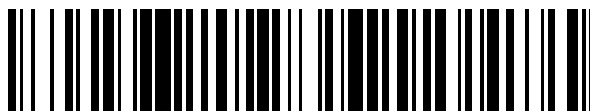


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 627 676**

51 Int. Cl.:

**C07C 281/18** (2006.01)

**A61K 31/155** (2006.01)

**A61P 43/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.03.2008 PCT/US2008/056449**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.09.2008 WO08112659**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.03.2008 E 08731853 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.03.2017 EP 2121586**

54 Título: **MGBG para la regulación de osteopontina y el tratamiento de la esclerosis múltiple**

30 Prioridad:

**09.03.2007 US 894153 P**

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

**31.07.2017**

73 Titular/es:

**PATHOLOGICA LLC (100.0%)  
1700 OWENS STREET SUITE 515  
SAN FRANCISCO, CALIFORNIA 9415, US**

72 Inventor/es:

**HADLOCK, KENNETH;  
LANCERO, HOPE;  
YU, STEPHANIE y  
DO, HIEN**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU SLP, .**

ES 2 627 676 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**

MGBG para la regulación de osteopontina y el tratamiento de la esclerosis múltiple

Esta solicitud reivindica la prioridad de la solicitud provisional estadounidense número de serie 60/894,153, titulada "Regulación de Osteopontina", presentada el 9 de marzo de 2007.

5 La osteopontina ("OPN"), también conocida como fosfoproteína 1 secretada ("SPP1"), marcador de activación temprana de los linfocitos T (Eta-1), sialoproteína I o 44K BPP (fosfoproteína ósea), es una fosfoproteína glicosilada que se encuentra en el plasma, otros fluidos corporales y matrices extracelulares. La proteína está compuesta por aproximadamente 300 residuos de aminoácidos y tiene aproximadamente 30 residuos de hidratos de carbono, incluyendo 10 residuos de ácido siálico, unidos a ella. La OPN es una proteína ácida que presenta una alta homología de aminoácidos entre especies (por ejemplo, ratón, rata, humano y cerdo) con varios elementos conservados incluyendo un tramo de 7 a 9 residuos de Asp o Glu.

10 La osteopontina se biosintetiza por una variedad de tipos de tejidos incluyendo los preosteoblastos, osteoblastos, osteocitos, células extraóseas del oído interno, cerebro, riñón, decidua, placenta, odontoblastos, algunas células de la médula ósea, condrocitos hipertróficos, macrófagos, músculo liso y células endoteliales. En el hueso, la proteína está formada principalmente por las células del linaje osteoblástico y se deposita sobre la matriz mineralizada. Es abundante en la matriz mineral ósea y acelera la regeneración ósea y la remodelación. La osteopontina es una proteína multifuncional con capacidad para unir varias proteínas, incluyendo las proteínas integritas y variantes de la proteína CD44.

15 La osteopontina está asociada, y juega un papel, en la regulación y progresión de muchas enfermedades. Se sabe que la osteopontina aumenta en una serie de trastornos autoinmunes y se sobreexpresa en una variedad de cánceres. Los niveles plasmáticos de osteopontina también están elevados en individuos con enfermedad coronaria arterial y se encuentran niveles elevados de osteopontina en el líquido sinovial de individuos con artritis reumatoide.

20 La modulación de la osteopontina puede conferir, por tanto, beneficios terapéuticos significativos. Por consiguiente, existe la necesidad de identificar formas de regular la osteopontina, especialmente formas para disminuir el nivel o la concentración efectiva de osteopontina.

25 La presente invención se basa, al menos en parte, en el descubrimiento de que la osteopontina puede regularse mediante la regulación de la S-adenosil metionina descarboxilasa (AMD1), la biosíntesis de poliaminas, la adenosina o una ruta que contiene AMD1 o adenosina. Por consiguiente, la presente descripción proporciona métodos para la regulación de la actividad de la osteopontina en un sujeto así como para el tratamiento o la prevención de afecciones asociadas con una actividad aumentada de la actividad de la osteopontina en un sujeto.

30 La presente invención proporciona MGBG para uso en un método para disminuir la actividad de la osteopontina en una célula. El método comprende poner en contacto una célula con una cantidad eficaz de MGBG que inhibe la S-adenosil metionina descarboxilasa ("AMD1"), inhibe la biosíntesis de poliamina o aumenta la adenosina en la célula.

