

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 581 488**

51 Int. Cl.:

**A61K 39/395** (2006.01)

**C07K 16/40** (2006.01)

**C12N 9/20** (2006.01)

**A61P 19/02** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.04.2010 E 10761935 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.04.2016 EP 2416803**

54 Título: **Nuevos métodos para el tratamiento de enfermedades inflamatorias**

30 Prioridad:

**08.04.2009 SE 0950228**  
**23.10.2009 US 254221 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**06.09.2016**

73 Titular/es:

**LIPUM AB (100.0%)**  
**Tvistevägen 48 P.O. Box 7995**  
**907 19 Umeå, SE**

72 Inventor/es:

**HERNELL, OLLE;**  
**LINDQUIST, SUSANNE y**  
**LUNDBERG, LENNART GUSTAV**

74 Agente/Representante:

**DEL VALLE VALIENTE, Sonia**

**ES 2 581 488 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

Nuevos métodos para el tratamiento de enfermedades inflamatorias

5 **Campo técnico de la invención**

La invención proporciona métodos y composiciones farmacéuticas que comprenden antagonistas para la proteína lipasa estimulada por sales biliares (BSSL) para la prevención, la profilaxis y el tratamiento de artritis reumatoide. La invención se refiere además a composiciones farmacéuticas que comprenden antagonistas de BSSL y a su uso en métodos para la prevención, la profilaxis y tratamiento de artritis reumatoide.

**Antecedentes de la invención**Enfermedades inflamatorias - Artritis reumatoide

La inflamación, una reacción del cuerpo frente a la lesión o frente a la irritación infecciosa, alérgica o química puede conducir a una variedad de enfermedades inflamatorias o trastornos tales como inflamación asociada con alergia, inflamación relacionada con la producción de óxido nítrico, inflamación relacionada con la piel, el abdomen, el sistema nervioso central o periférico, el ojo o las glándulas lacrimales, el oído, la nariz, la boca, el pulmón, el corazón, el hígado, el páncreas, el tiroides, el tejido adiposo, el riñón, las articulaciones o los vasos sanguíneos, o inflamación relacionada con infección, traumatismo o autoinmunidad.

La artritis reumatoide (AR) es una enfermedad autoinmunitaria crónica, inflamatoria, sistémica que afecta a aproximadamente el 1% de la población general en las sociedades occidentales (Gabriel 2001). El proceso de la enfermedad da como resultado una destrucción progresiva del hueso y cartilago articulares. La destrucción resulta de respuestas inmunitarias y procesos inflamatorios innatos no específicos de antígeno. La enfermedad se caracteriza por inflamación de articulaciones mono o poliarticular con acumulación masiva de neutrófilos en el tejido y líquido sinoviales. Los neutrófilos sinoviales contribuyen a la destrucción del cartílago liberando proteasas y generando oxidantes y está haciéndose más y más evidente que la inhibición de la infiltración de neutrófilos en articulaciones inflamadas podría ser un enfoque para prevenir la progresión de la enfermedad (Hallett 2008). Las terapias actuales para AR incluyen fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE) para el tratamiento del dolor, fármacos antirreumáticos modificadores de la enfermedad (FARME) y agentes biológicos que seleccionan como diana citocinas proinflamatorias específicas, o receptores de superficie celular de diversos tipos de células.

Sin embargo, sigue habiendo la necesidad de tratamientos farmacéuticos alternativos de enfermedades inflamatorias, especialmente enfermedades inflamatorias crónicas. En consecuencia hay la necesidad de identificar nuevas dianas únicas implicadas en procesos y señalización inflamatorios, que puedan usarse como la base para el desarrollo de nuevos agentes terapéuticos innovadores para el tratamiento, la profilaxis y la prevención de enfermedades inflamatorias.

Lipasa estimulada por sales biliares

La lipasa estimulada por sales biliares (BSSL) también designada éster carboxílico lipasa (CEL) o lipasa dependiente de sales biliares (BSDL) es una enzima lipolítica expresada en el páncreas exocrino y secretada a la luz intestinal lumen en todas las especies investigadas hasta la fecha. En algunas especies, incluyendo el ser humano, BSSL también se expresa por la glándula mamaria lactante se secreta con la leche. BSSL tiene una amplia especificidad de sustrato con capacidad para hidrolizar una variedad de diferentes sustratos, por ejemplo ésteres de colesterilo, tri-, di- y monoacilglicérols, ésteres de vitaminas liposolubles, fosfolípidos, galactolípidos y ceramidas (Hui y Howles 2002). Originalmente se pensaba que la función fisiológica de BSSL estaba confinada al intestino delgado y la hidrólisis de grasa de la dieta (Hernell *et al.* 1997). La alta abundancia de BSSL en el jugo pancreático (hasta el 5% del contenido en proteína total) y la capacidad de BSSL para hidrolizar un amplio espectro de lípidos ha conducido a los investigadores a sugerir una variedad de funciones para BSSL en la digestión y absorción de lípidos. BSSL tiene un papel clave en la absorción de ésteres de colesterilo (Fält *et al.* 2002), verificado en ratones que carecen de la BSSL (gen CEL) (Howles *et al.* 1996). Aunque ésta se considera su función principal en el adulto humano, es probable que contribuya también a la digestión y absorción de triglicéridos en el lactante recién nacido (Lindquist y Hernell 2010).

Se encontró que BSSL estaba presente en niveles bajos, pero significativos en el suero de individuos sanos (Bläckberg *et al.* 1985) y la investigación actual ha implicado que BSSL participa en el metabolismo de lipoproteínas y la modulación de la aterosclerosis (Hui y Howles 2002). La posible función, o incluso la cuestión de si niveles elevados de BSSL circulante es un factor de riesgo para, o protege frente a la aterosclerosis, no está clara. Se notificó por primera vez (Hui y Howles 2002) una asociación positiva sorprendentemente fuerte entre BSSL, sometida a ensayo como actividad colesterol esterasa, y los niveles de colesterol total así como de lipoproteínas de baja densidad (LDL) en suero. Se mostró entonces que BSSL estaba asociada con células de músculo liso (SMC) dentro de placas ateroscleróticas e inducía proliferación de SMC vasculares *in vitro* (Auge *et al.* 2003). Un estudio, usando ratones transgénicos, demostró que la expresión en macrófagos de BSSL es proaterogénica, favoreciendo la

acumulación de ésteres de colesterol y la formación de células espumosas (Kodvawala *et al.* 2005). Según estos estudios, BSSL sería un factor de riesgo para la aterosclerosis. Por otro lado, BSSL reduce el contenido en lisofosfatidilcolina en LDL oxidadas, reduciendo de ese modo la acumulación de LDL oxidadas en macrófagos (Hui y Howles 2002), y se ha sugerido que desempeña un papel fisiológico en la captación selectiva hepática y el metabolismo de ésteres de colesterol de lipoproteínas de alta densidad mediante interacciones directas e indirectas con el receptor de eliminación de la ruta de BI (Camarota *et al.* 2004), lo que implica que BSSL en el suero protege frente a la aterosclerosis.

#### La proteína BSSL

La proteína BSSL humana (codificada por el gen CEL) es una glicoproteína monocaténaria de 722 aminoácidos (Nilsson *et al.* 1990). La enzima se sintetiza como un precursor de 742 aminoácidos con un péptido señal de 20 aminoácidos. Se han postulado dos sitios de unión a sales biliares que regulan la actividad de la enzima y la resistencia a proteasas (Hui 1996) así como un dominio de unión a esfingolípidos (SBD) (Aubert-Jousset *et al.* 2004).

Esquemáticamente la enzima puede dividirse en dos partes:

i) El dominio N-terminal con una homología sorprendente con acetilcolinesterasa y algunas otras esterasas. En esta parte se encuentra la tríada catalítica propuesta (Ser194 (incluida en el motivo GESAG), Asp320 y His435) así como un sitio de N-glicosilación, Asn187, un sitio de unión a heparina (que se postula que está ubicado en la posición 1-100) y los dos puentes disulfuro intracatenarios (Cys64-Cys80 y Cys 246-Cys257). Se ha encontrado que la capacidad de unión a heparina está ubicada en la parte de la molécula que consiste en los aminoácidos 1 - 445 (Spilburg *et al.* 1995) y el dominio de unión a heparina puede ser, de hecho, una estructura tridimensional compuesta por diferentes secuencias. Se cree que las propiedades de unión a heparina de BSSL son importantes para interacciones con membranas celulares, ejemplificadas por membranas celulares intestinales (Fält 2002).

ii) La parte C-terminal (codificada por el exón 11) con un número variable de repeticiones en tándem (VNTR), región que contiene repeticiones similares pero no idénticas (11 aminoácidos). La forma humana más común contiene 16, pero hay una variación en el número de repeticiones entre individuos y alelos (Lindquist *et al.* 2002). Las repeticiones van seguidas por una cola extra de 11 aminoácidos (esta cola es más larga en la enzima de rata y ratón correspondiente). Las repeticiones son ricas en prolina y la presencia de ácido aspártico en cada unidad de repetición y ácido glutámico en algunas, hace que esta región sea altamente ácida y contribuye al bajo punto isoeléctrico de la proteína. Se ha notificado que el número de repeticiones ricas en prolina varía extensamente entre especies, oscilando normalmente entre tres en ratón y la vaca, cuatro en la rata y 16 en seres humanos y 39 en el gorila (Hui y Howles 2002; Madeyski *et al.* 1999). Esta diversidad en el número de unidades repetidas puede explicar las diferencias de tamaño observadas de la proteína entre las especies; la BSSL de ratón es una proteína de 74 kDa mientras que la BSSL humana, que está extensamente glicosilada por toda la región repetida, tiene una masa molecular aparente de 120-140 kDa; las repeticiones pueden portar la mayor parte del 15-35% de hidratos de carbono de la proteína. La masa molecular aparente variable puede explicarse tanto por el número de repeticiones como por las diferencias en la glicosilación (Lindquist *et al.* 2002). Se ha mostrado analizando la parte C-terminal aislada de BSSL de leche humana (aminoácidos 528-722) que probablemente sólo 10 de 16 repeticiones en la BSSL de leche humana están O-glicosiladas (Wang *et al.* 1995).

Se ha sugerido que las repeticiones pueden tener un papel funcional en la protección de BSSL frente a la degradación proteolítica y que su O-glicosilación es importante para la secreción de la enzima (Bruneau *et al.* 1997). Los oligosacáridos en la región C-terminal contienen estructuras antigénicas Lewis x y Lewis b y menos Lewis a. Debido a esos determinantes antigénicos relacionados con el grupo sanguíneo, la región C-terminal de BSSL puede tener una función adhesiva en interacciones célula-célula, tal como se ilustra por sus efectos antimicrobianos (Naarding *et al.* 2006; Ruvoén-Clouet *et al.* 2006). Por otro lado, la región repetida puede ser menos importante para la actividad catalítica, la activación por sales biliares y la unión a heparina (Hui 1996).

También se ha sugerido que la cola C es una parte estructural importante mediante la unión a un receptor de tipo lectina (LOX-1) en la superficie de células endoteliales intestinales (Fayard *et al.* 2003). El/los sitio(s) de unión a heparina forma(n) la otra parte de unión, y estos sitios de unión tienen un papel fundamental en el mecanismo de acción de BSSL en diferentes entornos celulares y estadios celulares.

#### BSSL vascular

La comparación del genotipo de VNTR de BSSL y el fenotipo de lípidos séricos reveló una asociación entre el número de repeticiones y el perfil de colesterol sérico (Bengtsson-Ellmark *et al.* 2004). Aunque es posible que el polimorfismo de repeticiones sea meramente un marcador genético para el perfil de lípidos, también es posible que tenga un papel funcional en la determinación de la composición de lípidos plasmáticos.

Se implica un papel más amplio de BSSL en el metabolismo lipídico por la presencia de BSSL en plasma humano y tejido aórtico. La fuente de BSSL circulante se ha discutido extensamente. Se mostró que macrófagos humanos y

células endoteliales sintetizan y secretan la enzima (Hui y Howles 2002). A la inversa, en otro estudio se asoció BSSL dentro de lesiones ateroscleróticas con células de músculo liso (SMC) pero no con macrófagos activados o células endoteliales (Augé *et al.* 2003). En aún otro estudio, se abogó por que BSSL inyectada en bucles intestinales de rata se internaliza por enterocitos, se transfería a través de las células y se liberaba a la circulación (Bruneau *et al.* 2003). Basándose en estos datos se propuso que BSSL circulante se origina a partir del páncreas. Sin embargo, se ha mostrado además que el nivel sérico de BSSL ni aumenta después de una ingesta de leche mamaria, ni difiere entre lactantes humanos amamantados y alimentados con leche artificial, aunque la leche mamaria para recién nacidos es la fuente principal de BSSL, mientras que está ausente de la leche artificial para lactantes (Bläckberg *et al.* 1985; Shamir *et al.* 2003).

Se ha notificado una asociación de BSSL con lipoproteínas que contienen apolipoproteína B en plasma humano (Bruneau *et al.* 2003), lo que junto con la observación de que BSSL está presente en la aorta humana y tiene la capacidad de modificar la composición de lipoproteínas de baja densidad (LDL) y lipoproteínas de alta densidad (HDL) y reducir la aterogenicidad de LDL oxidadas (oxLDL) disminuyendo su contenido en lisofosfatidilcolina (lysoPC) (Shamir *et al.* 1996), hizo que se pensara en un nuevo posible papel de BSSL como factor protector en el desarrollo de aterosclerosis. LysoPC es un componente de fosfolípido principal en oxLDL y se genera por la oxidación y fragmentación de ácidos grasos poliinsaturados esterificados en la posición sn-2 de la molécula de PC, seguido por hidrólisis del residuo acilo graso acortado por fosfolipasa A2 asociada a LDL (PLA2) y BSSL. Aunque lysoPC constituye sólo el 1-5% de PC total en LDL no oxidada, la modificación oxidativa de LDL puede elevar esta proporción hasta tanto como el 40-50%. LysoPC actúa como quimioatrayente para monocitos, induce adhesión de monocitos al endotelio vascular y promueve la proliferación de macrófagos, lo que finalmente conduce a la formación de células espumosas. Debido a estos efectos sobre lysoPC, se ha sugerido que BSSL puede interactuar con colesterol y lipoproteínas oxidadas modulando la progresión de la aterosclerosis (Hui y Howles 2002).

Sin embargo, el hecho de que BSSL se encuentra y se acumula en lesiones ateroscleróticas, y el hecho de que los monocitos así como los macrófagos (o SMC que tienen un fenotipo de macrófago) expresan y secretan BSSL, indican que estas células pueden ser una posible fuente de la BSSL acumulada. El mecanismo detrás de un papel fisiopatológico de BSSL en macrófagos se sugiere que es la función de BSSL como ceramidas (Hui y Howles 2002) por su reducción de los niveles de ceramida y lisofosfatidilcolina que conducen a una acumulación aumentada de ésteres de colesterol en respuesta a lipoproteínas aterogénicas dando como resultado un tamaño aumentado de la lesión aterosclerótica *in vivo*. Esto está en línea con el estudio de Kodvawala *et al.* (2005), que usando modelos *in vivo* mostraron que la expresión de BSSL en macrófagos promueve la síntesis y acumulación de ésteres de colesterol en respuesta a LDL modificada y aumenta las lesiones ateroscleróticas en ratones deficientes en apoE.

#### La respuesta a la hipótesis de retención de la aterosclerosis

Muchos de los procesos implicados en los estadios tempranos de la aterogénesis incluyendo el daño endotelial, la oxidación de lipoproteínas y proliferación de macrófagos y VSMC (células de músculo liso vascular) no son suficientes individualmente como para conducir al desarrollo de lesiones. La hipótesis de respuesta a la retención sugiere que la retención subendotelial de lipoproteínas aterogénicas es el desencadenante para todos estos procesos son de hecho respuestas fisiológicas normales a la acumulación de lípidos.

Aunque el determinante principal de la retención inicial de LDL es probable que sea la composición de proteoglicanos dentro del espacio subendotelial, BSSL puede facilitar y reforzar la retención una vez que la lesión ha comenzado a formarse actuando como puente molecular entre los proteoglicanos subendoteliales y las lipoproteínas (documento WO 2005/095986). La BSSL que se une a los componentes de la matriz extracelular puede actuar como moléculas de unión en la retención de LDL, tal como se sugiere para la lipoproteína lipasa (LPL) (Pentikainen *et al.* 2002).

#### BSSL en plaquetas

Recientemente se encontró que BSSL se almacena en plaquetas sanguíneas y se libera tras la activación de plaquetas (Panicot-Dubois *et al.* 2007). Además, se mostró que BSSL induce movilización de calcio en plaquetas y potencia la agregación plaquetaria mediada por trombina y la diseminación.

En un modelo de trombosis de ratón (lesión inducida por láser), BSSL se acumulaba en trombos arteriales *in vivo*, en sitios de lesión de las paredes de los vasos. Cuando se antagonizó el receptor de quimiocina CXC 4 (CXCR4), se inhibió la acumulación de BSSL y se redujo el tamaño del trombo. En ratones deficientes en BSSL (BSSL-KO) los tiempos de sangrado de la cola aumentaron en comparación con los de ratones de tipo natural. Estos datos sugieren que BSSL modula la formación de trombos interactuando con CXCR4 en plaquetas.

CXCR4 pertenece a la familia génica de receptores acoplados a proteínas G (GPCR), y tras la activación CXCR4 induce señalización posterior mediante varias rutas diferentes; por ejemplo la unión a CXCR4 del ligando de quimiocina SDF-1 activa la señalización mediada por proteínas G e induce respuestas quimiotácticas celulares (Clemetson *et al.* 2000). También se sabe que CXCR4 interacciona con VIH-1 y actúa como correceptor para la entrada del virus en las células. La unión de VIH-1 a CXCR4 está mediada por un dominio denominado bucle V3

presente en gp120 de VIH-1. La proteína BSSL contiene una región que está relacionada estructuralmente con el bucle V3 de gp120. Se propuso que esta región, denominada dominio de bucle similar a V3 (aminoácidos 361-393) (Aubert-Jousset *et al.* 2004) mediaba en la unión de BSSL a CXCR4 en plaquetas.

5 En resumen, hay resultados tanto confusos como contradictorios con respecto a la fuente y función de BSSL en tejido plasmático y aórtico.

10 El documento EP 1840573 notifica diferencia en el patrón de expresión génica entre ratones NOD (dibéticos no obesos) positivos o negativos para autoanticuerpos frente a insulina. Se identificaron 125 genes expresados diferencialmente, siendo uno de ellos el gen CEL que codifica para BSSL. Se identifica que los genes expresados diferencialmente tienen utilidad en el diagnóstico temprano de un estado preinflamatorio de enfermedades autoinmunitarias, tales como diabetes tipo I. Se sugiere además que los genes expresados diferencialmente son dianas para el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias que tienen una fase preinflamatoria. Se conoce bien en la técnica que la expresión de numerosos genes se altera como consecuencia del desarrollo de una enfermedad específica, tal como se demuestra en el documento EP 1840573. Sin embargo, no puede considerarse que todos de tales genes expresados diferencialmente sean la causa del desarrollo de la enfermedad. Por el contrario, la identificación del/de los gen(es) causante(s), si existen, requiere investigaciones complicadas adicionales. El documento EP 1840573, incluso si identifica BSSL como posible marcador para enfermedad inflamatoria, no puede identificar BSSL como causa para el desarrollo de enfermedad inflamatoria.

20 McKillop AM *et al.* (Acta Paediatrica, Universitetsforlaget, Oslo, NO, vol. 93, n.º 1, enero de 2004, págs. 10-16) dan a conocer la caracterización de la región C-terminal de formas moleculares de lipasa estimulada por sales biliares (BSSL) de leche humana. Se comenta que la región C-terminal de BSSL puede tener una función adhesiva en la interacción célula-célula.

25 El documento WO2008/148884 se refiere a un método para producir un compuesto de unión a antígeno adecuado para su uso en el tratamiento de cáncer pancreático, compuestos de unión a antígeno y sus usos, y aborda la necesidad de nuevos enfoques y herramientas para el tratamiento de cáncer pancreático exocrino y otras formas de cáncer. Se muestra que los compuestos de unión a antígeno que se unen por ejemplo a BSDL, tales como anticuerpos anti-BSDL, pueden inducir apoptosis y/o ralentizar la proliferación de células tumorales que expresan BSDL.

### Sumario de la invención

35 La presente invención se basa en el sorprendente descubrimiento de que BSSL tiene un papel en procesos inflamatorios y que la inhibición o eliminación de BSSL protege frente al desarrollo de artritis crónica en modelos animales.

40 La presente invención se basa en la demostración de que ratones deficientes en BSSL están protegidos frente al desarrollo de enfermedad inflamatoria, ejemplificada por artritis inducida por colágeno (CIA). En consecuencias antagonistas para BSSL humana son potencialmente útiles para la prevención, la profilaxis y/o el tratamiento de enfermedades inflamatorias. Antagonistas adecuados para BSSL son agentes que reducen la actividad, cantidad y/o expresión de BSSL. Antagonistas preferidos de BSSL que pueden usarse según la presente invención son anticuerpos y fragmentos de anticuerpo que se unen específicamente a BSSL humana, así como polinucleótidos antisentido y de iARN que comprenden secuencias complementarias a secuencias de polinucleótido que codifican para BSSL humana. Lo más preferiblemente los antagonistas de BSSL que van a usarse según la invención son anticuerpos monoclonales frente a BSSL.

50 Por consiguiente, un aspecto de la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo que se une específicamente a BSSL humana, y un portador o excipiente farmacéuticamente aceptable para su uso en la prevención, la profilaxis y/o el tratamiento de artritis reumatoide.

55 Aún otro aspecto de la presente invención proporciona el uso de un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo que se une específicamente a BSSL humana en la fabricación de una composición farmacéutica para la prevención, la profilaxis y/o el tratamiento de artritis reumatoide.

60 Otro aspecto de la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende una molécula de iARN o un polinucleótido antisentido que comprende una secuencia complementaria a una parte de una secuencia de polinucleótido que codifica para BSSL humana o una secuencia complementaria a la misma, y un portador o excipiente farmacéuticamente aceptable para su uso en la prevención, la profilaxis y/o el tratamiento de artritis reumatoide.

65 Aún otro aspecto de la presente invención proporciona el uso de una molécula de iARN o un polinucleótido antisentido que comprende una secuencia complementaria a una parte de una secuencia de polinucleótido que codifica para BSSL humana o una secuencia complementaria a la misma en la fabricación de una composición farmacéutica para la prevención, la profilaxis y/o el tratamiento de artritis reumatoide.

**Breve descripción de los dibujos**

Figura 1. Detección de ARNm de BSSL en hígado humano.

5 Se transcribió de manera inversa ARN total, aislado por duplicado de biopsias hepáticas de cuatro individuos, y se amplificó usando cebadores oligonucleotídicos específicos de BSSL. Se resolvieron los productos de PCR mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,8% y se tiñeron con bromuro de etidio. Se amplificó un producto de PCR del tamaño esperado (327 nt) a partir de todas las muestras; paciente 1 (carriles 1 y 2); paciente 2 (carriles 3 y 4); paciente 3 (carriles 5 y 6); paciente 4 (carriles 7 y 8). El ADNc sintetizado a partir de ARN aislado de leche humana se usó como control positivo (carril 9). Se usó el marcador de tamaño molecular de ARN de 50 pb O'GeneRuler (Fermentas, Ontario, Canadá) como marcador de tamaño molecular (carril 10).

Figura 2. Inmunotransferencia de tipo Western.

15 Se separaron extractos proteicos purificados por afinidad derivados de dos muestras de hígado humano (paciente n.º 3 y n.º 4) mediante SDS-PAGE (10%), se transfirieron a membranas de PVDF y se estudiaron con sonda con un anticuerpo policlonal anti-BSSL humana. Paciente 3, carril 1; paciente 4, carril 2. Se usaron extractos proteicos de leche humana, carril 3; páncreas humano, carril 4; y BSSL purificada de leche humana, carril 5, como controles positivos.

Figura 3. Histología, tinción con aceite rojo O y localización de BSSL en secciones de hígado humano.

