligeramente ácido puede potenciar la estabilidad a largo plazo de formulaciones acuosas de LT1009. La adición de NaCl y/o polisorbato-80 también proporcionó estabilización adicional.

25 En conjunto, los datos de estos experimentos indican que LT1009 es lo más estable alrededor de pH 6 y NaCl 450 mM independientemente de la concentración de anticuerpo. De hecho, las pruebas de SE-HPLC indicaron que aumentar la concentración de sal hasta 450 mM y disminuir el pH a 6,0 al tiempo que se mantuvo la concentración de polisorbato-80 a 200 ppm tuvo un efecto muy beneficioso sobre la estabilidad de LT1009. La inclusión de polisorbato-80 por encima de 200 ppm no tuvo ningún efecto de mitigación adicional contra la formación de agregados, probablemente porque ya estaba por encima de su concentración micelar crítica a 200 ppm. Sin desear limitarse a ninguna teoría particular, el hecho de que la formación de agregados en LT1009 se redujo al aumentar la concentración de sal en las condiciones estudiadas puede indicar que la formación de agregados se basa, al menos en parte, más en interacciones iónicas entre moléculas en vez de en interacciones hidrófobas. La observación de que reducir el pH desde 7 hasta 6 también reduce la formación de agregados puede explicarse por la hidrofobicidad reducida del aminoácido histidina al pH inferior. Finalmente, el aumento observado de la tendencia a la formación de agregados a una concentración de LT1009 aumentada puede explicarse simplemente por la mayor probabilidad de que moléculas impacten entre sí en el momento adecuado y el lugar adecuado para la formación de agregados.

40 En vista de estos experimentos, una formulación de LT1009 acuosa preferida es una que tiene fosfato 24 mM, NaCl 450 mM, 200 ppm de polisorbato-80, pH 6,1. La tonicidad relativamente alta de esta formulación no debe plantear un problema para aplicaciones sistémicas ya que probablemente el producto terminado se diluirá mediante inyección en bolsas i.v. que contienen un mayor volumen de PBS antes de la administración a un paciente.

REIVINDICACIONES

1. Agente contra esfingosina-1-fosfato (S1P) para su uso en un método para tratar esclerosis múltiple, en el que el agente es un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se une a, y neutraliza, S1P.
2. Agente para su uso según la reivindicación 1, en el que el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.
- 5 3. Agente para su uso según la reivindicación 2, en el que el anticuerpo monoclonal es un anticuerpo monoclonal humanizado.
4. Agente para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 - 3, en el que el animal es un ser humano.
- 10 5. Agente para su uso según la reivindicación 1, en el que el medicamento es para su uso con un segundo medicamento que comprende un agente terapéutico que se administra para el tratamiento de esclerosis múltiple o un síntoma de la misma.
- 15 6. Agente para su uso según la reivindicación 5, en el que el agente terapéutico del segundo medicamento es un agente modificador de la enfermedad para el tratamiento de esclerosis múltiple, un corticosteroide, o un agente terapéutico que se administra para el tratamiento de un síntoma primario o secundario de esclerosis múltiple, en el que:
 - a. el agente modificador de la enfermedad para el tratamiento de esclerosis múltiple es opcionalmente un inmunomodulador o un inmunosupresor, en el que el inmunosupresor es opcionalmente mitoxantrona o FTY720; y
 - 20 b. el inmunomodulador es opcionalmente interferón beta 1b, interferón beta 1a, acetato de glatirámero o natalizumab.

LOS ANTICUERPOS FRENTE A S1P INTERFIEREN EN EL DESARROLLO DE EAE: CURSO DE LA ENFERMEDAD