25 Se tiñeron secciones de tejido hepático (criosecciones de 8 µm) obtenidas de dos pacientes [paciente 1 (A-C); paciente 4 (D-F)] con hematoxilina y eosina (A, D), aceite rojo O (B, E), e inmunohistoquímica con anticuerpos anti-BSSL policlonales (C, F).

Figura 4. Tinciones de inmunofluorescencia dobles frente a BSSL y marcadores de células inmunitarias.

30 BSSL se colocaliza con células que expresan CD 15 pero no con células que expresan CD68 en hígado humano. Tinción de inmunofluorescencia doble de secciones de hígado (8 µm) obtenidas de dos pacientes [paciente 1 (panel 4A) y paciente 4 (panel 4B)] usando un anticuerpo policlonal de conejo anti-BSSL y anticuerpos monoclonales de ratón anti-CD68 o anti-CD15. Apareció un color amarillo en la fotografía fusionada en ambos paneles cuando se usaron juntos anticuerpos anti-BSSL y anti-CD15, observado como una tinción brillante en estas figuras en blanco y negro, indicando colocalización.

Figura 5. BSSL se localiza en granulocitos positivos para CD15 circulantes.

40 Se recogieron leucocitos humanos de sangre de voluntarios sanos, se permeabilizaron y se tiñeron mediante inmunofluorescencia doble usando anticuerpos policlonales de conejo anti-BSSL (A) y monoclonales de ratón anti-CD15 (B). Se contratiñeron los núcleos celulares con DAPI (C). Apareció un color amarillo en la fotografía fusionada (D), observado como una tinción brillante en esta figura en blanco y negro, indicando colocalización.

Figura 6. Localización subcelular de BSSL en granulocitos circulantes.

45 Se recogieron leucocitos humanos de sangre de voluntarios sanos y se tiñeron mediante inmunofluorescencia doble usando anticuerpos policlonales de conejo anti-BSSL y anticuerpos monoclonales de ratón anti-CD15. Para distinguir entre localización extracelular e intracelular, las células o bien se permeabilizaron (panel superior) o bien no (panel inferior) antes de que se aplicaran los anticuerpos. Apareció un color amarillo en la fotografía fusionada en el panel superior, observado como una tinción brillante en estas figuras en blanco y negro, indicando colocalización.

Figura 7. Análisis de inmunotransferencia de tipo Western.

55 Se separaron extractos proteicos purificados por afinidad derivados de células sanguíneas mononucleares humanas (carriles 1 y 2) o granulocitos polinucleares (carriles 3-5) mediante SDS-PAGE (10%), se transfirieron a membranas de PVDF y se estudiaron con sonda con un anticuerpo policlonal anti-BSSL humana. Se usaron extractos proteicos de leche humana (carril 6) y páncreas humano (carril 7) como controles positivos.

Figura 8. Detección de ARNm de BSSL en células sanguíneas humanas.

60 Se transcribió de manera inversa el ARN total aislado de células sanguíneas mononucleares y granulocitos polinucleares de dos individuos sanos y se amplificó usando cebadores oligonucleotídicos específicos de BSSL. Se resolvieron los productos de PCR mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,8% y se tiñeron con bromuro de etidio. Se amplificó un producto de PCR del tamaño esperado (327 nt) a partir de todas las muestras. Células sanguíneas mononucleares (carriles 1 y 2); granulocitos polinucleares (carriles 3 y 4). Los controles negativos (omitiendo la RT de la reacción de síntesis de ADNc) se muestran en los carriles 5-8. Se usó el marcador de tamaño

molecular de 50 pb O'GeneRuler (Fermentas) como marcador de tamaño molecular (carril 9).

Figura 9. Inmunolocalización de BSSL en placa aterosclerótica humana.

5 Se realizó inmunohistoquímica sobre secciones de tejido fijadas con formalina, incrustadas en parafina obtenidas de arterias carótidas ateroscleróticas usando un anticuerpo policlonal de conejo frente a péptido de BSSL (aminoácidos 328-341) (A) y (C) o suero preinmunitario de conejo (B) y (D), como control negativo. Se usó hematoxilina de Mayer para la contratinción. La figura muestra datos de dos pacientes (A, B son secciones del paciente 1; C, D son secciones del paciente 2).

10 Figura 10. Puntuación de artritis media en modelo de ratón de CIA.

15 Se siguió la artritis durante 57 días puntuando 2-3 veces a la semana. Los ratones deficientes en BSSL desarrollaron una puntuación de enfermedad altamente inferior significativamente en comparación con controles de tipo natural. Había una profunda diferencia en la susceptibilidad a la enfermedad entre los sexos. Sólo unos cuantos ratones hembra desarrollaron artritis y los que la desarrollaron tenían una puntuación baja. (A) Todos los ratones; (B) machos; (C) hembra.

20 Figura 11. Incidencia y gravedad en modelo de ratón de CIA.

Los ratones deficientes en BSSL desarrollaron artritis con incidencia reducida y también gravedad inferior en comparación con sus compañeros de camada de tipo natural. La incidencia se muestra como el porcentaje de todos los ratones (A) y la gravedad se muestra como la puntuación de artritis media de sólo ratones enfermos (B).

25 Figura 12. Concentración en suero de anticuerpos anti-CII en modelo de ratón de CIA.

30 El análisis de la concentración de anticuerpo anti-colágeno II (anticuerpo anti-CII) en suero extraído en el día 30 (panel A) y el día 57 (panel B) no reveló diferencias en la respuesta entre ratones deficientes en BSSL (barras negras) y ratones de tipo natural para BSSL (barras blancas) en ninguno de los isotipos de IgG (representados por IgG total en la figura), ni de IgM.

Figura 13. Degradación del cartílago en modelo de ratón de CIA.

35 Se midió la concentración de proteína oligomérica de matriz de cartílago (COMP) en suero en el día 57 mediante ELISA como marcador de la degradación del cartílago. El nivel de COMP era significativamente inferior en machos deficientes en BSSL (barra negra) en comparación con controles macho de tipo natural (barra blanca). En hembras no había diferencia.

40 Figura 14. Puntuación de artritis media, gravedad e incidencia de artritis en modelo de ratón de CIA.

45 Se siguió la artritis durante 48 días puntuando 2-3 veces a la semana. Los ratones deficientes en BSSL mostraron una puntuación de enfermedad significativamente inferior en comparación con ratones de tipo natural para BSSL (A) y (C), lo que también se reflejó por una incidencia inferior de artritis (B). Ratones heterocigotos para BSSL eran menos propensos a desarrollar la enfermedad en comparación con ratones de tipo natural para BSSL pero no tan resistentes como los ratones deficientes en BSSL homocigotos. (A) y (B) todos los ratones; (C) sólo ratones enfermos. \* representa  $p < 0,05$  y \*\* representa  $p < 0,01$ .

Figura 15. Degradación del cartílago en modelo de ratón de CIA.

50 Se midió la concentración de COMP en suero en el día 48 mediante ELISA como marcador para la degradación del cartílago. El nivel de COMP era significativamente inferior en ratones deficientes en BSSL (barra negra) en comparación con controles de tipo natural para BSSL (barra blanca). Se encontró que la concentración en suero de COMP en ratones heterocigotos para BSSL (barra sombreada) era intermedia en relación con la concentración en ratones deficientes en BSSL y ratones de tipo natural para BSSL. \* representa  $p < 0,05$ .

55 Figura 16. Respuesta de tipo II anti-colágeno (IgG) en plasma.

60 El análisis de los niveles de anticuerpo anti-CII en el día 33 y día 48 se presentó como valores relativos en comparación con un patrón de suero agrupado. No había diferencias significativas en la respuesta de IgG entre ninguno de los genotipos de BSSL.

Figura 17. Gravedad de la artritis tras inyecciones de anticuerpos anti-BSSL en comparación con el control.

65 Las ratas a las que se les inyectaron o bien 1 mg/kg o bien 5 mg/kg de anticuerpos anti-BSSL mostraron una gravedad de la enfermedad significativamente disminuida. \* representa  $p < 0,05$  y \*\* representa  $p < 0,01$ . La incidencia era del 100% para todos los grupos.

### Descripción detallada de la invención

La presente invención se basa en el descubrimiento de que BSSL tiene un papel en procesos inflamatorios y que la inhibición o eliminación de BSSL protege frente al desarrollo de artritis crónica en modelos animales. Se demuestra que la proteína BSSL está presente en células inflamatorias y tejido inflamado. Ratones deficientes en BSSL (BSSL-KO) desarrollaron artritis inducida por colágeno (CIA) con gravedad de la enfermedad significativamente reducida y menos incidencia en comparación con controles de tipo natural. La inyección de anticuerpos anti-BSSL redujo significativamente la gravedad de la enfermedad de la artritis inducida por pristano en ratas.

La invención proporciona antagonistas de BSSL para la prevención y/o el tratamiento de artritis reumatoide. Preferiblemente, el antagonista de BSSL puede ser un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo que se une específicamente a BSSL humana, o una molécula de iARN o un polinucleótido antisentido que comprende una secuencia complementaria a una parte de una secuencia de polinucleótido que codifica para BSSL humana.

#### Anticuerpos

El término "anticuerpo o fragmento de anticuerpo" tal como se le hace referencia en el presente documento incluye anticuerpos completos y cualquier fragmento de unión a antígeno denominado "parte de unión a antígeno" o cadenas sencillas del mismo.

Un "anticuerpo" se refiere a una glicoproteína que comprende al menos dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) interconectadas por enlaces disulfuro, o una parte de unión a antígeno de la misma. Cada cadena pesada se compone de una región variable de cadena pesada (abreviada en el presente documento como  $V_H$ ) y una región constante de cadena pesada. La región constante de cadena pesada se compone de tres dominios,  $C_{H1}$ ,  $C_{H2}$  y  $C_{H3}$ . Cada cadena ligera se compone de una región variable de cadena ligera (abreviada en el presente documento como  $V_L$ ) y una región constante de cadena ligera. La región constante de cadena ligera se compone de un dominio,  $C_L$ . Las regiones  $V_H$  y  $V_L$  pueden subdividirse además en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que están más conservadas, denominadas regiones de entramado (FR). Cada  $V_H$  y  $V_L$  se compone de tres CDR y cuatro FR, dispuestas de extremo amino-terminal carboxilo-terminal en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Las regiones variables de las cadenas pesada y ligera contienen un dominio de unión que interacciona con un antígeno. Las regiones constantes de los anticuerpos pueden mediar en la unión de la inmunoglobulina a factores o tejidos del huésped, incluyendo diversas células del sistema inmunitario (por ejemplo, células efectoras) y el primer componente ( $C1q$ ) del sistema del complemento clásico.

El término "parte de unión a antígeno", tal como se usa en el presente documento, se refiere a uno o más fragmentos de un anticuerpo que conservan la capacidad para unirse específicamente a un antígeno (por ejemplo BSSL). Se ha mostrado que la función de unión a antígeno de un anticuerpo pueden realizarla fragmentos de un anticuerpo de longitud completa. Los ejemplos de fragmentos de unión englobados dentro del término "parte de unión a antígeno" de un anticuerpo incluyen (i) un fragmento Fab, un fragmento monovalente que consiste en los dominios  $V_L$ ,  $V_H$ ,  $C_L$  y  $C_{H1}$ ; (ii) un fragmento  $F(ab')_2$ , un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos por un puente disulfuro en la región de bisagra; (iii) un fragmento Fab', que es esencialmente un Fab con parte de la región de bisagra; (iv) un fragmento Fd que consiste en los dominios  $V_H$  y  $C_{H1}$ ; (v) un fragmento Fv que consiste en los dominios  $V_L$  y  $V_H$  de un único brazo de un anticuerpo, (vi) un fragmento dAb (Ward *et al.* 1989) que consiste en un dominio  $V_H$ ; (vii) una región determinante de complementariedad aislada (CDR); y (viii) un nanocuerpo, una región variable de cadena pesada que contiene un único dominio variable y dos dominios constantes. Además, aunque los dos dominios del fragmento Fv,  $V_L$  y  $V_H$ , están codificados por genes separados, pueden unirse usando métodos recombinantes, mediante un ligador sintético que permite que se produzcan como una única cadena de proteína en las que los pares de regiones  $V_L$  y  $V_H$  forman moléculas monovalentes (conocidas como Fv de cadena sencilla (scFv); véase por ejemplo, Bird *et al.* (1988). Tales anticuerpos monocatenarios pretenden englobarse dentro del término "parte de unión a antígeno" de un anticuerpo. Estos fragmentos de anticuerpo se obtienen usando técnicas convencionales conocidas por los expertos en la técnica, y los fragmentos se examinan para determinar su utilidad de la misma manera que los anticuerpos intactos.

Un "anticuerpo aislado", tal como se usa en el presente documento, pretende referirse a un anticuerpo que está sustancialmente libre de otros anticuerpos que tienen especificidades antigénicas diferentes (por ejemplo, un anticuerpo aislado que se une específicamente a BSSL está sustancialmente libre de anticuerpos que se unen específicamente a antígenos distintos de BSSL). Sin embargo, un anticuerpo aislado que se une específicamente a BSSL puede tener reactividad cruzada con otros antígenos, tales como moléculas de BSSL de otras especies. Además, un anticuerpo aislado puede estar sustancialmente libre de otro material celular y/o productos químicos.

Los términos "anticuerpo monoclonal" o "composición de anticuerpo monoclonal" tal como se usan en el presente documento se refieren a una preparación de moléculas de anticuerpo de una única composición molecular. Una composición de anticuerpo monoclonal presenta una única especificidad de unión y afinidad por un epítipo particular.

El término “anticuerpo humano”, tal como se usa en el presente documento, pretende incluir anticuerpos que tienen regiones variables en las que las regiones de entramado y CDR se derivan de las secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana. Además, si el anticuerpo contiene una región constante, la región constante también se deriva de secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana. Los anticuerpos humanos de la invención pueden incluir residuos de aminoácido no codificados por secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana (por ejemplo, mutaciones introducidas mediante mutagénesis específica de sitio o al azar *in vitro* o mediante mutación somática *in vivo*). Sin embargo, el término “anticuerpo humano”, tal como se usa en el presente documento, no pretende incluir anticuerpos en los que las secuencias de CDR derivadas de la línea germinal de otra especie de mamífero, tal como un ratón, se han injertado en secuencias de entramado humanas.

El término “anticuerpo monoclonal humano” se refiere a anticuerpos que presentan una única especificidad de unión que tienen regiones variables en los que tanto las regiones de entramado como CDR se derivan de secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana. En una realización, los anticuerpos monoclonales humanos se producen por un hibridoma que incluye una célula B obtenida de un animal no humano transgénico, por ejemplo, un ratón transgénico, que tiene un genoma que comprende un transgén de cadena pesada humana y un transgén de cadena ligera fusionada a una célula inmortalizada.

El término “anticuerpo humano recombinante”, tal como se usa en el presente documento, incluye todos los anticuerpos humanos que se preparan, expresan, crean o aíslan por medios recombinantes, tales como (a) anticuerpos aislados de un animal (por ejemplo, un ratón) que es transgénico o transcromosómico para genes de inmunoglobulina humana o un hibridoma preparado a partir del mismo (descrito adicionalmente a continuación), (b) anticuerpos aislados de una célula huésped transformada para expresar el anticuerpo humano, por ejemplo, a partir de un transfectoma, (c) anticuerpos aislados de una biblioteca de anticuerpos combinatoria, recombinante, y (d) anticuerpos preparados, expresados, creados o aislados mediante cualquier otro medio que implique corte y empalme de secuencias génicas de inmunoglobulinas humanas a otras secuencias de ADN. Tales anticuerpos humanos recombinantes tienen regiones variables en las que las regiones de entramado y CDR se derivan de secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana. Sin embargo, en determinadas realizaciones tales anticuerpos humanos recombinantes pueden someterse a mutagénesis *in vitro* (o, cuando se usa un animal transgénico para secuencias de Ig humanas, mutagénesis somática *in vivo*) y por tanto las secuencias de aminoácidos de las regiones  $V_H$  y  $V_L$  de los anticuerpos recombinantes son secuencias que, aunque derivadas de y relacionadas con secuencias de  $V_H$  y  $V_L$  de línea germinal humana, pueden no existir de manera natural dentro del repertorio de la línea germinal de anticuerpos humanos *in vivo*.

Tal como se usa en el presente documento, “isotipo” se refiere a la clase de anticuerpo (por ejemplo, IgM o IgG1) que está codificada por los genes de región constante de cadena pesada.

Las frases “un anticuerpo que reconoce un antígeno” y “un anticuerpo específico para un antígeno” se usan de manera intercambiable en el presente documento con el término “un anticuerpo que se une específicamente a un antígeno”.

El término “derivados de anticuerpos humanos” se refiere a cualquier forma modificada del anticuerpo humano, por ejemplo, un conjugado del anticuerpo y otro agente o anticuerpo.

El término “anticuerpo humanizado” pretende referirse a anticuerpos los que las secuencias de CDR derivadas de la línea germinal de otra especie de mamífero, tal como un ratón, se han injertado en las secuencias de entramado humanas. Pueden hacerse modificaciones en regiones de entramado adicionales dentro de las secuencias de región de entramado humanas.

El término “anticuerpo quimérico” pretende referirse a anticuerpos en los que las secuencias de región variable se derivan de una especie y las secuencias de región constante se derivan de otra especie, tales como un anticuerpo en el que las secuencias de región variable se derivan de un anticuerpo de ratón y las secuencias de región constante se derivan de un anticuerpo humano.

Tal como se usa en el presente documento, un anticuerpo que “se une específicamente a BSSL humana” pretende referirse a un anticuerpo que se une a BSSL humana con una  $K_D$  de  $1 \times 10^{-7}$  M o menos, más preferiblemente  $5 \times 10^{-8}$  M o menos, más preferiblemente  $3 \times 10^{-8}$  M o menos, más preferiblemente  $1 \times 10^{-8}$  M o menos, incluso más preferiblemente  $5 \times 10^{-9}$  M o menos. El término “no se une sustancialmente” a una proteína o células, tal como se usa en el presente documento, significa que no se une o no se une con una alta afinidad a la proteína o las células, es decir se une a la proteína o las células con una  $K_D$  de  $1 \times 10^{-6}$  M o más, más preferiblemente  $1 \times 10^{-5}$  M o más, más preferiblemente  $1 \times 10^{-4}$  M o más, más preferiblemente  $1 \times 10^{-3}$  M o más, incluso más preferiblemente  $1 \times 10^{-2}$  M o más.

El término “ $K_{asoc.}$ ” o “ $K_a$ ”, tal como se usa en el presente documento, pretende referirse a la velocidad de asociación de una interacción anticuerpo-antígeno particular, mientras que el término “ $K_{dis.}$ ” o “ $K_d$ ”, tal como se usa en el presente documento, pretende referirse a la velocidad de disociación de una interacción anticuerpo-antígeno

particular. El término “ $K_D$ ”, tal como se usa en el presente documento, pretende referirse a la constante de disociación, que se obtiene a partir de la razón de  $K_D$  con respecto a  $K_a$  (es decir,  $K_D/K_a$ ) y se expresa como una concentración molar (M). Los valores de  $K_D$  para anticuerpos pueden determinarse usando métodos bien establecidos en la técnica. Un método preferido para determinar la  $K_D$  de un anticuerpo es usando resonancia de plasmón superficial, preferiblemente usando un sistema de biosensor tal como un sistema Biacore®.

Tal como se usa en el presente documento, el término “alta afinidad” por un anticuerpo IgG se refiere a un anticuerpo que tiene una  $K_D$  de  $1 \times 10^{-7}$  M o menos, más preferiblemente  $5 \times 10^{-8}$  M o menos, incluso más preferiblemente  $1 \times 10^{-8}$  M o menos, incluso más preferiblemente  $5 \times 10^{-9}$  M o menos e incluso más preferiblemente  $1 \times 10^{-9}$  M o menos por un antígeno diana. Sin embargo, la unión de “alta afinidad” puede variar para otros isotipos de anticuerpo. Por ejemplo, la unión de “alta afinidad” para un isotipo de IgM se refiere a un anticuerpo que tiene una  $K_D$  de  $10^{-6}$  M o menos, más preferiblemente  $10^{-7}$  M o menos, incluso más preferiblemente  $10^{-8}$  M o menos.

Tal como se usa en el presente documento, el término “sujeto” incluye cualquier sujeto humano o no animal. El término “animal no humano” incluye todos los vertebrados, por ejemplo, mamíferos y no mamíferos, tales como primates no humanos, ovejas, perros, gatos, caballos, vacas, pollos, anfibios, reptiles, etc.

#### Anticuerpos anti-BSSL

Los anticuerpos que van a usarse según la invención se caracterizan por características o propiedades funcionales particulares de los anticuerpos. Por ejemplo, los anticuerpos se unen específicamente a BSSL humana. Preferiblemente, los anticuerpos se unen a un epítipo que comprende una secuencia de aminoácidos presente en la secuencia de BSSL humana (SEQ ID NO: 2). Lo más preferiblemente los anticuerpos se unen a un epítipo presente en la secuencia de aminoácidos correspondiente a los aminoácidos 1 a 722 en SEQ ID NO: 2, incluso más preferiblemente los anticuerpos se unen a un epítipo presente en la parte N-terminal de BSSL, es decir un epítipo presente en la secuencia de aminoácidos correspondiente a los aminoácidos 1 a 500 en SEQ ID NO: 2.

Preferiblemente, el anticuerpo se une a BSSL humana con alta afinidad, por ejemplo con una  $K_D$  de  $1 \times 10^{-7}$  M o menos. Los anticuerpos anti-BSSL que van a usarse según la invención presentan preferiblemente una o más de las siguientes características:

(i) se unen a BSSL humana con una  $K_D$  de  $1 \times 10^{-7}$  M o menos;

(ii) bloquean la unión de BSSL a células que expresan CXCR4;

(iii) bloquean la agregación plaquetaria potenciada por BSSL;

(iv) bloquean la unión de BSSL al complejo CXCR4/SDF-1; (v) bloquean la migración de leucocitos inducida por SDF-1.

Preferiblemente, el anticuerpo se une a BSSL humana con una  $K_D$  de  $5 \times 10^{-8}$  M o menos, se une a BSSL humana con una  $K_D$  de  $2 \times 10^{-8}$  M o menos, se une a BSSL humana con una  $K_D$  de  $5 \times 10^{-9}$  M o menos, se une a BSSL humana con una  $K_D$  de  $4 \times 10^{-9}$  M o menos, se une a BSSL humana con una  $K_D$  de  $3 \times 10^{-9}$  M o menos, se une a BSSL humana con una  $K_D$  de  $2 \times 10^{-9}$  M o menos o se une a BSSL humana con una  $K_D$  de  $1 \times 10^{-9}$  M o menos.

El anticuerpo se une preferiblemente a un epítipo antigénico presente en BSSL humana, epítipo que no está presente en otras proteínas. El anticuerpo normalmente se une a BSSL humana pero no se une a otras proteínas, o se une a otras proteínas con una baja afinidad, tal como con una  $K_D$  de  $1 \times 10^{-6}$  M o más, preferiblemente  $1 \times 10^{-5}$  M o más, más preferiblemente  $1 \times 10^{-4}$  M o más, más preferiblemente  $1 \times 10^{-3}$  M o más, incluso más preferiblemente  $1 \times 10^{-2}$  M o más.

Se conocen en la técnica ensayos convencionales para evaluar la capacidad de unión de los anticuerpos hacia BSSL humana, incluyendo por ejemplo, ELISA, inmunotransferencias de tipo Western, RIA y análisis de citometría de flujo. La cinética de unión (por ejemplo, afinidad de unión) de los anticuerpos también puede evaluarse mediante ensayos convencionales conocidos en la técnica, tal como mediante el análisis con el sistema Biacore®.

#### Producción de anticuerpos monoclonales

Los anticuerpos monoclonales (AcM) que van a usarse según la presente invención pueden producirse mediante una variedad de técnicas, incluyendo metodología de anticuerpos monoclonales convencional por ejemplo, la técnica de hibridación de células somáticas convencional de Kohler y Milstein (1975). Aunque se prefieren los procedimientos de hibridación de células somáticas, en principio, pueden emplearse otras técnicas para producir anticuerpos monoclonales, por ejemplo, transformación viral u oncogénica de linfocitos B.

El sistema animal preferido para preparar hibridomas es el sistema murino. La producción de hibridomas en el ratón es un procedimiento muy bien establecido. Se conocen en la técnica protocolos y técnicas de inmunización para el

aislamiento de esplenocitos inmunizados para la fusión. También se conocen parejas de fusión (por ejemplo, células de mieloma murinas) y procedimientos de fusión.

Los anticuerpos quiméricos o humanizados que van a usarse según la presente invención pueden prepararse basándose en la secuencia de un anticuerpo monoclonal no humano preparado tal como se describió anteriormente. El ADN que codifica para las inmunoglobulinas de cadena pesada y ligera puede obtenerse a partir del hibridoma no humano de interés y modificarse por ingeniería genética para que contenga secuencias de inmunoglobulina no murinas (por ejemplo, humanas) usando técnicas de biología molecular convencionales. Por ejemplo, para crear un anticuerpo quimérico, pueden unirse regiones variables murinas a regiones constantes humanas usando métodos conocidos en la técnica (véase por ejemplo el documento US 4.816.567). Para crear un anticuerpo humanizado, pueden insertarse regiones CDR murinas en un entramado humano usando métodos conocidos en la técnica (véase por ejemplo el documento US 5.225.539).

En una realización preferida, los anticuerpos son anticuerpos monoclonales humanos. Tales anticuerpos monoclonales humanos dirigidos contra BSSL pueden generarse usando ratones transgénicos o transcromosómicos que portan partes del sistema inmunitario humano en vez del sistema de ratón. Estos ratones transgénicos y transcromosómicos incluyen ratones denominados en el presente documento HuMAb Mouse® y KM Mouse®, respectivamente, y se denominan colectivamente en el presente documento "ratones con Ig humana".

El HuMAb Mouse® (Medarex®, Inc.) contiene minilocus de genes de inmunoglobulinas humanas que codifican para secuencias de inmunoglobulina de cadena ligera  $\kappa$  y pesada humana no transpuestas ( $\mu$  y  $\gamma$ ), junto con mutaciones seleccionadas como diana que inactivan los locus de cadena  $\mu$  y  $\kappa$  endógenas (véase por ejemplo, Lonberg *et al.* 1994). Por consiguiente, los ratones presentan expresión reducida de IgM o  $\kappa$  de ratón, y en respuesta a la inmunización, los transgenes de cadena pesada y ligera humana introducidos experimentan cambio de clase y mutación somática para generar anticuerpos monoclonales IgG $\kappa$  humanos de alta afinidad (Lonberg y Huszar 1995). Véanse además los documentos US 5.545.806; y US 5.770.429; US 5.545.807; WO 92/03918, WO 93/12227, WO 94/25585, WO 97/13852, WO 98/24884, WO 99/45962 y WO 01/14424.

En otra realización, los anticuerpos humanos que van a usarse según la invención pueden generarse usando un ratón que porta secuencias de inmunoglobulinas humanas en transgenes y transcromosomas, tal como un ratón que porta un transgén de cadena pesada humana y un transcromosoma de cadena ligera humana. Este ratón se denomina en el presente documento "KM mouse®", se describen en detalle en el documento WO 02/43478.

Todavía adicionalmente, están disponibles en la técnica sistemas de animales transgénicos alternativos que expresan genes de inmunoglobulinas humanas y pueden usarse para generar anticuerpos anti-BSSL que van a usarse según la invención. Por ejemplo, puede usarse un sistema transgénico alternativo denominado Xenomouse (Abgenix, Inc.); tales ratones se describen en, por ejemplo, los documentos US 5.939.598; US 6.075.181; US 6.114.598; US 6.150.584 y US 6.162.963. Además, están disponibles en la técnica sistemas de animales transcromosómicos alternativos que expresan genes de inmunoglobulinas humanas y pueden usarse para generar anticuerpos anti-BSSL. Por ejemplo, pueden usarse ratones que portan tanto un transcromosoma de cadena pesada humana como un transcromosoma de cadena ligera humana, denominados "ratones TC"; tales ratones se describen en Tomizuka *et al.* (2000). Además, se han descrito en la bibliografía vacas que portan transcromosomas de cadena pesada y ligera humana (Kuroiwa *et al.* 2002) y pueden usarse para generar anticuerpos anti-BSSL.

Los anticuerpos monoclonales humanos que pueden usarse según la invención también pueden prepararse usando métodos de presentación en fago para examinar bibliotecas de genes de inmunoglobulinas humanas. Tales métodos de presentación en fago para aislar anticuerpos humanos se establecen en la técnica. Véanse por ejemplo los documentos: US 5.223.409; US 5.403.484; US 5.571.698; US 5.427.908; US 5.580.717; US 5.969.108; US 6.172.197; US 5.885.793; US 6.521.404; US 6.544.731; US 6.555.313; US 6.582.915 y US 6.593.081.

También pueden prepararse anticuerpos monoclonales humanos usando ratones SCID en los que se han reconstituido células inmunitarias humanas de manera que puede generarse una respuesta de anticuerpos humanos tras la inmunización. Tales ratones se describen en, por ejemplo, los documentos US 5.476.996 y US 5.698.767.

#### iARN

Las moléculas de iARN que pueden usarse según la invención comprenden secuencias de nucleótidos complementarias a una parte de una secuencia de polinucleótido seleccionada de,

- a) la secuencia SEQ ID NO: 1,
- b) una variante de SEQ ID NO: 1 que tiene una identidad de secuencia de al menos el 80%, preferiblemente al menos el 90%, tal como al menos el 95% con SEQ ID NO: 1, y/o
- c) una secuencia complementaria a las secuencias a) y b).

Tales moléculas de iARN son posibles antagonistas de BSSL.

Antisentido

5 Las secuencias de polinucleótidos antisentido que pueden usarse según la invención comprenden secuencias de nucleótidos complementarias a una parte de una secuencia de polinucleótido seleccionada de,

a) la secuencia SEQ ID NO: 1,

10 b) una variante de SEQ ID NO: 1 que tiene una identidad de secuencia de al menos el 80%, preferiblemente al menos el 90%, tal como al menos el 95%, con SEQ ID NO: 1, y/o

c) una secuencia complementaria a las secuencias a) y b).

15 Tales secuencias de polinucleótidos antisentido son posibles antagonistas de BSSL.

El porcentaje de identidad de secuencia entre dos secuencias de ácido nucleico es el número de posiciones en la secuencia en las que el nucleótido es idéntico, teniendo en cuenta el número de huecos y la longitud de cada hueco, que es necesario introducir para una alineación óptima de las dos secuencias.

20 El porcentaje de identidad entre dos secuencias de polinucleótido se determina tal como sigue. En primer lugar, se compara una secuencia de ácido polinucleótido con, por ejemplo, SEQ ID NO: 1 usando el programa BLAST 2 Sequences (B12seq) de la versión independiente de BLASTZ que contiene BLASTN versión 2.0.14 y BLASTP versión 2.0.14. Esta versión independiente de BLASTZ puede obtenerse del sitio web del National Center for Biotechnology Information del gobierno de los Estados Unidos en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>. Pueden encontrarse instrucciones que explican cómo usar el programa B12seq en el archivo léame que acompaña a BLASTZ. B12seq realiza una comparación entre dos secuencias de polinucleótido usando el algoritmo BLASTN. Para comparar dos secuencias de polinucleótido, las opciones de B12seq se fijan tal como sigue: -i se fija a un archivo que contiene la primera secuencia de polinucleótido que va a compararse (por ejemplo, C:\seq1.txt); -j se fija a un archivo que contiene la segunda secuencia de polinucleótido que va a compararse (por ejemplo, C:\seq2.txt); -p se fija a blastn; -o se fija a cualquier nombre de archivo deseado (por ejemplo, C:\output.txt); y todas las otras opciones se dejan en sus parámetros por defecto. Por ejemplo, puede usarse el siguiente comando para generar un archivo de salida que contiene una comparación entre dos secuencias de polinucleótido: C:\B12seq -i c:\seq1.txt -j c:\seq2.txt -p blastn -o c:\output.txt. Si las dos secuencias comparadas comparten similitud de secuencia, entonces el archivo de salida designado presentará las regiones de similitud como secuencias alineadas. Si las dos secuencias comparadas no comparten similitud de secuencia, entonces el archivo de salida designado no presentará secuencias alineadas. Una vez alineadas, se determina el número de coincidencias contando el número de posiciones en las que está presente un residuo de nucleótido idéntico en ambas secuencias.

40 El porcentaje de identidad se determina dividiendo el número de coincidencias entre la longitud de la secuencia expuesta en una secuencia identificada seguido por la multiplicación del valor resultante por 100. Por ejemplo, si una secuencia de polinucleótido de una longitud de 120 nucleótidos se compara con la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 1 y las secuencias una vez alineadas tal como se describió anteriormente comparten una secuencia en la que el número de coincidencias es de 114, entonces la secuencia tiene un porcentaje de identidad del 95% (es decir,  $114 \div 4 \cdot 120 \cdot 100 = 95$ ) con la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 1.

BSSL

50 En resumen, puede aislarse BSSL a partir de un tejido adecuado tal como leche. Alternativamente puede producirse BSSL recombinante usando métodos convencionales a través del aislamiento de ADN que codifica para BSSL.

55 El ADN que codifica para BSSL puede aislarse convenientemente a partir de ARN, bibliotecas de ADNc, ADN genómico o bibliotecas de ADN genómico disponibles comercialmente usando técnicas de biología molecular convencionales tales como examen de bibliotecas y/o reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Estas técnicas se detallan extensamente en Molecular Cloning - A Laboratory Manual, 2ª edición, Sambrook, Fritsch & Maniatis, Cold Spring Harbor Press.

60 La secuencia de aminoácidos de BSSL humana puede obtenerse de la base de datos SwissProt, n.º de registro P19835 (CEL\_HUMAN) (SEQ ID NO: 2) y la secuencia de ADNc por ejemplo de la base de datos EMBL n.º de registro X54457 (SEQ ID NO: 1).

65 Los ADNc resultantes que codifican para BSSL se clonan entonces en vectores de expresión de mamíferos disponibles comercialmente tales como el pcDNA3 (Invitrogen), pMCIneo (Stratagene), pXT1 (Stratagene), pSG5 (Stratagene), EBO-pSV2-neo (ATCC 37593), pBPV-1(8-2) (ATCC 37110), pdBPV-MMTneo(342-12) (ATCC 37224), pRSVgpt (ATCC 37199), pRSVneo (ATCC 37198), pSV2-dhfr (ATCC 37146), pUCtag (ATCC 37460), 1ZD35 (ATCC 37565), pLXIN, pSIR (Clontech) y pIRES-EGFP (Clontech). Se usan tecnologías de transfección convencionales

para introducir los vectores de expresión resultantes en líneas celulares de mamíferos, cultivadas comúnmente disponibles tales como células L L-M(TK-) (ATCC CCL 1.3), células L L-M (ATCC CCL 1.2), THP-1 (ATCC TIB 202), HEK 293 (ATCC CRL 1573), Raji (ATCC CCL 86), CV-1 (ATCC CCL 70), COS-1 (ATCC CRL 1650), COS-7 (ATCC CRL 1651), CHO-K1 (ATCC CCL 61), 3T3 (ATCC CCL 92), NIH/3T3 (ATCC CRL 1658), HeLa (ATCC CCL 2), C1271 (ATCC CRL 1616), BS-C-1 (ATCC CCL 26) y MRC-5 (ATCC CCL 171). Se aíslan CHO, HEK293, HeLa y derivados clonales que expresan la CEL. Estas líneas celulares transfectadas se usan para producir CEL recombinante.

Alternativamente los ADNc que codifican para BSSL se clonan en vectores de expresión comúnmente disponibles para la expresión en microorganismos, tales como vectores de expresión bacterianos tales como el pET (Invitrogen), pDEST (Invitrogen), pLEX (Invitrogen), pCAL (Stratagene); y los vectores de expresión de levaduras pYES (Invitrogen), pESC (Stratagene) para la expresión en *Saccharomyces* y pPICZ (Invitrogen) para la expresión en *Pichia*. Se usan tecnologías de transfección convencionales para introducir los vectores de expresión resultantes en cepas comúnmente disponibles de microorganismos, tales como las cepas de *E. coli* JM101 (Stratagene) y JM110 (Stratagene).

Se conocen en la técnica métodos para la purificación de BSSL a partir de diferentes tejidos y líneas celulares transfectadas (Lombardo *et al.* 1978; Bläckberg y Hemell 1981; Wang y Johnson 1983; Hansson *et al.* 1993).

### Formulación y administración

El anticuerpo y los fragmentos de anticuerpo, moléculas de iARN y polinucleótidos antisentido que van a usarse según esta invención pueden administrarse de manera convencional para el estado que se desea tratar, por ejemplo mediante administración oral, tópica, parenteral, bucal, nasal o rectal o mediante inhalación. Para estos fines los anticuerpos y fragmentos de anticuerpo, moléculas de iARN y polinucleótidos antisentido pueden formularse por medios conocidos en la técnica en forma de, por ejemplo, comprimidos, cápsulas, disoluciones, suspensiones acuosas u oleosas, emulsiones, cremas, pomadas, geles, pulverizaciones nasales, supositorios, polvos finamente divididos o aerosoles para inhalación, y para uso parenteral (incluyendo intravenoso, intramuscular o infusión) disoluciones o suspensiones acuosas u oleosas estériles o emulsiones estériles.

Las composiciones farmacéuticas de la invención también pueden administrarse en terapia de combinación, es decir, combinados con otros agentes. Por ejemplo, la terapia de combinación puede incluir un anticuerpo anti-BSSL combinado con al menos otro agente antiinflamatorio o inmunosupresor.

Tal como se usa en el presente documento, "portador farmacéuticamente aceptable" incluye todos y cada uno de disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardadores de la absorción, y similares que son fisiológicamente compatibles. Preferiblemente, el portador es adecuado para administración intravenosa, intramuscular, subcutánea, parenteral, espinal o epidérmica (por ejemplo, mediante inyección o infusión).

La composición farmacéutica de la invención puede incluir una o más sales farmacéuticamente aceptables. Una "sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a una sal que conserva la actividad biológica deseada del compuesto original y no confiere ningún efecto tóxico no deseado (véase por ejemplo Berge *et al.* 1977). Los ejemplos de tales sales incluyen sales de adición ácido y sales de adición de base. Las sales de adición de ácido incluyen las derivadas de ácidos inorgánicos no tóxicos, tales como clorhídrico, nítrico, fosfórico, sulfúrico, bromhídrico, yodhídrico, fosforoso y similares, así como de ácidos orgánicos no tóxicos tales como ácido mono- y dicarboxílicos alifáticos, ácidos alcanóicos sustituidos con fenilo, ácidos hidroxialcanóicos, ácidos aromáticos, ácidos sulfónicos alifáticos y aromáticos y similares. Las sales de adición de base incluyen las derivadas de metales alcalinotérreos, tales como sodio, potasio, magnesio, calcio y similares, así como de aminas orgánicas no tóxicas, tales como N,N'-dibenciletildiamina, N-metilglucamina, cloroprocaína, colina, dietanolamina, etilendiamina, procaína y similares.

Una composición farmacéutica de la invención también puede incluir un antioxidante farmacéuticamente aceptable. Los ejemplos de antioxidantes farmacéuticamente aceptables incluyen: (1) antioxidantes solubles en agua, tales como ácido ascórbico, clorhidrato de cisteína, bisulfato de sodio, metabisulfito de sodio, sulfito de sodio y similares; (2) antioxidantes solubles en aceite, tales como palmitato de ascorbilo, hidroxianisol butilado (BHA), hidroxitolueno butilado (BHT), lecitina, galato de propilo, alfa-tocoferol, y similares; y (3) agentes quelantes de metales, tales como ácido cítrico, ácido etilendiaminatetraacético (EDTA), sorbitol, ácido tartárico, ácido fosfórico, y similares.

Los ejemplos de portadores acuosos y no acuosos adecuados que pueden emplearse en las composiciones farmacéuticas de la invención incluyen agua, etanol, polioles (tales como glicerol, propilenglicol, polietilenglicol, y similares), y mezclas adecuadas de los mismos, aceites vegetales, tales como aceite de oliva, y ésteres orgánicos inyectables, tales como oleato de etilo. Puede mantenerse la fluidez apropiada, por ejemplo, mediante el uso de materiales de recubrimiento, tales como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersiones, y mediante el uso de tensioactivos.

Estas composiciones pueden contener también adyuvantes tales como conservantes, agentes humectantes,

agentes emulsionantes y agentes de dispersión. La prevención de la presencia de microorganismos puede garantizarse tanto mediante procedimientos de esterilización, como mediante la inclusión de diversos agentes antibacteriano y antifúngicos, por ejemplo, parabeno, clorobutanol, ácido fenolsorbico, y similares. También puede ser deseable incluir agentes isotónicos, tales como azúcares, cloruro de sodio, y similares en las composiciones. Además, puede ocasionarse la absorción prolongada de la forma farmacéutica inyectable mediante la inclusión de agentes que retardan la absorción tales como monoestearato de aluminio y gelatina.

Los portadores farmacéuticamente aceptables incluyen disoluciones o dispersiones acuosas estériles y polvos estériles para la preparación extemporánea de dispersiones o disoluciones inyectables estériles. El uso de tales medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas se conoce en la técnica.

Los regímenes de dosificación se ajustan para proporcionar la respuesta deseada óptima (por ejemplo, una respuesta terapéutica). Por ejemplo, puede administrarse un único bolo, pueden administrarse varias dosis divididas a lo largo del tiempo o la dosis puede reducirse o aumentarse proporcionalmente según indiquen las exigencias de la situación terapéutica. Es especialmente ventajoso formular composiciones parenterales en forma unitaria de dosificación para facilidad de administración y uniformidad de dosificación. Forma unitaria de dosificación tal como se usa en el presente documento se refiere a unidades físicamente diferenciadas como dosificaciones unitarias para los sujetos que van a tratarse; cada unidad contiene una cantidad predeterminada de compuesto activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el portador farmacéutico requerido. La especificación para las formas unitarias de dosificación de la invención vienen dictadas por y dependen directamente de (a) las características únicas del compuesto activo y el efecto terapéutico particular que ha de lograrse, y (b) las limitaciones inherentes en la técnica de composición de un compuesto activo de este tipo para el tratamiento de sensibilidad en individuos.

Para la administración del anticuerpo, la dosificación oscila entre aproximadamente 0,0001 y 100 mg/kg, y más habitualmente entre 0,01 y 5 mg/kg, del peso corporal del individuo. Por ejemplo las dosificaciones pueden ser de 0,3 mg/kg de peso corporal, 1 mg/kg de peso corporal, 3 mg/kg de peso corporal, 5 mg/kg de peso corporal o 10 mg/kg de peso corporal o dentro del intervalo de 1 - 10 mg/kg. Un régimen de tratamiento a modo de ejemplo supone la administración una vez a la semana, una vez cada dos semanas, una vez cada tres semanas, una vez cada cuatro semanas, mensualmente, una vez cada 3 meses o una vez cada de tres a 6 meses. Los regímenes de dosificación preferidos para un anticuerpo anti-BSSL según la invención incluyen 1 mg/kg de peso corporal o 3 mg/kg de peso corporal por medio de administración intravenosa o subcutánea, o administrándose el anticuerpo usando uno de los siguientes programas de dosificación: (i) cada cuatro semanas durante seis dosificaciones, luego cada tres meses; (ii) cada tres semanas; (iii) 3 mg/kg de peso corporal una vez seguido por 1 mg/kg de peso corporal cada tres semanas.

### **Ejemplos**

#### *Ejemplo 1. BSSL aparece en el hígado y se localiza con granulocitos en un estado de esteatosis hepática*

Se sometió a prueba la hipótesis de que el hígado podría ser una fuente de BSSL circulante.

#### Sujetos y adquisición de muestras

Se obtuvieron biopsias de hígado humano de cuatro pacientes durante la cirugía abdominal de elección para carcinoma. Se tomaron biopsias del tejido hepático alejadas más de un centímetro del sitio del tumor. El paciente 1 era un hombre de 62 años de edad que se sometió a cirugía para metástasis hepática de cáncer de colon; el paciente 2 era una mujer de 73 años de edad que se sometió a cirugía para metástasis hepática de cáncer rectal; el paciente 3 era una mujer de 60 años de edad que se sometió a cirugía para metástasis hepática de cáncer de colon, y el paciente 4 era una mujer de 63 años de edad que se sometió a cirugía para carcinoma colangiocelular. Todos los pacientes recibieron anestesia general.

Se aislaron granulocitos polimorfonucleares y células mononucleares de muestras de sangre completa de voluntarios sanos usando Polimorphprep™ (Axis-Shield PoC AS, Oslo, Noruega), según las directrices del fabricante.

Los protocolos experimentales se aprobaron por el Comité Ético de la Facultad de Medicina de la Universidad de Umeå, Suecia. Se obtuvo el consentimiento informado de todos los participantes.

#### Aislamiento de ARN, síntesis de ADNc, amplificación por RT-PCR y secuenciación

Se sumergieron inmediatamente muestras de hígado recientes para el aislamiento del ARN en reactivo TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE.UU.) y se aisló el ARN total según las instrucciones del fabricante. Se suspendieron células sanguíneas humanas aisladas (granulocitos polimorfonucleares y células mononucleares) en disolución RNAlater (Ambion, Austin, TX, EE.UU.) y se incubaron a 8°C durante la noche. Se sedimentaron las células, se resuspendieron en TRIzol y se aisló el ARN total según las instrucciones del fabricante. Se cuantificó el rendimiento

de ARN espectrofotométricamente usando un instrumento NanoDrop ND100 (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, EE.UU.) y se evaluó la integridad del ARN mediante tinción con bromuro de etidio de bandas de ARN ribosómico separadas en un gel de agarosa al 1%. Se almacenaron las muestras de ARN a -70°C hasta su uso.

- 5 Se generó ADNc a partir de 1 µg de ARN total usando hexámeros al azar y reactivos de transcripción inversa TaqMan en un volumen de 100 µl (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE.UU.).

Se realizó la PCR usando ADN polimerasa AmpliTaq Gold (Applied Biosystems) según las recomendaciones del fabricante. Se amplificó un microlitro de ADNc en un volumen total de 20 µl. Las secuencias de los cebadores eran las siguientes: cebador directo (BSSL10) 5'-TCCCGGGACCTGCCCGTTAT-5'(SEQ ID NO: 3); cebador inverso (BSSL 11) 5'-CTGCAGAGAGACGCTGGCAC-3' (SEQ ID NO: 4). Las condiciones de PCR fueron las siguientes: 95°C durante 5 min seguido por 40 ciclos de 94°C durante 45 s, 60°C durante 1 min, 72°C durante 1 min, y una extensión final a 72°C durante 8 min. Si estaba presente la secuencia diana, se esperaba que al reacción PCR produjera un producto de 327 pb, que englobaba los exones 4 y 5 de BSSL. Se realizó la secuenciación directa de los fragmentos de PCR usando el kit de secuenciación de ciclo Big Dye Terminator v3.1 (Applied Biosystems) según las recomendaciones del fabricante. Se usó BSSL 10 o BSSL 11 (descrito anteriormente) como cebador. Se analizaron las reacciones usando un analizador de ADN ABI 3730XL (Applied Biosystems).

#### Extracción de proteínas y análisis de inmunotransferencia de tipo Western

20 Se homogeneizaron trozos de tejido hepático (aproximadamente 100-200 mg) obtenidos de los pacientes 2, 3 y 4 o células sanguíneas (granulocitos polinucleares o células mononucleares aisladas de 10 ml de sangre completa) en un tampón que contenía inhibidores de proteasa [NH<sub>3</sub> al 0,047%, Triton X-100 al 0,4%, dodecilsulfato de sodio al 0,08% (SDS) y 1 minicomprimido completo por 50 ml (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania)]. Se centrifugó el homogenado a 14.000 rpm durante 10 min y se recogió el sobrenadante y se aplicó a una columna HiTrap activada con NHS (GE Healthcare, Buckinghamshire, RU) acoplada con anticuerpos policlonales anti-BSSL humana. Los anticuerpos frente a BSSL se generaron en conejos y se purificaron tal como se describió previamente (Hansson *et al.* 1993). Tras lavar con solución salina tamponada con fosfato (PBS) complementada con azida de sodio al 0,02% (NaN<sub>3</sub>) y ácido etilendiaminatetraacético al 0,01% (EDTA), se eluyó el material unido mediante un tampón que contenía glicina 0,1 M (pH 2,5), NaN<sub>3</sub> al 0,02%, y EDTA al 0,01%. Se realizaron todas las etapas a 4°C para minimizar el riesgo de proteólisis. Se separaron las proteínas eluidas en electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida al 10% (PAGE) y se transfirieron a membranas de poli(difluoruro de vinilideno) (PVDF) (Bio-Rad, Hercules, CA). Se llevó a cabo la inmunotransferencia de tipo Western usando el kit de detección de inmunotransferencia de tipo Western ECL Advance, siguiendo las recomendaciones del fabricante (GE Healthcare). Se usó un anticuerpo policlonal anti-BSSL humana (Hansson *et al.* 1993) como anticuerpo primario, y se usó un anticuerpo de asno anti-IgG de conejo conjugado con peroxidasa (DAKO, Glostrup, Dinamarca) como anticuerpo secundario. Se usaron BSSL aislada de leche humana (Bläckberg y Hernell 1981) y extractos proteicos de páncreas humano como controles positivos en la inmunotransferencia de tipo Western.

#### 40 Análisis histológico y tinción con aceite rojo O

Se fijaron muestras para la evaluación histológica en paraformaldehído al 4%, tampón fosfato 0,1 M (pH 7,0) durante la noche, se incrustaron en parafina, se cortaron con micrótopo y se tiñeron con hematoxilina y eosina. Para la tinción con aceite rojo O, se fijaron los tejidos durante 2 h a 4°C en paraformaldehído al 4%, tampón fosfato 0,1 M (pH 7,0) y se crioprotegieron mediante incubación durante la noche en una disolución de sacarosa al 30% en PBS a 4°C. Después de eso, se incrustaron las muestras en compuesto Tissue Tek OCT (Sakura Finetek Europe B.V., Zoeterwoude, Países Bajos), se congelaron en hielo seco y se almacenaron a -70°C hasta que se cortaron. Tras el análisis, se cortaron secciones de 8 µm de grosor usando un criostato y se montaron en portaobjetos SuperFrost Plus (Menzel-Gläser, Braunschweig, Alemania). Se tiñeron las secciones con disolución de tinción de aceite rojo O (aceite rojo O al 0,3% en alcohol isopropílico al 60%) durante 10 min a temperatura ambiente y luego se lavaron con alcohol isopropílico al 60%.

#### Inmunohistoquímica y tinción inmunofluorescente

55 Las muestras de tejido se fijaron, se incrustaron y se criocortaron tal como se describió anteriormente para la tinción con aceite rojo O. Se aplicaron células sanguíneas aisladas en una gota de 10 µl sobre los portaobjetos SuperFrost Plus (Menzel-Gläser) y se dejó que se asentara durante 1 h a temperatura ambiente en una cámara humidificada. Se lavaron las células en 3x PBS (2 min) y 1x PBS (2 x 2 min) y se fijaron en paraformaldehído al 4%, tampón fosfato 0,1 M (pH 7,0) durante 20 min a temperatura ambiente.

60 Para la inmunohistoquímica de tinción individual, se lavaron las secciones secadas al aire en solución salina tamponada con Tris (TBS; Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, NaCl 150 mM) durante 3 x 5 min. Se bloqueó la actividad peroxidasa endógena mediante 20 min de incubación en una disolución de metanol al 80% con peróxido de hidrógeno al 0,6% (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Tras enjuagar posteriormente en TBS seguido por TBS-T (TBS complementado con Triton X-100 al 0,1%), se incubaron las secciones con suero de caballo normal al 10% (NHS) en TBS-T durante 1 h. Se

aplicó el primer anticuerpo (de conejo anti-BSSL, diluido 1:1000 en TBS-T + NHS al 10%) y se incubó durante 2 h. Tras lavar en TBS-T (3x5 min), se aplicó el anticuerpo secundario biotinilado [de cabra anti-conejo (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, EE.UU.), diluido 1:400 en TBS-T + NHS al 10%] y se incubó durante 1 h. Se lavaron las secciones en PBS (3x3 min) y se incubaron con reactivo Vectastain Elite ABC (Vector Laboratories Inc.) durante 1 h, se lavaron de nuevo en PBS (3x3 min) y se revelaron en disolución de diaminobencidina (DAB) [1 comprimido de DAB (10 mg) disuelto en 15 ml de PBS + 12 µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>]. Finalmente, se contratiñeron las secciones con hematoxilina de Mayer, se deshidrataron y se montaron en medio de montaje para microscopía DPX (Merck Sharp & Dohme, Suecia). Los controles negativos comprendían secciones incubadas con suero preinmunitario de conejo en vez del anticuerpo primario.

Para la tinción de inmunofluorescencia, las secciones de hígado o células sanguíneas aisladas secadas al aire, procesadas y montadas en portaobjetos SuperFrost Plus como anteriormente, se enjuagaron en PBS durante 10 min. Se bloqueó la actividad peroxidasa endógena mediante incubación en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 1% durante 10 min. Tras lavar en PBS (3x3 min), se incubaron las secciones o células con NHS al 10% en TBS-T durante 1 h. Se aplicaron anticuerpos primarios, diluidos en TBS-T + NHS al 10%, y se incubaron durante 2 h. Se lavaron las secciones o células en TBS-T (3x5 min). Se aplicaron anticuerpos secundarios (diluidos 1:1000 en TBS-T + NHS al 10%), y se incubaron las muestras durante 1 h. Se usó 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI; Molecular Probes) para la contratinción nuclear. Se lavaron las secciones o células en TBS-T (3x5 min) y se montaron con medio de fluorescencia Vectashield. Los controles negativos se componían de secciones o células incubadas con suero preinmunitario de conejo en vez del anticuerpo primario. Para la tinción de células no permeabilizadas, se reemplazó TBS-T por PBS en todas las etapas. Las reactividades principales de todos los anticuerpos primarios (aparte del anti-BSSL) se resumen en la tabla 1.

Tabla 1. Colocalización de marcadores de células inmunitarias y BSSL en hígado humano

Marcador	Reactividad principal	Dilución	Se colocaliza con BSSL
CD3	Timocitos, células T	1/100	-
CD11b	Células mieloides y NK	1/50	+
CD14	Células mielomonocíticas	1/100	-
CD15	Neutrófilos, eosinófilos, monocitos	1/50	+
CD19	Células B	1/50	-
CD45	Todas las células hematopoyéticas	1/100	+
CD56	Células NK	1/25	-
CD57	Células NK, subconjuntos de células T, células B y monocitos	1/100	-
CD68	Monocitos, macrófagos, neutrófilos, basófilos, linfocitos grandes	1/100	-
CD86	Monocitos, células B activadas, células dendríticas	1/50	-
HLA de clase II DR	Células presentadoras de antígeno (células B, monocitos, células dendríticas, células T, granulocitos)	1/50	-

Las fuentes y los clones fueron los siguientes: CD3, clon 289-13801 (Molecular Probes, Eugene, Oregón, EE.UU.); CD11b, clon 2LPM19C (DacoCytomation, Glostrup, Dinamarca); CD14, clon TÜK4 (DacoCytomation); CDR15, clon C3D-1 (DacoCytomation); CD19, clon HD37 (DacoCytomation); CD45, clon HI30 (BD Biosciences, San Jose, CA, EE.UU.); CD56, clon T199 (DacoCytomation); CD57, clon NC1 (Immunotech, Marsella, Francia); CD68, clon KP1 (DacoCytomation); CD86, clon FUN-1 (BD Biosciences); HLA clase II DR, clon CR3/43 (DacoCytomation). Los anticuerpos secundarios usados fueron anticuerpos de cabra anti-conejo Alexa fluor 488, anticuerpo de cabra anti-ratón Alexa fluor 488, anticuerpo de cabra anti-conejo Alexa fluor 594 y anticuerpo de cabra anti-ratón Alexa fluor 594 (Molecular Probes).

## Resultados

### BSSL se expresa en biopsias de hígado humano

Se extrajo ARN total por duplicado de biopsias de hígado humano recogidas de cuatro pacientes (n.<sup>os</sup> 1-4). El ARN se transcribió de manera inversa y se amplificó usando cebadores oligonucleotídicos específicos de BSSL diseñados para seleccionar como diana los exones 4-5. Se amplificó un producto de PCR correspondiente al tamaño esperado (327 nt) a partir de todas las muestras (figura 1). Se secuenciaron los fragmentos de PCR de 327 nt y se encontró que eran idénticos a la secuencia de ADNc de BSSL humana publicada (n.<sup>o</sup> de registro de EMBL X54457; datos no mostrados).

Se prepararon extractos proteicos a partir de biopsias hepáticas del paciente n.<sup>o</sup> 3 y n.<sup>o</sup> 4 y se aplicaron a una columna de anti-BSSL-sepharose. Tras lavar, se eluyó el material unido y se sometió a análisis de tipo Western. Se detectó una única proteína con una masa molecular correspondiente a la masa de BSSL de leche humana en ambas muestras (figura 2). La masa molecular de BSSL en el hígado era comparable a la de BSSL encontrada en leche humana pero ligeramente mayor que la masa de la BSSL encontrada en páncreas humano.

La inmunohistoquímica localiza BSSL en granulocitos polinucleares en hígado humano

5 La tinción con hematoxilina-eosina y aceite rojo O de secciones de hígado reveló que el paciente n.º 4 padecía esteatosis hepática extensa (figuras 3D y 3E). En contraposición al paciente n.º 1 (figuras 3A y B), toda la sección del paciente n.º 4 estaba abarrotada de vacuolas grandes llenas de lípidos. La inmunohistoquímica usando anticuerpos específicos de BSSL en secciones de hígado derivadas de los pacientes 1 y 4 confirmó la presencia de BSSL en hígado humano (figuras 3C y 3F). En las secciones del paciente n.º 4, las células con tinción positiva para BSSL parecían agruparse alrededor de gotitas de lípidos grandes (figura 3F), y el número de células positivas para BSSL era al menos 10 veces más alto en el paciente n.º 4 que en el paciente n.º 1. Además, las células con tinción positiva para BSSL en el paciente n.º 1 no se agrupaban sino que estaban dispersas uniformemente por toda la sección (figura 3C). Las células positivas para BSSL no se asemejaban a hepatocitos morfológicamente, sino que en su lugar se asemejaban a células estrelladas o células inmunitarias.

15 Para investigar qué tipo(s) de células expresaba(n) BSSL en hígado humano, se realizó tinción de inmunofluorescencia doble en secciones de tejido derivadas de los pacientes n.º 1 y n.º 4. No se encontró colocalización entre anticuerpos frente a BSSL y anticuerpos dirigidos hacia desmina o actina de músculo liso, dos antígenos presentes en células estrelladas (datos no mostrados). En cambio, los anticuerpos frente a BSSL se colocalizaban claramente con anticuerpos dirigidos hacia el antígeno común leucocitario CD45, confirmando que BSSL se localizaba en células inmunitarias (datos no mostrados). Para investigar adicionalmente qué células expresaban BSSL, se examinó si BSSL se colocalizaba con diferentes antígenos presentes en una variedad de células inmunitarias (tabla 1). Anticuerpos contra CD3, CD14, CD19, CD56, CD57, CD86 y HLA clase II DR no pudieron colocalizarse ninguno con anticuerpos frente a BSSL (datos no mostrados), como sí lo hicieron anticuerpos contra CD68 (figuras 4A y 4B). Sin embargo, anticuerpos anti-CD15 (presente en el 95% de los granulocitos maduros) y CD11b (presente en células mieloides y células NK) se colocalizaban claramente con células que expresaban BSSL (figuras 4A y 4B (CD15) y datos no mostrados (CD11b)). Estos datos mostraron que BSSL en hígado humano no se expresaba por hepatocitos u otras células específicas de hígado, ni por macrófagos tal como se propuso previamente, sino lo más probablemente por granulocitos.

30 BSSL se expresa por células sanguíneas circulantes

Los estudios de inmunofluorescencia revelaron que BSSL y CD15 se colocalizaban en leucocitos polimorfonucleares permeabilizados aislados de sangre humana completa (figura 5). En cambio, anticuerpos anti-BSSL no reaccionaban con células mononucleares positivas para CD14 (datos no mostrados). Por tanto, en la circulación, BSSL se expresaba por, o al menos estaba asociada con, granulocitos polimorfonucleares. Cuando se realizó la tinción de inmunofluorescencia en granulocitos permeabilizados y no permeabilizados, se producía tinción positiva para BSSL sólo en granulocitos permeabilizados (figura 6). En cambio, anticuerpos frente a CD15 teñían células tanto permeabilizadas como no permeabilizadas.

40 Se aislaron granulocitos polinucleares y células mononucleares por separado de sangre humana. Se generaron extractos proteicos a partir de cada población de células y se aplicaron a una columna de anti-BSSL-sepharose. Se resolvió el material unido y eluido mediante inmunoanálisis de tipo Western. Anticuerpos policlonal anti-BSSL detectaron una única proteína con una masa molecular correspondiente a la masa de BSSL de leche humana en tanto granulocitos polinucleares como células mononucleares (figura 7).

45 Se analizó el ARN total aislado de granulocitos polinucleares y células sanguíneas mononucleares para detectar la presencia de ARNm de BSSL mediante RT-PCR. Se generó un producto de PCR del tamaño esperado (327 nt) a partir de ambas fracciones de células (figura 8). La secuenciación directa de los fragmentos de PCR reveló una secuencia idéntica a la del ADNc de BSSL humana publicada (n.º de registro de EMBL X54457; datos no mostrados).

50 Ejemplo 2. BSSL está presente en placa aterosclerótica55 Análisis histológico e inmunohistoquímica

Se fijaron muestras de arteria carótida aterosclerótica humana en paraformaldehído al 4%, tampón fosfato 0,1 M (pH 7,0) durante la noche, se incrustaron en parafina y se cortaron con micrótopo. Se realizó la inmunohistoquímica tal como se describió anteriormente. Se usó un anticuerpo policlonal de conejo anti-BSSL humana (dirigido contra los aminoácidos 328-341) como anticuerpo primario en estos experimentos.

60 Resultados

65 Se confirmó la presencia de BSSL en placa aterosclerótica humana (figura 9). Tomados conjuntamente, los datos presentados anteriormente (ejemplos 1 y 2) sugieren que BSSL, además de ser una enzima clave en la digestión de la grasa de la dieta en las primeras etapas de la vida, también participa en procesos inflamatorios tales como esteatosis hepática y aterosclerosis.

Ejemplo 3. Ratones deficientes en BSSL están protegidos frente a la artritis inducida por colágeno (CIA)

Tras la demostración de que BSSL se produce por granulocitos y plaquetas y está presente en el sitio de inflamación (esteatosis hepática y placas ateroscleróticas), se sometió a prueba la hipótesis de que BSSL participa en diversos estados con inflamación como denominador común, por ejemplo artritis autoinmunitaria.

Para este fin se comparó la respuesta de ratones "knockout" deficientes en BSSL (BSSL-KO) con ratones de tipo natural en un modelo de artritis inducida por colágeno (CIA) (Courtenay *et al.* 1980). CIA es un modelo experimental comúnmente usado en ratones y ratas que reproduce muchos de los mecanismos patógenos de la artritis reumatoide (AR) humana, es decir aumento de la infiltración celular, hiperplasia sinovial, formación de paño y erosión de cartílago y hueso en las articulaciones distales.

Diseño del estudio

Se inmunizaron ratones BSSL-KO y BSSL-WT con colágeno tipo II (CII) en adyuvante completo de Freund (CFA) en el día 0 y se reforzaron con colágeno tipo II (CII) en adyuvante incompleto de Freund (IFA) en el día 21, según el protocolo convencional. Se siguió la gravedad de la enfermedad durante 57 días. Se tomó sangre en el día 30 y al final del experimento (día 57).

Ratones

Para obtener la susceptibilidad a CIA, conferida por el haplotipo MHC A<sup>q</sup>, se cruzaron ratones BSSL-KO de antecedentes C57BL/6 (regalo del Dr. J. Breslow, Rockefeller University, Nueva York) con los antecedentes C57BL/10Q para la generación uno (F1). Entonces se entrecruzaron ratones heterocigotos para BSSL para generar compañeros de camada BSSL-KO y BSSL-WT, que portaban todos el alelo MHC A<sup>q</sup>. Se emplearon estos compañeros de camada para el experimento.

Procedimientos

Se usaron 33 machos y 32 hembras de la generación F1 de entrecruzamiento. Se criaron los ratones y se mantuvieron en ciclos de luz/oscuridad de 12 h, en jaulas de poliestireno que contenían virutas de madera y se alimentaron con dieta para roedores convencional y agua a voluntad en la instalación para animales de la Universidad de Umeå. Todos los ratones incluidos eran o bien homocigotos (n=26) o bien heterocigotos (n=39) para el haplotipo MHC A<sup>q</sup> permitiendo la receptividad a CII (Wooley *et al.* 1981). En total se incluyeron 37 ratones deficientes en BSSL (ko) y 28 compañeros de camada de tipo natural (wt) en el experimento.

Se inmunizaron los ratones con 100 µg de CII de rata en CFA, volumen total de 50 µl en la base de la cola en el día 0. Se preparó el emulgado en jeringas usando un conector (negro) y se mantuvo en hielo hasta su uso. Se realizó una inyección de refuerzo en el día 21 con 50 µg de CII de rata en IFA (volumen total de 50 µl). Se realizó la puntuación clínica ciega de CIA usando un sistema basado en el número de articulaciones inflamadas en cada ratón. Se definió la inflamación mediante la hinchazón y el enrojecimiento de las articulaciones. Se tomó sangre mediante sangrado en la mejilla en el día 30 y al final del experimento (día 57). Se tomó la sangre en tubos heparinizados y se centrifugó para separar plasma (4.000 rpm, 10 min). Se almacenó el plasma a -20°C hasta que se sometió a ensayo.

Se determinó la concentración en plasma de proteína oligomérica de matriz de cartílago (COMP) mediante un ELISA de competición según un método descrito anteriormente (Saxne *et al.* 1992). En resumen, se usó COMP de rata para el recubrimiento de las placas de microtitulación y para preparar la curva patrón incluida en cada placa. Se bloquearon las placas con albúmina sérica bovina al 1% (BSA) en PBS durante 2 horas en temperatura ambiente. Tras el bloqueo, se añadió plasma coincubado con antisuero policlonal de conejo contra COMP de rata (proporcionada generosamente por el Profesor Dick Heinegård, Lund, Suecia) y se incubaron las placas durante 2 horas a temperatura ambiente. Se estimó la cantidad de COMP en plasma tras la incubación con un anticuerpo de cerdo específico de isotipo anti-conejo conjugado con fosfatasa alcalina (DAKO, Glostrup, Dinamarca) y sustrato de fosfatasa (Sigma Aldrich) como sustrato seguido por detección en un instrumento Spectra Max (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EE.UU.) a una DO de 405 nm.

Se determinó la respuesta de anticuerpos contra CII de rata en plasma con ELISA en placas de 96 pocillos (Costar, Cambridge, MA, EE.UU.) recubiertas durante la noche a 4°C con 50 µl/pocillo de CII de rata 10 µg/ml en 50 µl de PBS. Se realizaron todos los lavados con PBS (pH 7,4) que contenía Tween-20 al 0,1%. Se diluyó el plasma en PBS y se analizó por duplicado. Se estimaron las cantidades de anticuerpos IgG unidos tras la incubación con anticuerpos específicos de isotipo conjugados con biotina (Southern Biotechnology Associates, Inc. Birmingham, AL, EE.UU.) seguido por extravidina-peroxidasa (Sigma) y se revelaron con ABTS (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania) como sustrato seguido por detección en un instrumento Spectra Max a una DO de 405 nm (Molecular Devices).

Resultados

Los resultados del experimento de CIA (figuras 10-13) muestran una protección significativa frente a la enfermedad en ratones que son deficientes para el gen BSSL. Ratones BSSL-KO desarrollaron artritis con menos incidencia en inferior gravedad (figura 11). El efecto se observó principalmente en machos, pero es difícil extraer una conclusión sobre la especificidad de sexo puesto que las hembras desarrollaban artritis con una incidencia demasiado baja en general, y la enfermedad se desarrollaba con algún retraso en relación con los machos. Esto no era sorprendente, puesto que se sabe bien que los ratones macho se ven afectados más a menudo que las hembras en el modelo de CIA. No había diferencias en la respuesta de anticuerpos contra CII (figura 13) pero significativamente menos degradación del cartílago en ratones BSSL-KO, lo que se correlaciona con el desarrollo de la artritis (figura 13).

#### Ejemplo 4. Artritis inducida por colágeno en ratones deficientes en BSSL (seguimiento)

Se repitió el experimento de CIA descrito anteriormente con el mismo protocolo y criterios de valoración (puntuación clínica, respuesta de anticuerpos anti-CII y concentración en plasma de COMP), pero para este segundo experimento de CIA se incluyeron ratones heterocigotos para BSSL (BSSL-HET) y el estudio se limitó a ratones macho. Este estudio de seguimiento confirmó los resultados anteriores y mostró además que los ratones BSSL-HET eran menos propensos a desarrollar la enfermedad en comparación con ratones BSSL-WT pero no tan resistentes como los ratones BSSL-KO (figuras 14-16).

#### Ejemplo 5. Artritis inducida por pristano en ratas

Se planteó la hipótesis de que anticuerpos dirigidos hacia BSSL podrían impedir la unión de BSSL a su diana y por tanto servir como agentes terapéuticos para bloquear y/o mejorar la gravedad de la artritis. Para someter a prueba esta hipótesis *in vivo*, se investigó el efecto de anticuerpos anti-BSSL en otro modelo animal de artritis autoinmunitaria, es decir artritis inducida por pristano (PIA) en ratas.

#### Diseño del estudio

Se les inyectó pristano en el día 0 a ratas Dark Agouti (DA), que se sabe que tienen una alta susceptibilidad a desarrollar PIA. En el día 5, 10 y 15 se les inyectó a las ratas uno de los siguientes; 1) PBS, 2) anticuerpo anti-BSSL 1 mg/kg o 3) anticuerpo anti-BSSL 5 mg/kg (n=10 para cada grupo). Se siguió el desarrollo de la enfermedad (gravedad de la artritis) mediante la puntuación clínica tal como se describió para el modelo de CIA anteriormente.

#### Ratas

Se mantuvieron 40 ratas DA macho de Harlan Laboratories, Boxmeer, Países Bajos (8-10 semanas de edad a su llegada) en ciclos de luz/oscuridad de 12 h ciclos en jaulas de poliestireno que contenían virutas de madera y se alimentaron con dieta para roedores convencional y agua a voluntad en la instalación para animales convencional de BMC, Universidad de Lund, Lund. El experimento se aprobó por el comité ético de Malmö/Lund con el número de licencia M107-07. Una rata murió durante anestesia durante el experimento y se excluyó. Se anestesiaron las ratas para todas las inyecciones.

#### Procedimientos

Se indujo PIA mediante inyección s.c. en la base de la cola con 150 µl de pristano en el día 0 usando una aguja de 0,6x25 mm. En el día 5, 10 y 15 se les inyectó a las ratas cualquiera de los siguientes tratamientos por vía intraperitoneal (i.p.) en un volumen total de 1 ml/rata a) PBS, b) anticuerpo policlonal de conejo anti-BSSL humana (dirigido contra los aminoácidos 328-341) 1 mg/kg o c) anticuerpo anti-BSSL 5 mg/kg (n=10 para cada grupo). Se evaluaron las ratas para determinar la gravedad de la artritis a partir del día 9 y hasta el final del experimento (día 22).

Al final del experimento, se recogieron patas de ratas representativas y se fijaron en PFA al 4%, alternativamente se pusieron en disolución de EDTA descalcificante. Se transfirieron las muestras fijadas a disolución de EDTA tras 24 horas.

#### Resultados

Los resultados del experimento de PIA mostraron que anticuerpos anti-BSSL (5 mg/kg) reducían significativamente la gravedad de la enfermedad cuando se inyectaban al inicio de la enfermedad (figura 17). Incluso en el grupo al que se le inyectó la dosis inferior (1 mg/kg) se encontró una tendencia hacia la mejora.

#### Conclusiones

#### BSSL en enfermedades inflamatorias

Los presentes datos demuestran que BSSL, además de ser una enzima clave en la digestión de la grasa de la dieta

en las etapas tempranas de la vida, está presente en granulocitos y participa en procesos inflamatorios. Los presentes datos demuestran además que hay un requisito de BSSL en los procesos inflamatorios y la respuesta en enfermedades inflamatorias. La falta de BSSL o el tratamiento con anticuerpos dirigidos a BSSL redujo significativamente la gravedad de la enfermedad en dos modelos animales de artritis reumatoide.

- 5 Aubert-Jousset E, Garmy N, Sbarra V, Fantini J, Sadoulet M y Lombardo D. 2004. The combinatorial extension method reveals a sphingolipid binding domain on pancreatic bile salt-dependent lipase: role in secretion. *Structure* 12(8): 1437-1447.
- 10 Auge N, Rebai O, Lepetit-Thevenin J, Bruneau N, Thiers JC, Mas E, Lombardo D, Negre-Salvayre A, Verine A. 2003. Pancreatic bile salt-dependent lipase induces smooth muscle cells proliferation. *Circulation* 108:86-91.
- Bengtsson-Ellmark S, Nilsson J, Orho-Melander M, Dahlenborg K, Goop L y Bjursell, G. 2004. Association between a polymorphism in the carboxyl ester lipase gene and serum cholesterol profile. *European Journal of Human Genetics* 12: 627-632.
- 15 Berge SM, Bighley LD, Monkhouse DC. 1977. Pharmaceutical salts. *J. Pharm. Sci.* 66:1-19.
- Bird RE, Hardman KD, Jacobson JW, Johnson S, Kaufman BM, Lee SM, Lee T, Pope SH, Riordan GS, Whitlow M. 20 Single-chain antigen-binding proteins. *Science* 242:423-426.
- Bläckberg L, Blind PJ, Ljungberg B, Hernell O. 1985. On the source of bile salt-stimulated lipase in human milk: a study based on serum concentrations as determined by sandwich enzyme-linked immunosorbent assay technique. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 4:441-445.
- 25 Bläckberg, L y Hernell, O. 1981. The bile-salt-stimulated lipase in human milk. Purification and characterization. *Eur J Biochem* 116:221-225.
- Bruneau N, Bendayan M, Gingras D, Ghitescu L, Levy E, Lombardo D. 2003. Circulating bile salt-dependent lipase originates from the pancreas via intestinal transcytosis. *Gastroenterology* 124:470-480.
- 30 Bruneau N, Nganga A, Fisher EA y Lombardo D. 1997. O-Glycosylation of C-terminal tandem-repeated sequences regulates the secretion of rat pancreatic bile salt-dependent lipase. *J Biol Chem* 272:27353-27361.
- 35 Camarota, LM, Chapman, JM, Hui, DY y Howles, PN.2004. Carboxyl Ester Lipase Cofractionates with Scavenger Receptor BI in Hepatocyte Lipid Rafts and enhances Selective Uptake and Hydrolysis of Cholesteryl Esters from HDL3. *J. Biol.Chem.* 279: 27599-27606.
- 40 Clemetson, K.J. *et al.* 2000. Functional expression of CCR1, CCR3, CCR4 and CXCR4 chemokine receptors on human platelets. *Blood* 96: 4046 - 4054.
- Courtenay JS, Dallman MJ, Dayan AD, Martin A, Mosedale B. 1980. Immunisation against heterologous type II collagen induces arthritis in mice. *Nature* 283:666-8.34.
- 45 Fält H, Hernell O, Blackberg L. 2002 Does bile salt-stimulated lipase affect cholesterol uptake when bound to rat intestinal mucosa in vitro? *Pediatr Res*; 52(4):509-15.
- Fayard E, Schoonjans K, Annicotte JS y Auwerx J. 2003. Liver receptor homolog 1 controls the expression of carboxyl ester lipase. *JBiol Chem* 278:35725-35731.
- 50 Gabriel SE. 2001. The epidemiology of rheumatoid arthritis. *Rheum Dis Clin North Am* 27:269-81 Hallett, MB, Williams, AS. 2008. Stopping the traffic: a route to arthritis therapy. *Eur J Immunol.* 38(10): 2650-2653.
- Hansson L, Bläckberg L, Edlund M, Lundberg L, Strömqvist M y Hernell O. 1993. Recombinant human milk bile salt-stimulated lipase. Catalytic activity is retained in the absence of glycosylation and the unique proline-rich repeats. *J Biol Chem* 268:26692-26698.
- 55 Hernell O, Bläckberg L. 1997. Digestion and absorption of human milk lipids. En: Dulbecco R (ed) *ENCYCLOPEDIA OF HUMAN BIOLOGY*. Academic press, Nueva York, págs. 319-328.
- 60 Howles PN, Carter CP y Hui DY. 1996. Dietary free and esterified cholesterol absorption in cholesterol esterase (bile salt-stimulated lipase) gene-targeted mice. *J Biol Chem* 271:7196-7202.
- 65 Hui DY. 1996. Molecular biology of enzymes involved with cholesterol ester hydrolysis in mammalian tissues. *Biochim. Biophys. Acta* 1303:1-14.

- Hui DY, Howles PN. 2002. Carboxyl ester lipase: structure-function relationship and physiological role in lipoprotein metabolism and atherosclerosis. *JLipid Res* 43:2017-2030.
- 5 Kodvawala A, Ghering AB, Davidson WS, Hui DY. 2005. Carboxyl ester lipase expression in macrophages increases cholesteryl ester accumulation and promotes atherosclerosis. *J Biol Chem* 280:38592-38598.
- Kohler, G y Milstein, C. 1975. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256: 495-497.
- 10 Kuroiwa Y, Kasinathan P, Choi YJ, Naeem R, Tomizuka K, Sullivan EJ, Knott JG, Duteau A, Goldsby RA, Osborne BA, Ishida I, Robl JM. 2002. Cloned transchromosomal calves producing human immunoglobulin. *Nature Biotechnology* 20:889-894.
- Lindquist S, Blackberg L y Hernell O. 2002. Human bile salt-stimulated lipase has a high frequency of size variation due to a hypervariable region in exon 11. *Eur J Biochem* 269:759-767.
- 15 Lindquist S, Hernell O. 2010. Lipid digestion and absorption in early life: an update. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. (publicación electrónica antes de la impresión).
- 20 Lombardo, D, Guy, O, y Figarella, C. 1978. Purification and characterization of a carboxyl ester hydrolase from human pancreatic juice. *Biochim. Biophys. Acta* 527 (1): 142-149.
- Lonberg N, Taylor LD, Harding FA, Trounstein M, Higgins KM, Schramm SR, Kuo CC, Mashayekh R, Wymore K, McCabe JG, *et al.* 1994 Antigen-specific human antibodies from mice comprising four distinct genetic modifications. *Nature* 368(6474): 856-859.
- 25 Lonberg, N y Huszar, D. 1995. Human antibodies from transgenic mice. *Intern. Rev. Immunol.* 13: 65-93.
- Madeyski K, Lidberg U, Bjursell G y Nilsson J. 1999. Characterization of the gorilla carboxyl ester lipase locus, and the appearance of the carboxyl ester lipase pseudogene during primate evolution. *Gene* 239:273-282.
- 30 Naarding, MA, Dirac, AM, Ludwig, IS, Speijer, D, Lindquist, S, Vestman, EL, Stax, MJ, Geijtenbeek, TB, Pollakis, G, Hernell, O, Paxton WA. 2006. Bile salt-stimulated lipase from human milk binds DC-SIGN and inhibits human immunodeficiency virus type 1 transfer to CD4+ T cells. *Antimicrob Agents Chemother.* 50(10): 3367-3374.
- 35 Nilsson J, Blackberg L, Carlsson P, Enerback S, Hernell O, Bjursell G. 1990. cDNA cloning of human-milk bile-saltstimulated lipase and evidence for its identity to pancreatic carboxylic ester hydrolase. *EurJBiochem* 192:543-550.
- Panicot-Dubois L. *et al.* 2007. Bile-salt-dependent lipase interacts with platelet CXCR4 and modulates thrombus formation in mice and humans. *Journal of Clinical Investigation* 117: 3708-3719.
- 40 Pentikainen MO, Oksjoki R, Oorni K, y Kovanen PT. 2002. Lipoprotein lipase in the arterial wall: linking LDL to the arterial extracellular matrix and much more. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22:211-217.
- 45 Ruvoen-Clouet N, Mas E, Marionneau S, Guillon P, Lombardo D, Le Pendu J. 2006. Bile-salt-stimulated lipase and mucins from milk of 'secretor' mothers inhibit the binding of Norwalk virus capsids to their carbohydrate ligands. *Biochemical J* 393 (Pt 3): 627-634.
- 50 Saxne, T y Heinegard, D. 1992. Cartilage oligomeric matrix protein: a novel marker of cartilage turnover detectable in synovial fluid and blood. *Br J Rheumatol* 31 (583-91).
- Shamir R, Nganga A, Berkowitz D, Diamond E, Lischinsky S, Lombardo D, Shehadeh N. 2003. Serum levels of bile salt-stimulated lipase and breast feeding. *JPediatr Endocrinol Metab* 16:1289-1294.
- 55 Spilburg CA, Cox DG, Wang X, Bernat BA, Bosner MS, Lange LG. 1995. Identification of a species specific regulatory site in human pancreatic cholesterol esterase. *Biochemistry* 34(47): 15532-15538.
- Tomizuka K, Shinohara T, Yoshida H, Uejima H, Ohguma A, Tanaka S, Sato K, Oshimura M, Ishida I. 2000. Double trans-chromosomal mice: maintenance of two individual human chromosome fragments containing Ig heavy and kappa loci and expression of fully human antibodies. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 97:722-727.
- 60 Wang C-S *et al.* 1995. Isolation and Characterization of Human Milk Bile Salt-Activated Lipase C-tail Fragment. *Biochemistry* 34(33): 10639-10644.
- 65 Wang, CS y Johnson, K. 1983. Purification of human milk bile salt-activated lipase. *Anal Biochem* 133:457-461.

Ward ES, Güssow D, Griffiths AD, Jones PT, Winter G, 1989 Binding activities of a repertoire of single immunoglobulin variable domains secreted from *Escherichia coli*. Nature 341:544-546.

5 Wooley, PH, Luthra, HS, Stuart, JM, y David, CS. 1981 Type II collagen-induced arthritis in mice. I. Major histocompatibility complex (I region) linkage and antibody correlates. J Exp Med 154, 688-700.

**Lista de secuencias**

10 <110> Hernell, Olle  
Lindquist, Susanne  
Lundberg, Lennart

<120> NUEVOS MÉTODOS PARA EL TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES INFLAMATORIAS

15 <130> 225156

<150> Documento SE 0950228-7  
<151> 08-04-2009

20 <150> Documento US 61/254.221  
<151> 23-10-2009

<160> 4  
<170> PatentIn versión 3.3

25 <210> 1  
<211> 2238  
<212> ADN  
<213> *Homo sapiens*

30 <220>  
<221> CDS  
<222> (1)..(2235)

35 <220>  
<221> sig\_peptide  
<222> (1)..(69)

40 <220>  
<221> mat\_peptide  
<222> (70)..(2235)

<400> 1

ES 2 581 488 T3

atg ctc acc atg ggg cgc ctg caa ctg gtt gtg ttg ggc ctc acc tgc	48
Met Leu Thr Met Gly Arg Leu Gln Leu Val Val Leu Gly Leu Thr Cys	
-20 -15 -10	
tgc tgg gca gtg gcg agt gcc gcg aag ctg ggc gcc gtg tac aca gaa	96
Cys Trp Ala Val Ala Ser Ala Ala Lys Leu Gly Ala Val Tyr Thr Glu	
-5 -1 1 5	
ggt ggg ttc gtg gaa ggc gtc aat aag aag ctc ggc ctc ctg ggt gac	144
Gly Gly Phe Val Glu Gly Val Asn Lys Lys Leu Gly Leu Leu Gly Asp	
10 15 20 25	
tct gtg gac atc ttc aag ggc atc ccc ttc gca gct ccc acc aag gcc	192
Ser Val Asp Ile Phe Lys Gly Ile Pro Phe Ala Ala Pro Thr Lys Ala	
30 35 40	
ctg gaa aat cct cag cca cat cct ggc tgg caa ggg acc ctg aag gcc	240
Leu Glu Asn Pro Gln Pro His Pro Gly Trp Gln Gly Thr Leu Lys Ala	
45 50 55	
aag aac ttc aag aag aga tgc ctg cag gcc acc atc acc cag gac agc	288
Lys Asn Phe Lys Lys Arg Cys Leu Gln Ala Thr Ile Thr Gln Asp Ser	
60 65 70	
acc tac ggg gat gaa gac tgc ctg tac ctc aac att tgg gtg ccc cag	336

ES 2 581 488 T3

Thr	Tyr	Gly	Asp	Glu	Asp	Cys	Leu	Tyr	Leu	Asn	Ile	Trp	Val	Pro	Gln		
	75					80					85						
ggc	agg	aag	caa	gtc	tcc	cgg	gac	ctg	ccc	ggt	atg	atc	tgg	atc	tat		384
Gly	Arg	Lys	Gln	Val	Ser	Arg	Asp	Leu	Pro	Val	Met	Ile	Trp	Ile	Tyr		
90					95				100						105		
gga	ggc	gcc	ttc	ctc	atg	ggg	tcc	ggc	cat	ggg	gcc	aac	ttc	ctc	aac		432
Gly	Gly	Ala	Phe	Leu	Met	Gly	Ser	Gly	His	Gly	Ala	Asn	Phe	Leu	Asn		
				110					115					120			
aac	tac	ctg	tat	gac	ggc	gag	gag	atc	gcc	aca	cgc	gga	aac	gtc	atc		480
Asn	Tyr	Leu	Tyr	Asp	Gly	Glu	Glu	Ile	Ala	Thr	Arg	Gly	Asn	Val	Ile		
			125					130					135				
gtg	gtc	acc	ttc	aac	tac	cgt	gtc	ggc	ccc	ctt	ggg	ttc	ctc	agc	act		528
Val	Val	Thr	Phe	Asn	Tyr	Arg	Val	Gly	Pro	Leu	Gly	Phe	Leu	Ser	Thr		
		140					145					150					
ggg	gac	gcc	aat	ctg	cca	ggt	aac	tat	ggc	ctt	cgg	gat	cag	cac	atg		576
Gly	Asp	Ala	Asn	Leu	Pro	Gly	Asn	Tyr	Gly	Leu	Arg	Asp	Gln	His	Met		
	155					160					165						
gcc	att	gct	tgg	gtg	aag	agg	aat	atc	gcg	gcc	ttc	ggg	ggg	gac	ccc		624
Ala	Ile	Ala	Trp	Val	Lys	Arg	Asn	Ile	Ala	Ala	Phe	Gly	Gly	Asp	Pro		
170					175					180					185		
aac	aac	atc	acg	ctc	ttc	ggg	gag	tct	gct	gga	ggt	gcc	agc	gtc	tct		672
Asn	Asn	Ile	Thr	Leu	Phe	Gly	Glu	Ser	Ala	Gly	Gly	Ala	Ser	Val	Ser		
				190					195					200			
ctg	cag	acc	ctc	tcc	ccc	tac	aac	aag	ggc	ctc	atc	cgg	cga	gcc	atc		720
Leu	Gln	Thr	Leu	Ser	Pro	Tyr	Asn	Lys	Gly	Leu	Ile	Arg	Arg	Ala	Ile		
			205					210					215				
agc	cag	agc	ggc	gtg	gcc	ctg	agt	ccc	tgg	gtc	atc	cag	aaa	aac	cca		768
Ser	Gln	Ser	Gly	Val	Ala	Leu	Ser	Pro	Trp	Val	Ile	Gln	Lys	Asn	Pro		
		220					225					230					
ctc	ttc	tgg	gcc	aaa	aag	gtg	gct	gag	aag	gtg	ggt	tgc	cct	gtg	ggt		816
Leu	Phe	Trp	Ala	Lys	Lys	Val	Ala	Glu	Lys	Val	Gly	Cys	Pro	Val	Gly		
		235				240					245						
gat	gcc	gcc	agg	atg	gcc	cag	tgt	ctg	aag	ggt	act	gat	ccc	cga	gcc		864
Asp	Ala	Ala	Arg	Met	Ala	Gln	Cys	Leu	Lys	Val	Thr	Asp	Pro	Arg	Ala		
	250				255					260					265		
ctg	acg	ctg	gcc	tat	aag	gtg	ccg	ctg	gca	ggc	ctg	gag	tac	ccc	atg		912
Leu	Thr	Leu	Ala	Tyr	Lys	Val	Pro	Leu	Ala	Gly	Leu	Glu	Tyr	Pro	Met		
				270					275					280			
ctg	cac	tat	gtg	ggc	ttc	gtc	cct	gtc	att	gat	gga	gac	ttc	atc	ccc		960
Leu	His	Tyr	Val	Gly	Phe	Val	Pro	Val	Ile	Asp	Gly	Asp	Phe	Ile	Pro		
			285					290					295				
gct	gac	ccg	atc	aac	ctg	tac	gcc	aac	gcc	gcc	gac	atc	gac	tat	ata		1008
Ala	Asp	Pro	Ile	Asn	Leu	Tyr	Ala	Asn	Ala	Ala	Asp	Ile	Asp	Tyr	Ile		
		300					305					310					
gca	ggc	acc	aac	aac	atg	gac	ggc	cac	atc	ttc	gcc	agc	atc	gac	atg		1056
Ala	Gly	Thr	Asn	Asn	Met	Asp	Gly	His	Ile	Phe	Ala	Ser	Ile	Asp	Met		
	315					320					325						
cct	gcc	atc	aac	aag	ggc	aac	aag	aaa	gtc	acg	gag	gag	gac	ttc	tac		1104

ES 2 581 488 T3

Pro	Ala	Ile	Asn	Lys	Gly	Asn	Lys	Lys	Val	Thr	Glu	Glu	Asp	Phe	Tyr		
330					335					340					345		
aag	ctg	gtc	agt	gag	ttc	aca	atc	acc	aag	ggg	ctc	aga	ggc	gcc	aag	1152	
Lys	Leu	Val	Ser	Glu	Phe	Thr	Ile	Thr	Lys	Gly	Leu	Arg	Gly	Ala	Lys	360	
				350					355								
acg	acc	ttt	gat	gtc	tac	acc	gag	tcc	tgg	gcc	cag	gac	cca	tcc	cag	1200	
Thr	Thr	Phe	Asp	Val	Tyr	Thr	Glu	Ser	Trp	Ala	Gln	Asp	Pro	Ser	Gln	375	
			365					370									
gag	aat	aag	aag	aag	act	gtg	gtg	gac	ttt	gag	acc	gat	gtc	ctc	ttc	1248	
Glu	Asn	Lys	Lys	Lys	Thr	Val	Val	Asp	Phe	Glu	Thr	Asp	Val	Leu	Phe	390	
		380					385										
ctg	gtg	ccc	acc	gag	att	gcc	cta	gcc	cag	cac	aga	gcc	aat	gcc	aag	1296	
Leu	Val	Pro	Thr	Glu	Ile	Ala	Leu	Ala	Gln	His	Arg	Ala	Asn	Ala	Lys	400	
	395					400					405						
agt	gcc	aag	acc	tac	gcc	tac	ctg	ttt	tcc	cat	ccc	tct	cgg	atg	ccc	1344	
Ser	Ala	Lys	Thr	Tyr	Ala	Tyr	Leu	Phe	Ser	His	Pro	Ser	Arg	Met	Pro	425	
410					415					420							
gtc	tac	ccc	aaa	tgg	gtg	ggg	gcc	gac	cat	gca	gat	gac	att	cag	tac	1392	
Val	Tyr	Pro	Lys	Trp	Val	Gly	Ala	Asp	His	Ala	Asp	Asp	Ile	Gln	Tyr	440	
				430					435								
gtt	ttc	ggg	aag	ccc	ttc	gcc	acc	ccc	acg	ggc	tac	cgg	ccc	caa	gac	1440	
Val	Phe	Gly	Lys	Pro	Phe	Ala	Thr	Pro	Thr	Gly	Tyr	Arg	Pro	Gln	Asp	455	
			445					450									
agg	aca	gtc	tct	aag	gcc	atg	atc	gcc	tac	tgg	acc	aac	ttt	gcc	aaa	1488	
Arg	Thr	Val	Ser	Lys	Ala	Met	Ile	Ala	Tyr	Trp	Thr	Asn	Phe	Ala	Lys	470	
		460					465										
aca	ggg	gac	ccc	aac	atg	ggc	gac	tcg	gct	gtg	ccc	aca	cac	tgg	gaa	1536	
Thr	Gly	Asp	Pro	Asn	Met	Gly	Asp	Ser	Ala	Val	Pro	Thr	His	Trp	Glu	485	
	475					480					485						
ccc	tac	act	acg	gaa	aac	agc	ggc	tac	ctg	gag	atc	acc	aag	aag	atg	1584	
Pro	Tyr	Thr	Thr	Glu	Asn	Ser	Gly	Tyr	Leu	Glu	Ile	Thr	Lys	Lys	Met	505	
490					495					500							
ggc	agc	agc	tcc	atg	aag	cgg	agc	ctg	aga	acc	aac	ttc	ctg	cgc	tac	1632	
Gly	Ser	Ser	Ser	Met	Lys	Arg	Ser	Leu	Arg	Thr	Asn	Phe	Leu	Arg	Tyr	520	
				510					515								
tgg	acc	ctc	acc	tat	ctg	gcg	ctg	ccc	aca	gtg	acc	gac	cag	gag	gcc	1680	
Trp	Thr	Leu	Thr	Tyr	Leu	Ala	Leu	Pro	Thr	Val	Thr	Asp	Gln	Glu	Ala	535	
			525					530									
acc	cct	gtg	ccc	ccc	aca	ggg	gac	tcc	gag	gcc	act	ccc	gtg	ccc	ccc	1728	
Thr	Pro	Val	Pro	Pro	Thr	Gly	Asp	Ser	Glu	Ala	Thr	Pro	Val	Pro	Pro	550	
		540					545										
acg	ggt	gac	tcc	gag	acc	gcc	ccc	gtg	cgg	ccc	acg	ggt	gac	tcc	ggg	1776	
Thr	Gly	Asp	Ser	Glu	Thr	Ala	Pro	Val	Pro	Pro	Thr	Gly	Asp	Ser	Gly	565	
	555					560					565						
gcc	ccc	ccc	gtg	cgg	ccc	acg	ggt	gac	tcc	ggg	gcc	ccc	ccc	gtg	cgg	1824	
Ala	Pro	Pro	Val	Pro	Pro	Thr	Gly	Asp	Ser	Gly	Ala	Pro	Pro	Val	Pro	585	
570					575					580							
ccc	acg	ggt	gac	tcc	ggg	gcc	ccc	ccc	gtg	cgg	ccc	acg	ggt	gac	tcc	1872	

ES 2 581 488 T3

Pro Thr Gly Asp Ser Gly Ala Pro Pro Val Pro Pro Thr Gly Asp Ser	590	595	600
ggg gcc ccc ccc gtg ccg ccc acg ggt gac tcc ggg gcc ccc ccc gtg	605	610	615
Gly Ala Pro Pro Val Pro Pro Thr Gly Asp Ser Gly Ala Pro Pro Val			
ccg ccc acg ggt gac tcc ggg gcc ccc ccc gtg ccg ccc acg ggt gac	620	625	630
Pro Pro Thr Gly Asp Ser Gly Ala Pro Pro Val Pro Pro Thr Gly Asp			
tcc gcc gcc ccc ccc gtg ccg ccc acg ggt gac gcc ggg ccc ccc ccc	635	640	645
Ser Gly Ala Pro Pro Val Pro Pro Thr Gly Asp Ala Gly Pro Pro Pro			
gtg ccg ccc acg ggt gac tcc gcc gcc ccc ccc gtg ccg ccc acg ggt	650	655	660
Val Pro Pro Thr Gly Asp Ser Gly Ala Pro Pro Val Pro Pro Thr Gly			
gac tcc ggg gcc ccc ccc gtg acc ccc acg ggt gac tcc gag acc gcc	670	675	680
Asp Ser Gly Ala Pro Pro Val Thr Pro Thr Gly Asp Ser Glu Thr Ala			
ccc gtg ccg ccc acg ggt gac tcc ggg gcc ccc cct gtg ccc ccc acg	685	690	695
Pro Val Pro Pro Thr Gly Asp Ser Gly Ala Pro Pro Val Pro Pro Thr			
ggt gac tct gag gct gcc cct gtg ccc ccc aca gat gac tcc aag gaa	700	705	710
Gly Asp Ser Glu Ala Ala Pro Val Pro Pro Thr Asp Asp Ser Lys Glu			
gct cag atg cct gca gtc att agg ttt tag	715	720	
Ala Gln Met Pro Ala Val Ile Arg Phe			
<210> 2			
<211> 745			
<212> PRT			
<213> <i>Homo sapiens</i>			
<400> 2			
Met Leu Thr Met Gly Arg Leu Gln Leu Val Val Leu Gly Leu Thr Cys	-20	-15	-10
Cys Trp Ala Val Ala Ser Ala Ala Lys Leu Gly Ala Val Tyr Thr Glu	-5	-1 1	5
Gly Gly Phe Val Glu Gly Val Asn Lys Lys Leu Gly Leu Leu Gly Asp	10	15	20
Ser Val Asp Ile Phe Lys Gly Ile Pro Phe Ala Ala Pro Thr Lys Ala	30	35	40
Leu Glu Asn Pro Gln Pro His Pro Gly Trp Gln Gly Thr Leu Lys Ala	45	50	55
Lys Asn Phe Lys Lys Arg Cys Leu Gln Ala Thr Ile Thr Gln Asp Ser			

5

ES 2 581 488 T3

	60						65									70
Thr	Tyr	Gly	Asp	Glu	Asp	Cys	Leu	Tyr	Leu	Asn	Ile	Trp	Val	Pro	Gln	
	75					80					85					
Gly	Arg	Lys	Gln	Val	Ser	Arg	Asp	Leu	Pro	Val	Met	Ile	Trp	Ile	Tyr	
90					95					100					105	
Gly	Gly	Ala	Phe	Leu	Met	Gly	Ser	Gly	His	Gly	Ala	Asn	Phe	Leu	Asn	
				110					115					120		
Asn	Tyr	Leu	Tyr	Asp	Gly	Glu	Glu	Ile	Ala	Thr	Arg	Gly	Asn	Val	Ile	
			125					130					135			
Val	Val	Thr	Phe	Asn	Tyr	Arg	Val	Gly	Pro	Leu	Gly	Phe	Leu	Ser	Thr	
		140					145					150				
Gly	Asp	Ala	Asn	Leu	Pro	Gly	Asn	Tyr	Gly	Leu	Arg	Asp	Gln	His	Met	
	155					160					165					
Ala	Ile	Ala	Trp	Val	Lys	Arg	Asn	Ile	Ala	Ala	Phe	Gly	Gly	Asp	Pro	
170					175					180					185	
Asn	Asn	Ile	Thr	Leu	Phe	Gly	Glu	Ser	Ala	Gly	Gly	Ala	Ser	Val	Ser	
				190					195					200		
Leu	Gln	Thr	Leu	Ser	Pro	Tyr	Asn	Lys	Gly	Leu	Ile	Arg	Arg	Ala	Ile	
			205					210					215			
Ser	Gln	Ser	Gly	Val	Ala	Leu	Ser	Pro	Trp	Val	Ile	Gln	Lys	Asn	Pro	
		220					225					230				
Leu	Phe	Trp	Ala	Lys	Lys	Val	Ala	Glu	Lys	Val	Gly	Cys	Pro	Val	Gly	
	235					240					245					
Asp	Ala	Ala	Arg	Met	Ala	Gln	Cys	Leu	Lys	Val	Thr	Asp	Pro	Arg	Ala	
250					255					260					265	
Leu	Thr	Leu	Ala	Tyr	Lys	Val	Pro	Leu	Ala	Gly	Leu	Glu	Tyr	Pro	Met	
				270					275					280		
Leu	His	Tyr	Val	Gly	Phe	Val	Pro	Val	Ile	Asp	Gly	Asp	Phe	Ile	Pro	
			285					290					295			
Ala	Asp	Pro	Ile	Asn	Leu	Tyr	Ala	Asn	Ala	Ala	Asp	Ile	Asp	Tyr	Ile	
		300					305					310				
Ala	Gly	Thr	Asn	Asn	Met	Asp	Gly	His	Ile	Phe	Ala	Ser	Ile	Asp	Met	

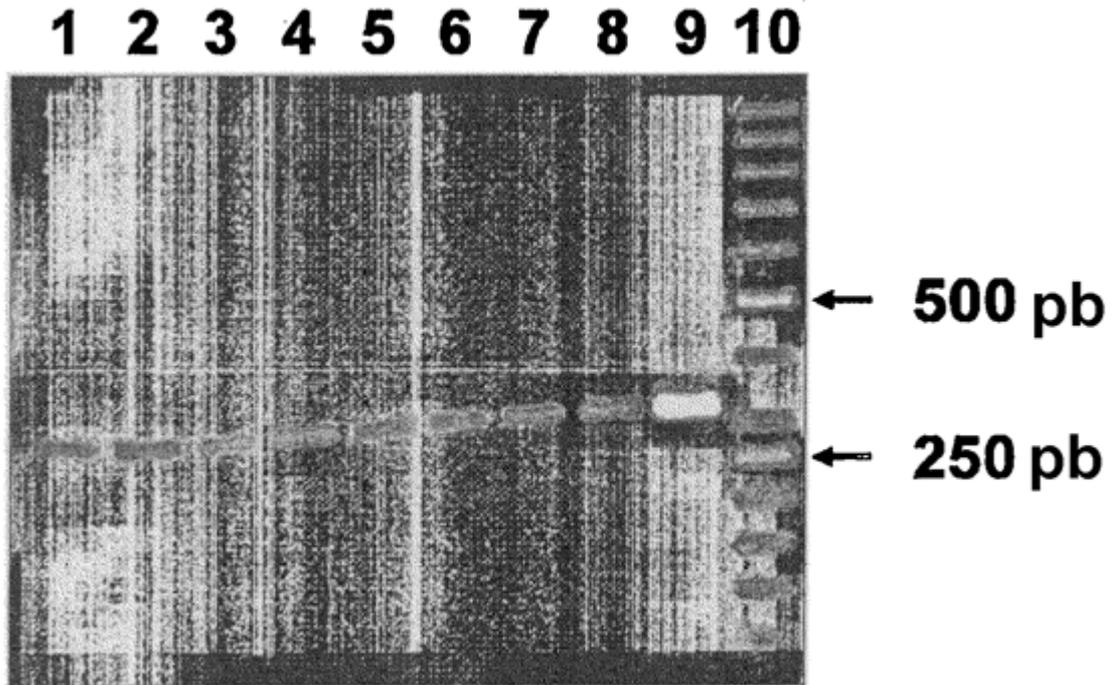




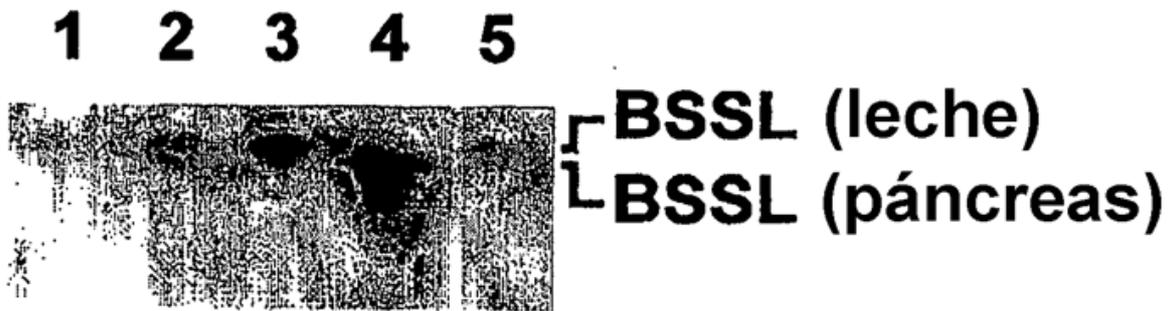
**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Composición farmacéutica que comprende un antagonista de BSSL y un portador o excipiente farmacéuticamente aceptable para su uso en la prevención, la profilaxis y/o el tratamiento de artritis reumatoide, en la que el antagonista de BSSL es (i) un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo que se une específicamente a BSSL humana, o (ii) una molécula de iARN o un polinucleótido antisentido que comprende una secuencia complementaria a una parte de una secuencia de polinucleótido que codifica para BSSL humana o una secuencia complementaria a la misma.
- 10 2. Composición farmacéutica según la reivindicación 1, en la que el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.
- 15 3. Uso de un antagonista de BSSL en la fabricación de una composición farmacéutica para la prevención, la profilaxis y/o el tratamiento de artritis reumatoide, en el que el antagonista de BSSL es (i) un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo que se une específicamente a BSSL humana, o (ii) una molécula de iARN o un polinucleótido antisentido que comprende una secuencia complementaria a una parte de una secuencia de polinucleótido que codifica para BSSL humana o una secuencia complementaria a la misma.
4. Uso según la reivindicación 3, en el que el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.

**Figura 1**



## Figura 2



**Figura 3**

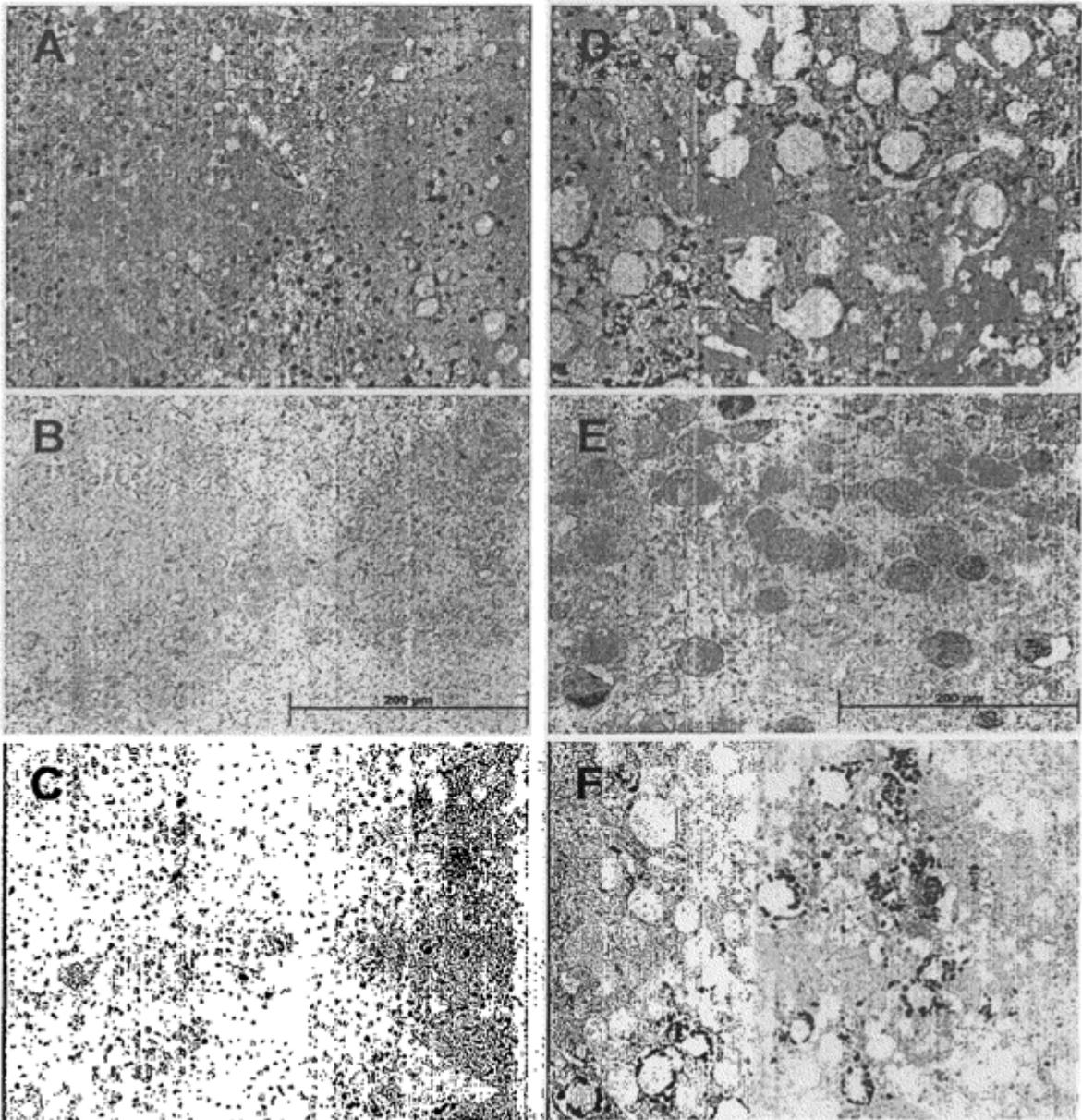


Figura 4A

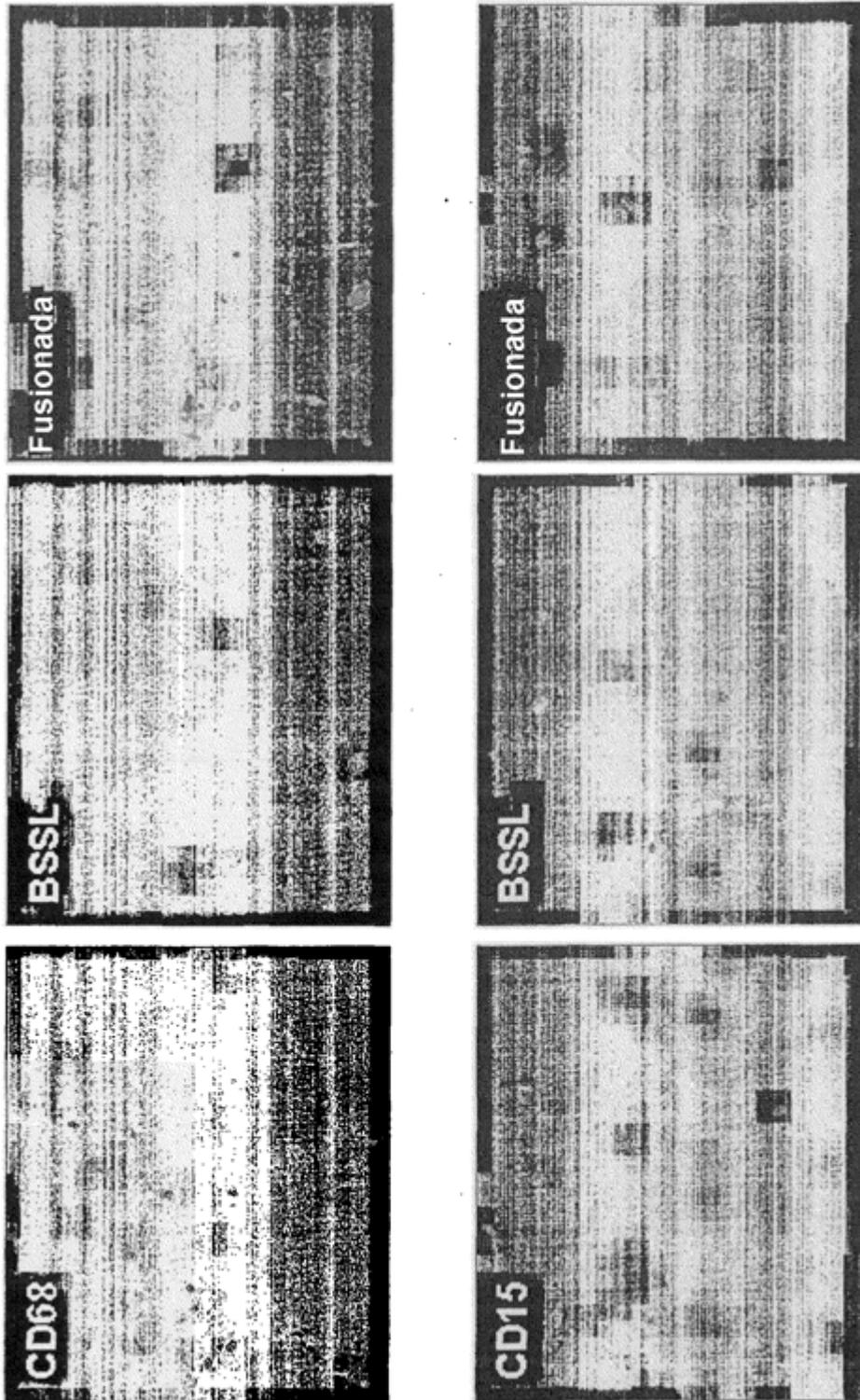
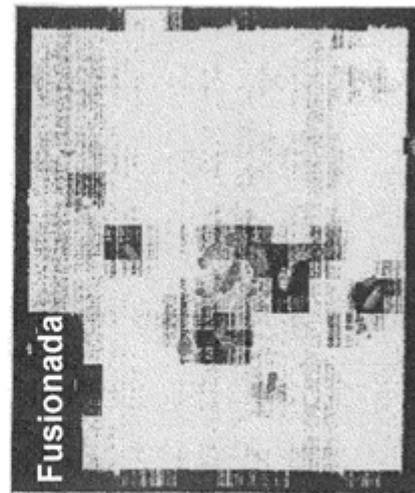
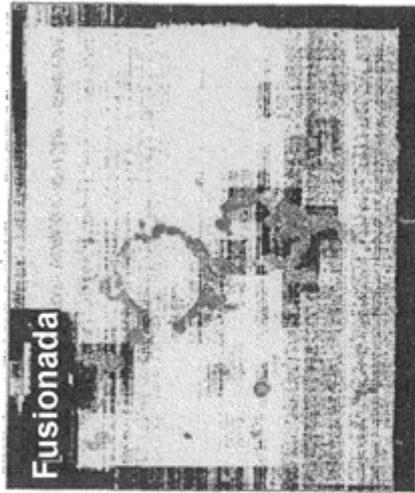


Figura 4B



# Figura 5

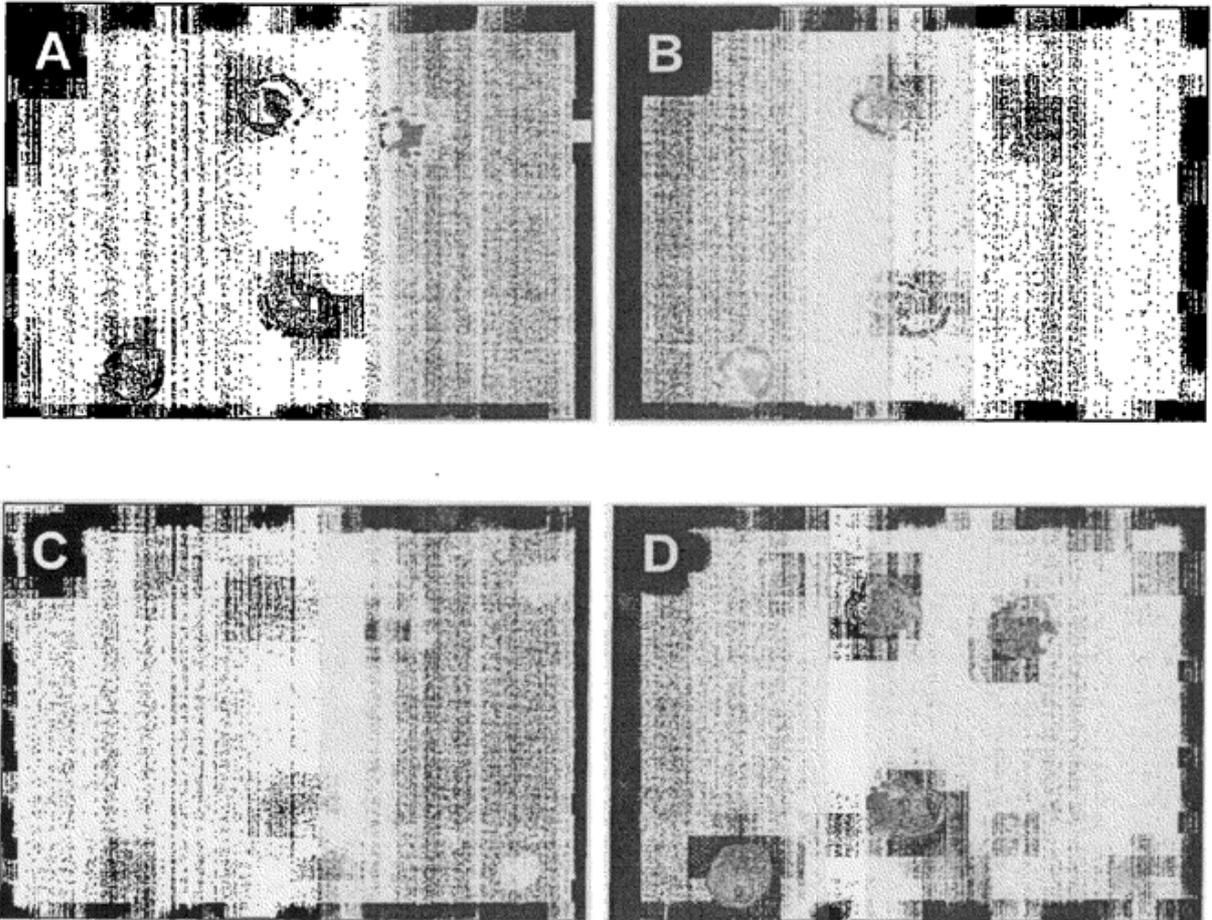
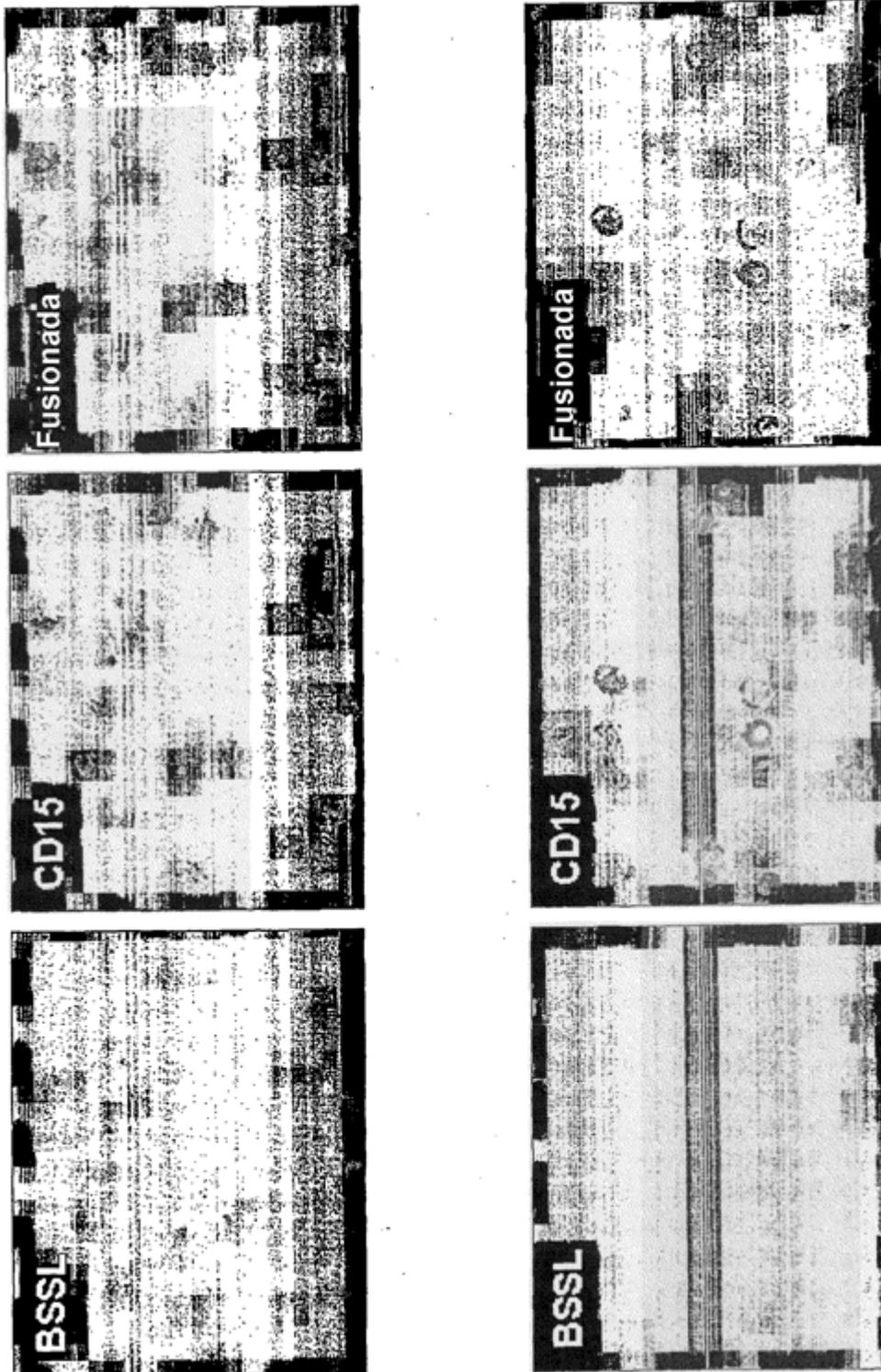
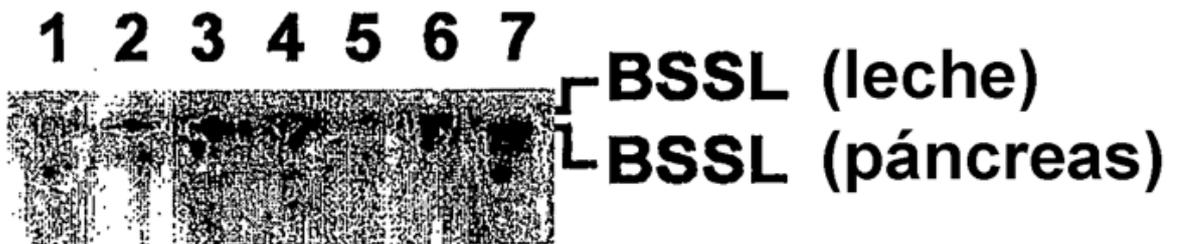


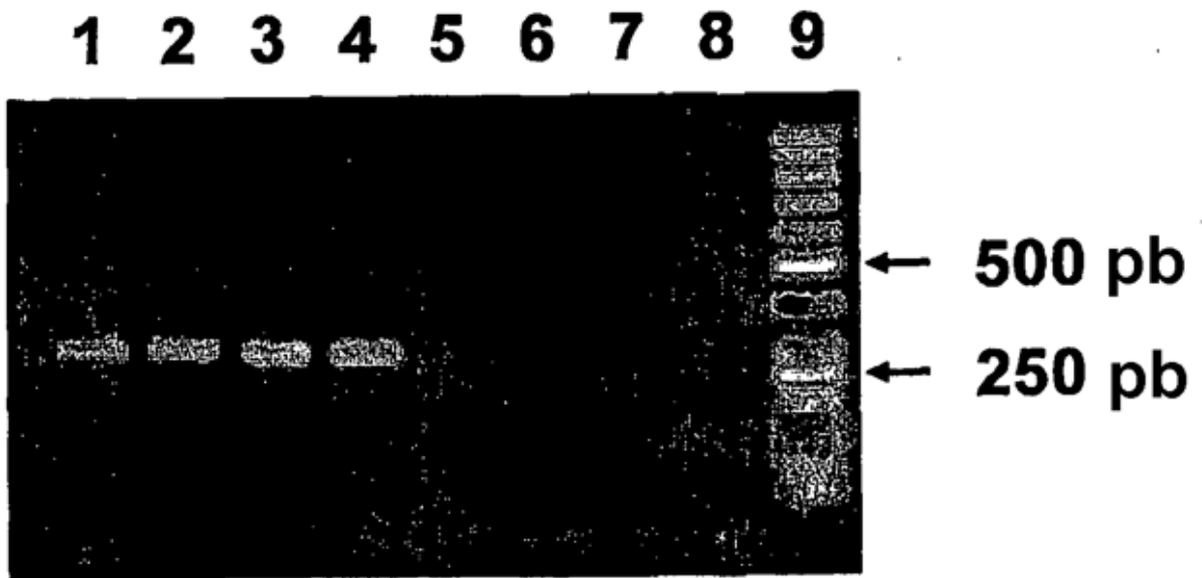
Figura 6



# Figura 7



# Figura 8



# Figura 9

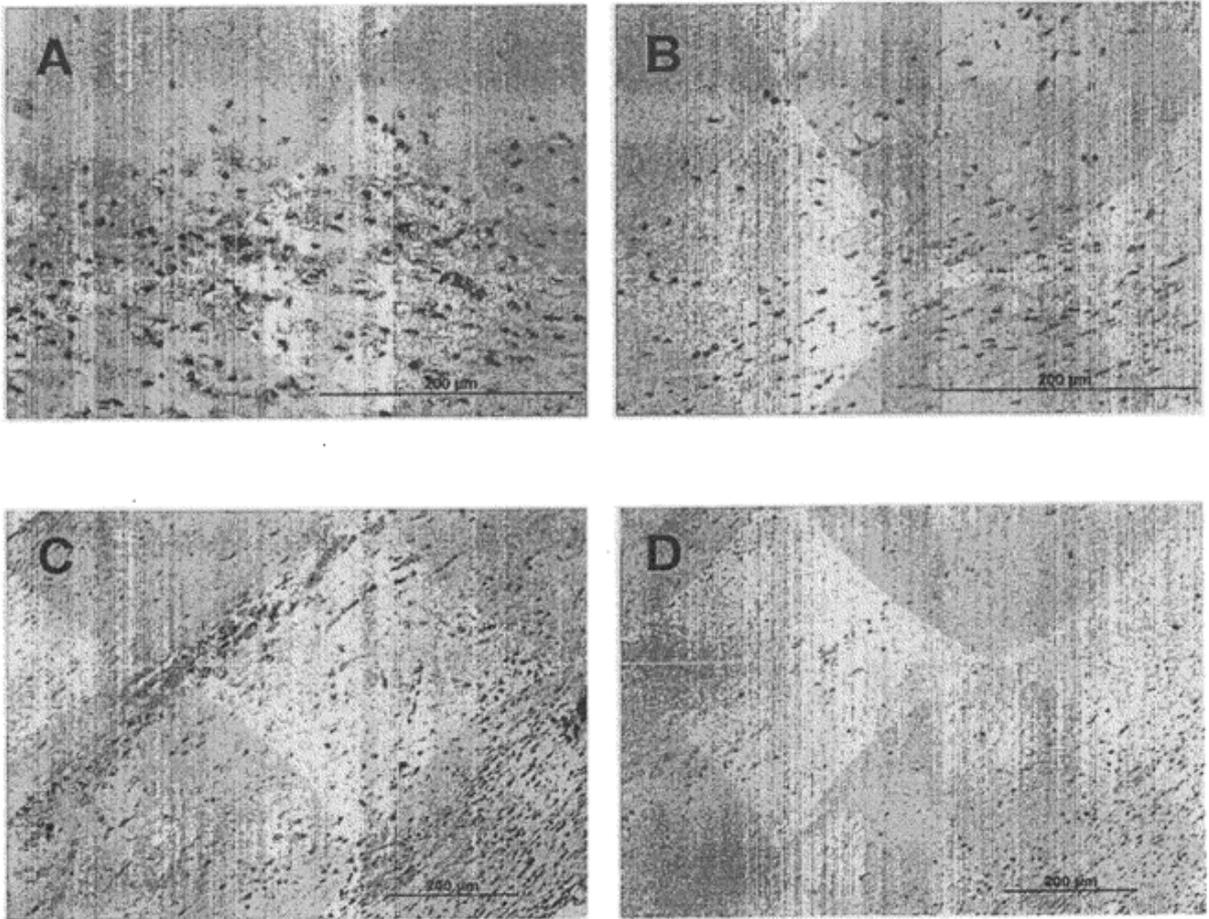


Figura 10A

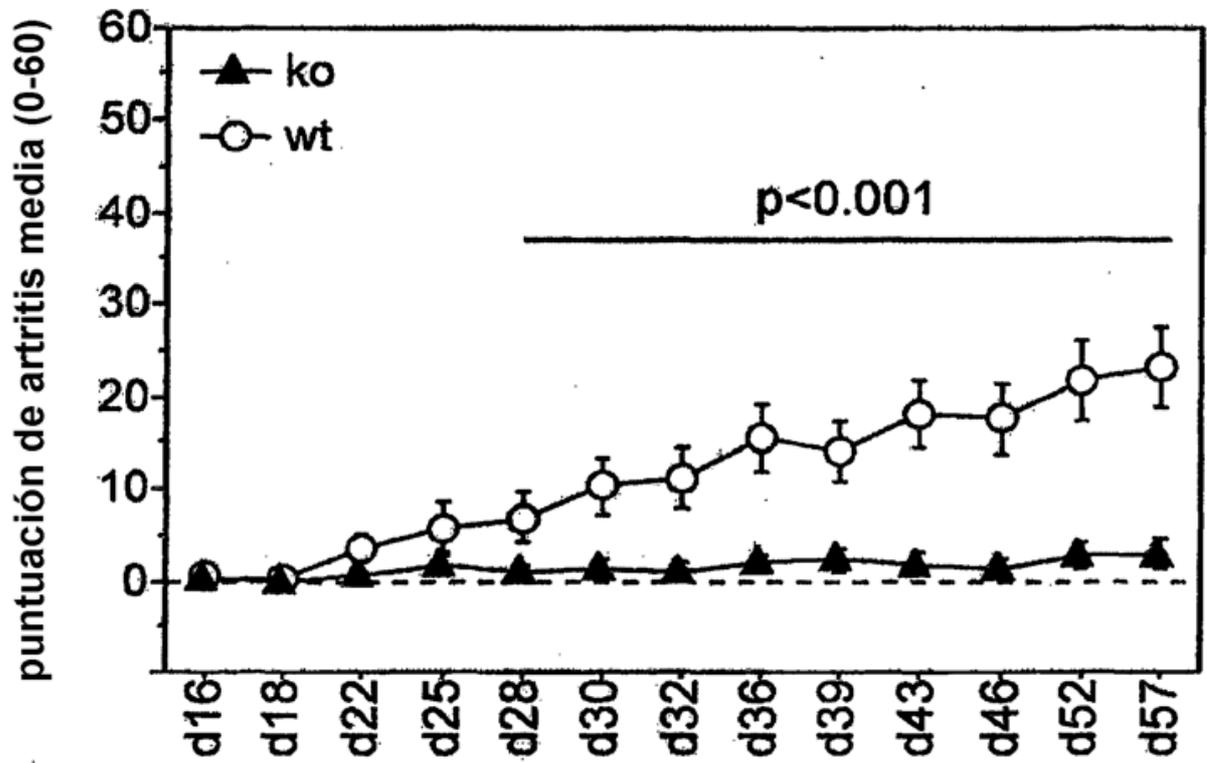


Figura 10B

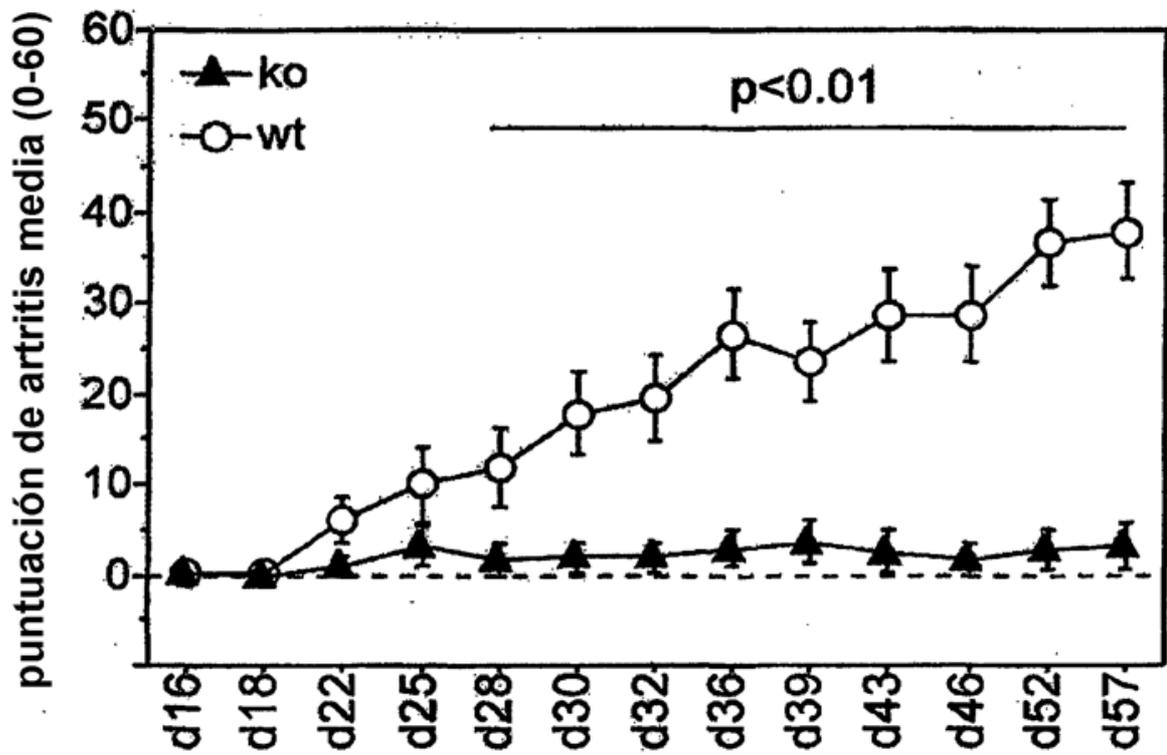


Figura 10C

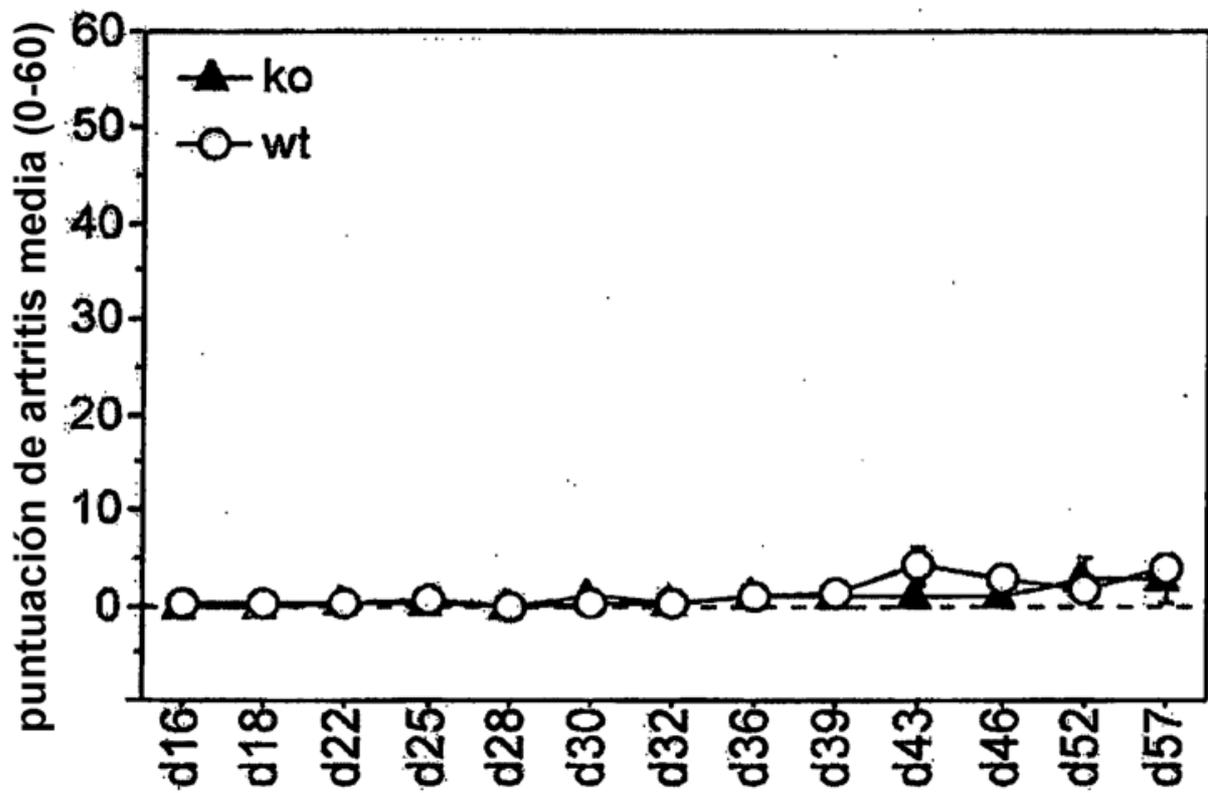


Figura 11A

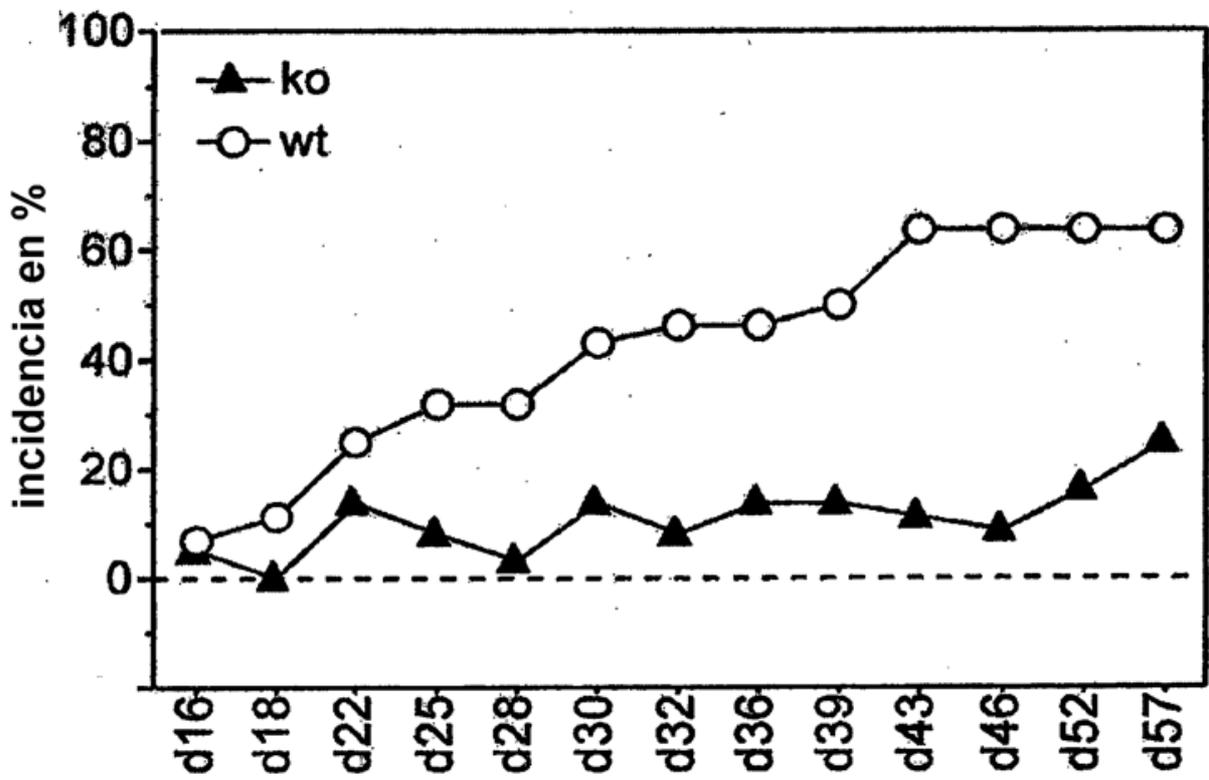


Figura 11B

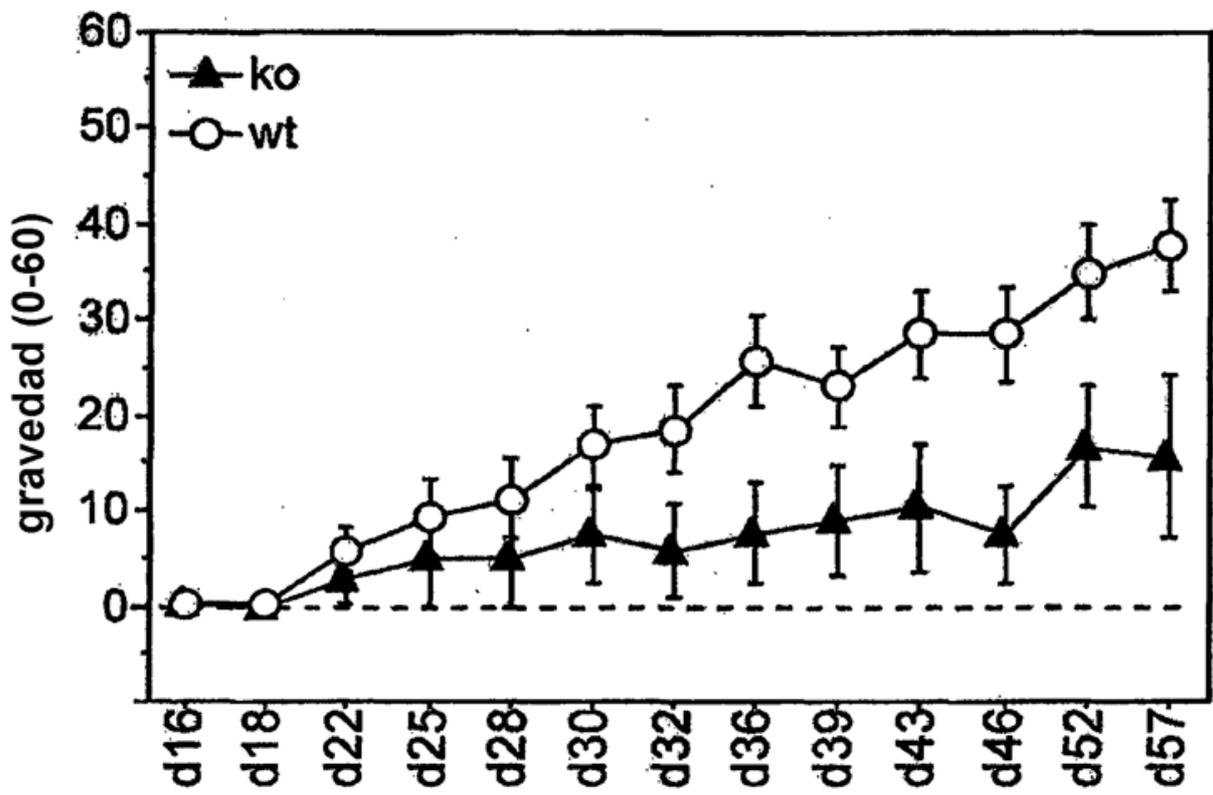


Figura 12A

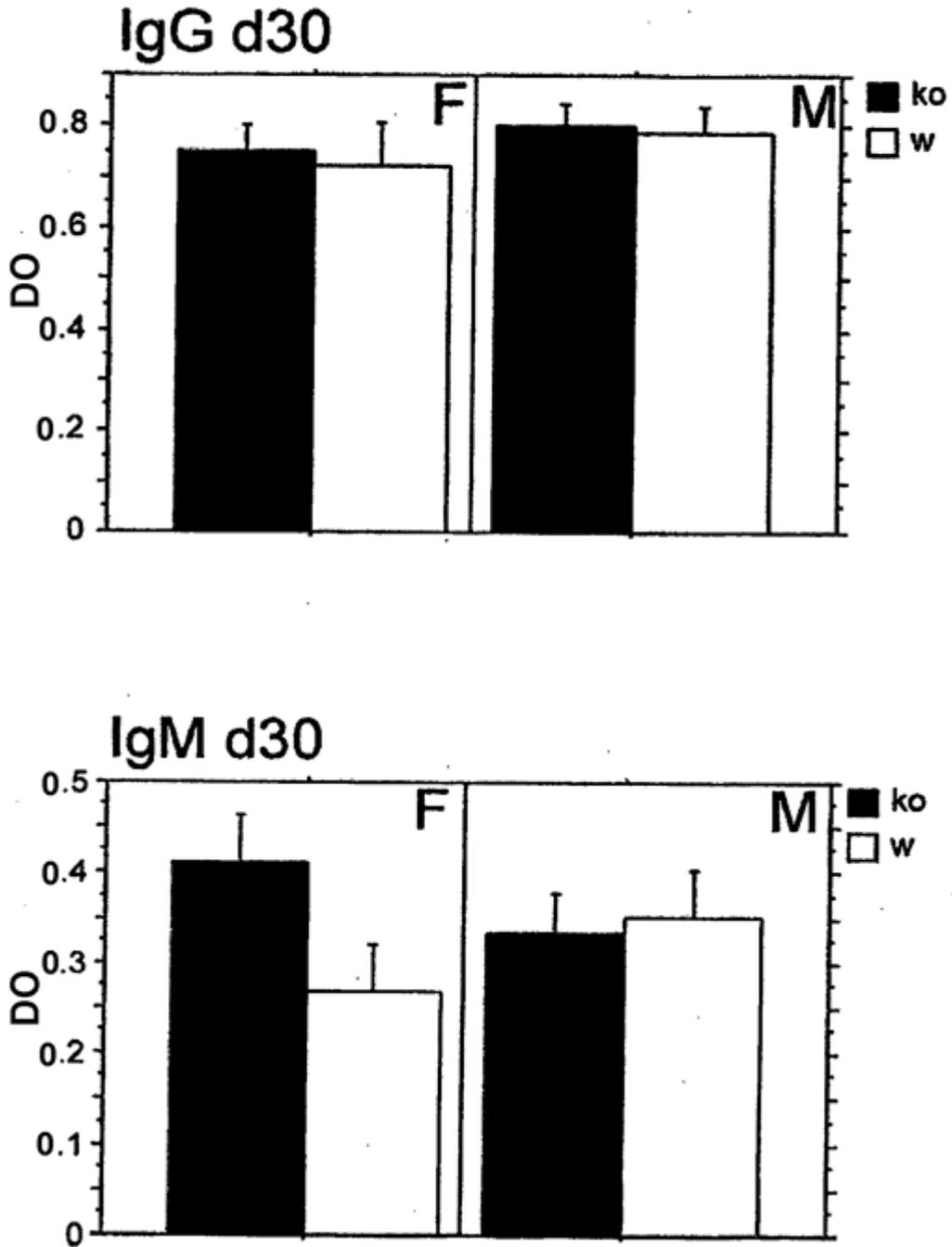


Figura 12B

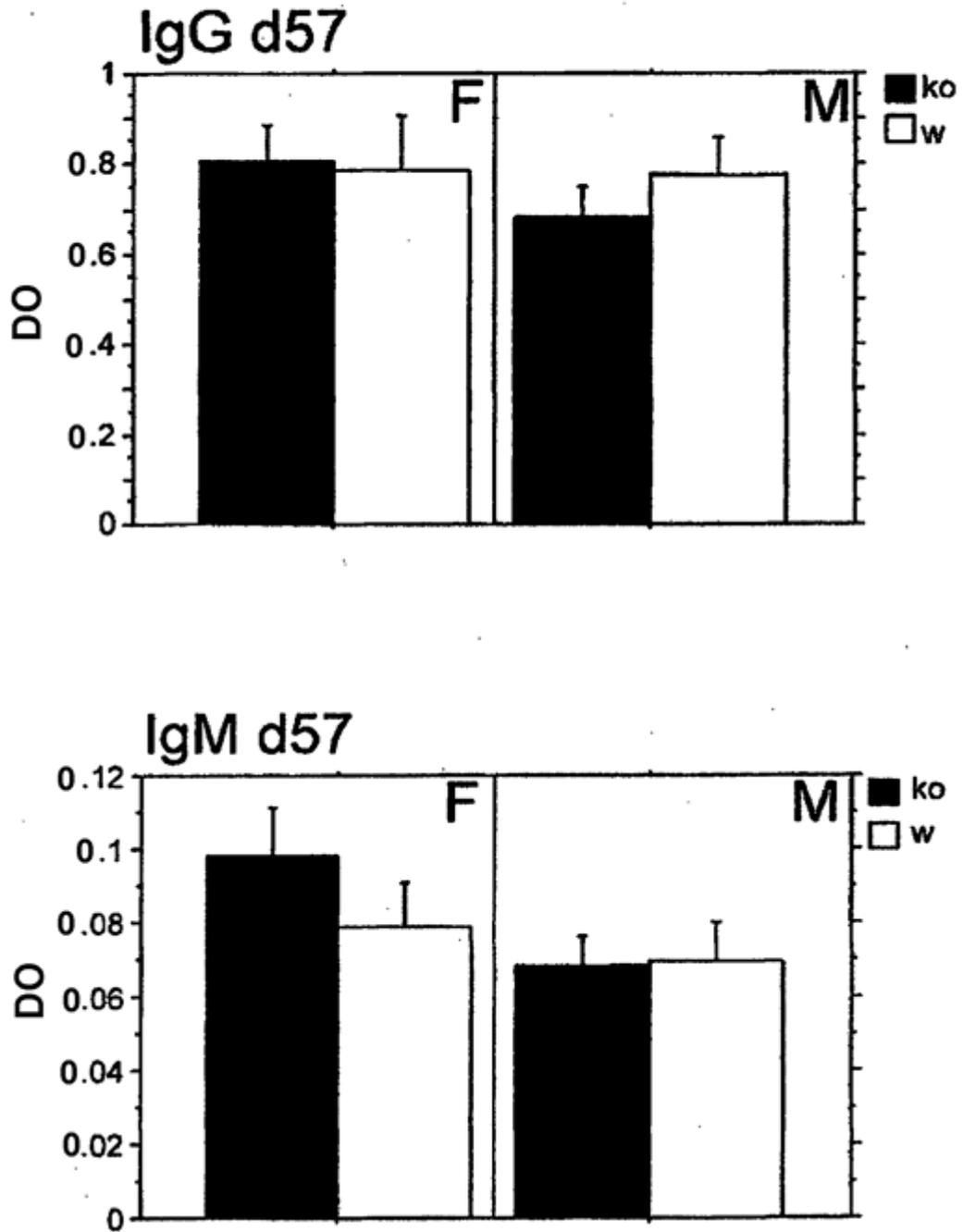


Figura 13

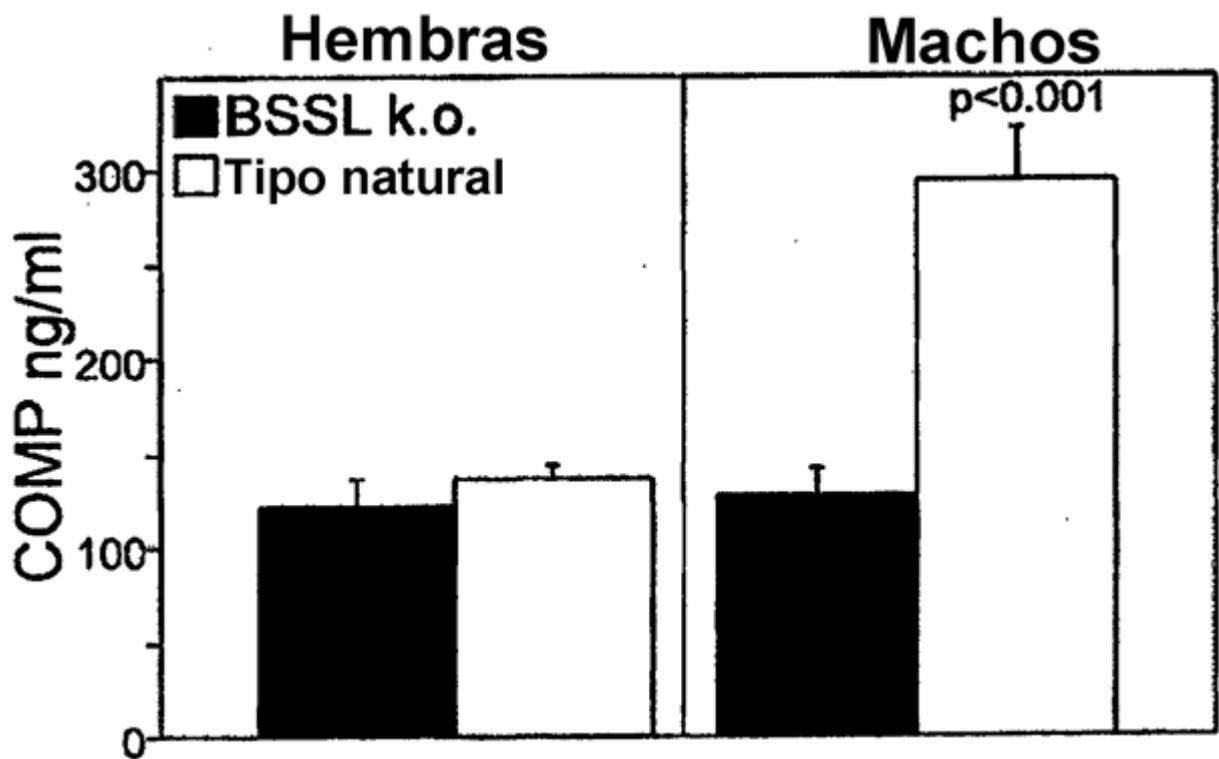


Figura 14A

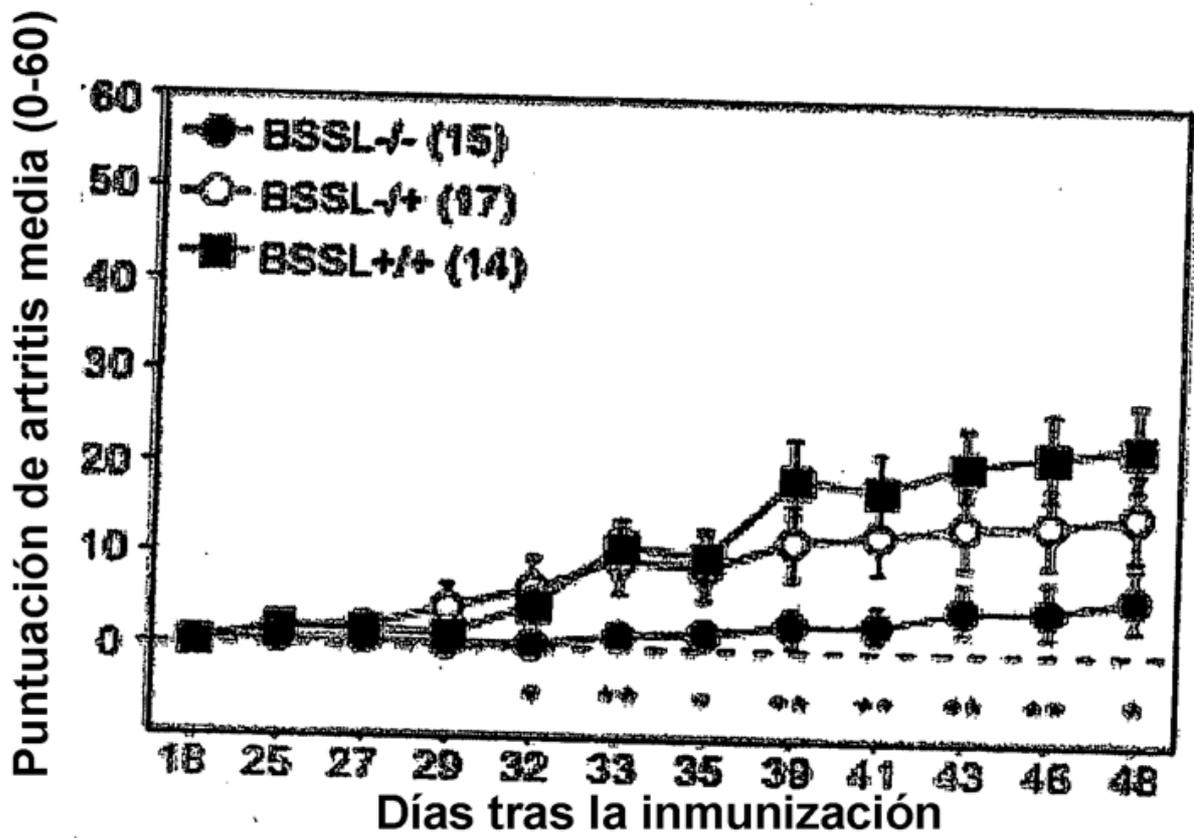


Figura 14B

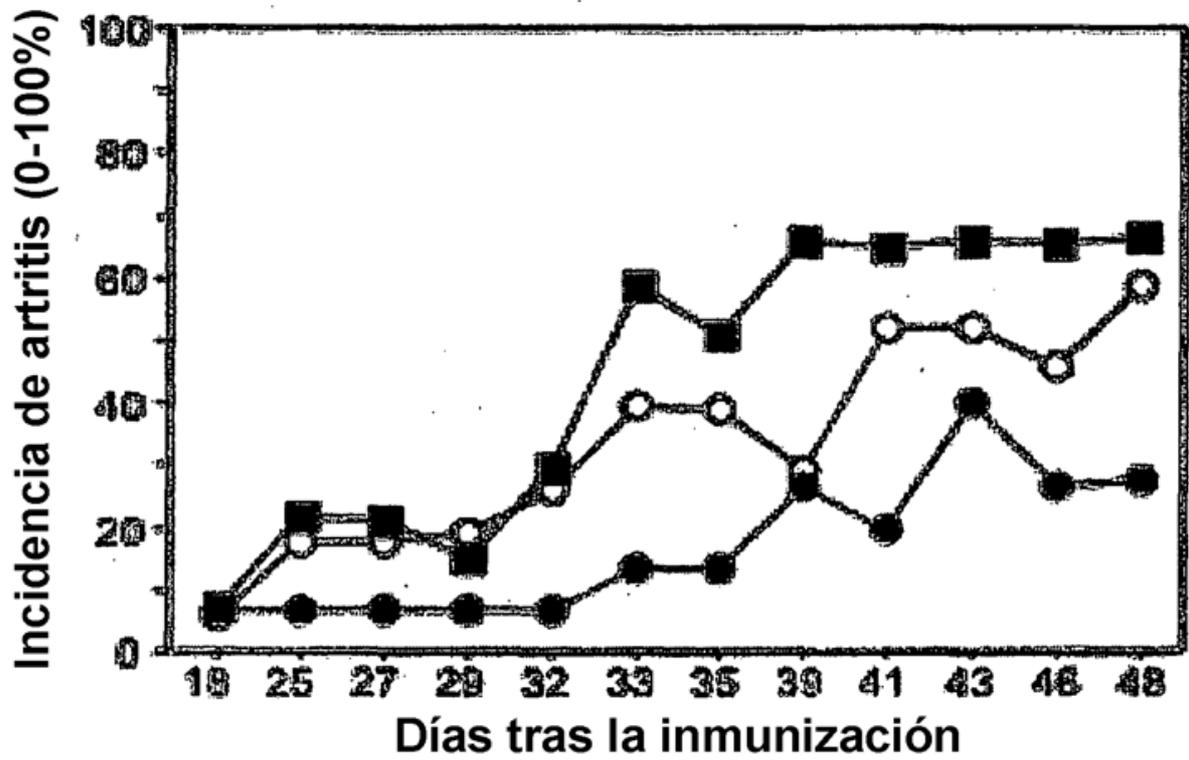


Figura 14C

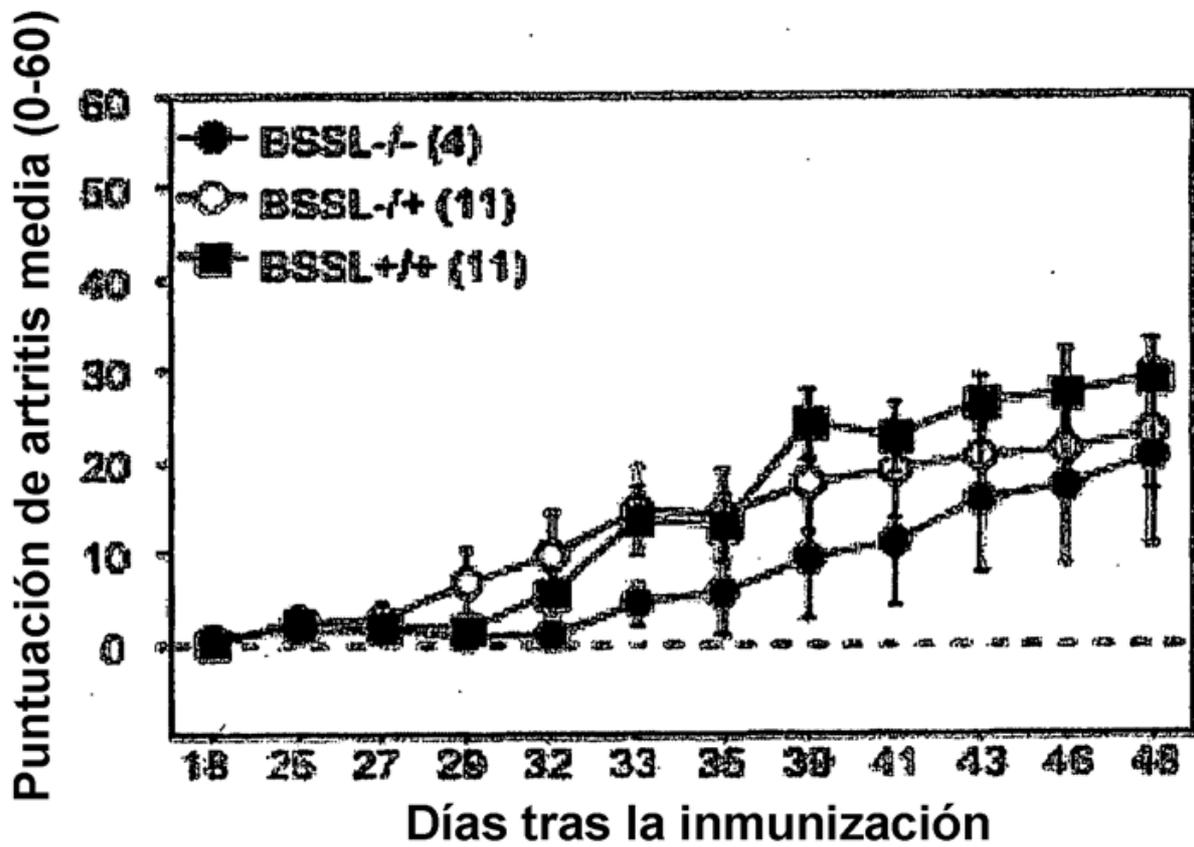


Figura 15

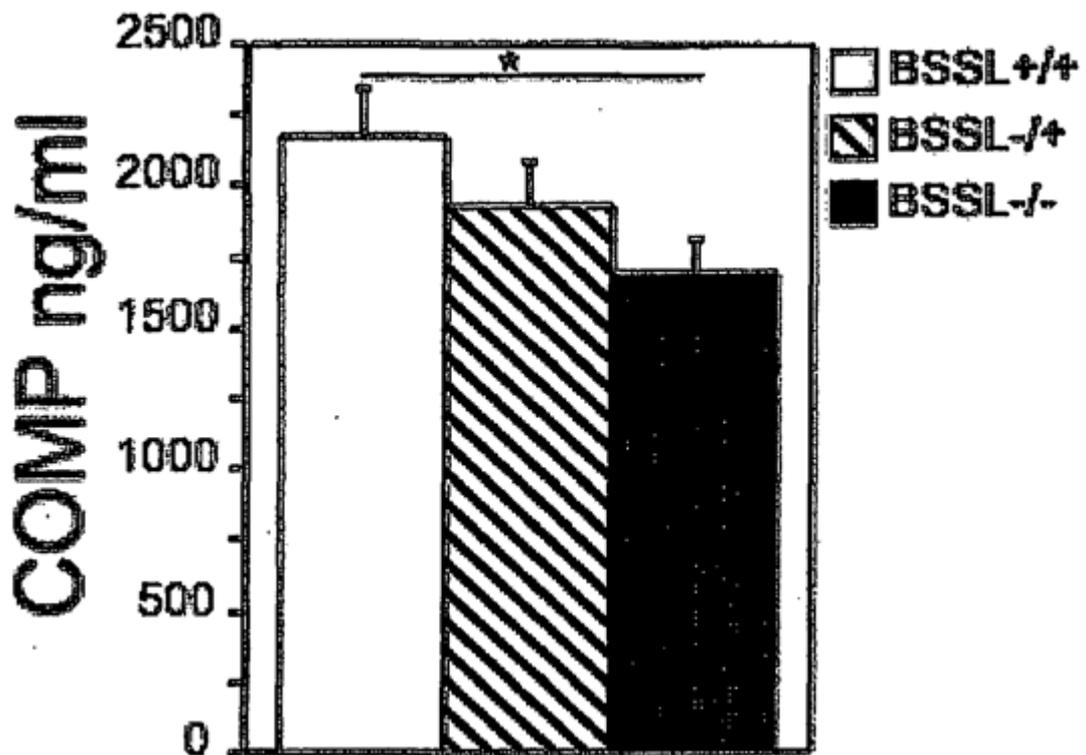


Figura 16

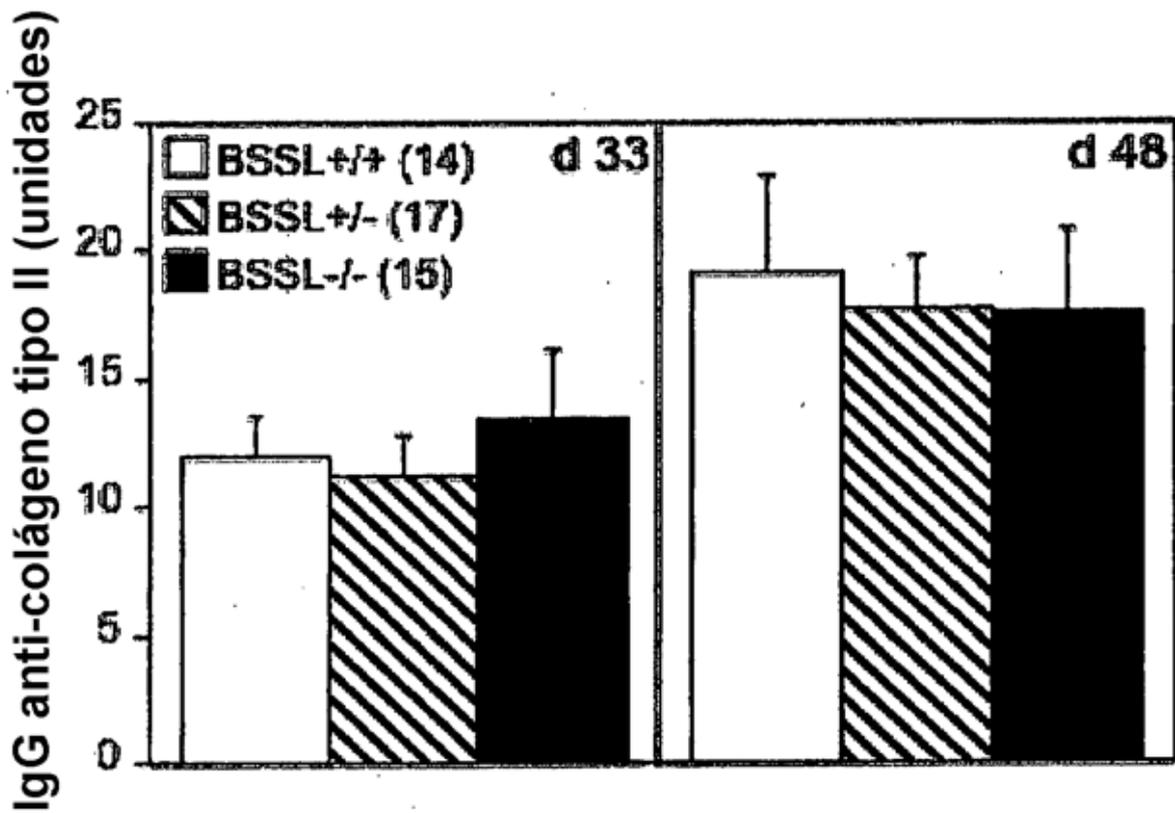


Figura 17