35 La presente invención proporciona MGBG o una sal de la misma para su uso en el tratamiento de la esclerosis múltiple.

40 La presente descripción proporciona un método para disminuir la secreción de osteopontina a partir de monocitos o macrófagos. El método comprende poner en contacto un monocito o macrófago con una cantidad eficaz de un agente que inhibe la S-adenosil metionina descarboxilasa, inhibe la biosíntesis de poliamina, o aumenta la adenosina en monocitos o macrófagos.

Según otro aspecto más, la presente descripción proporciona un método para disminuir la secreción de osteopontina a partir de monocitos o macrófagos. El método comprende poner en contacto un monocito o macrófago con una cantidad eficaz de un agente que inhibe la S-adenosil metionina descarboxilasa, inhibe la biosíntesis de poliamina o aumenta la adenosina en los monocitos o macrófagos.

45 De acuerdo con otro aspecto más, la presente descripción proporciona un método para disminuir la diferenciación de macrófagos a partir de monocitos. El método comprende poner en contacto un monocito con una cantidad eficaz de un agente que inhibe la S-adenosil metionina descarboxilasa, inhibe la biosíntesis de poliamina o aumenta la adenosina en monocitos.

Estas y otras características de la presente invención se exponen a continuación.

50 **Breve descripción de las figuras**

El experto en la técnica entenderá que los dibujos son sólo con fines ilustrativos.

La figura 1 muestra la estructura de MGBG, SL47 (también denominado SL11047) y SL93 (también denominado SL11093).

5 La figura 2 representa los cambios en los recuentos de células y señales de ARN de OPN, ADA y otros genes inducidos por MGBG en células mononucleares separadas en la base a la expresión de CD14 y CD16 de la superficie celular.

La figura 3 representa los niveles promedio de OPN en CCS de cáncer de mama y PBMC normales tratados con MGBG.

La figura 4 representa los niveles promedio de OPN en CCS de AD y PBMC normales tratados con MGBG.

La figura 5 representa los niveles promedio de OPN en CCS de HIV y PBMC normales tratados con MGBG.

10 La figura 6 representa los niveles promedio de OPN en CCS de ALS y PBMC normales tratados con MGBG.

La figura 7 representa los niveles promedio de OPN en CCS de demencia asociada al SIDA y PBMC normales tratados con MGBG.

La figura 8 muestra que rOPN aumenta la población de células CD14+/CD16+.

15 La figura 9 muestra los resultados con, y sin tratamiento con MGBG (PA001) en macacos infectados en macrófagos en el SNC.

La figura 10 muestra los niveles de OPN en cerebros de animales infectados con VIS con, y sin, tratamiento con MGBG.

La figura 11 muestra los niveles de OPN en los nódulos linfáticos de animales infectados con VIS con, y sin, tratamiento con MGBG. Las muestras BI46 y CB18 se trataron con MGBG, mientras que las BT66 no se trataron.

20 La figura 12 muestra el efecto de MGBG en el ARN de osteopontina en cultivos de PBMC.

La figura 13 muestra el efecto de MGBG en la Producción de Proteína Osteopontina en cultivos de PBMC.

25 La presente invención se basa, al menos en parte, en el descubrimiento de que la osteopontina puede regularse regulando la S-adenosil metionina descarboxilasa ("AMD1"), la biosíntesis de poliaminas, la adenosina o una ruta que contiene AMD1 o adenosina. Por consiguiente, la presente invención proporciona MGBG para uso en la regulación de la actividad de la osteopontina en un sujeto, así como para el tratamiento o la prevención de afecciones asociadas con una actividad aumentada de la actividad de la osteopontina en un sujeto, específicamente SM.

30 La presente descripción proporciona un método para disminuir la actividad de la osteopontina en una célula. El término "osteopontina" se usa indistintamente con "OPN", "SPP1", "Eta-1", sialoproteína I o 44K BPP (fosfoproteína ósea). En general, la osteopontina se refiere a cualquier fragmento completo o parcial de una osteopontina de longitud completa. La osteopontina también puede referirse a cualquier osteopontina modificada, por ejemplo, glicosilada.

35 El término "actividad" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere tanto a la actividad biológica del polipéptido como a la cantidad o nivel de osteopontina presente en la célula. En una realización, el término actividad se refiere a la cantidad de osteopontina, por ejemplo, presente, expresada o producida en la célula. En otra realización, se refiere al nivel de osteopontina secretada por la célula, por ejemplo, por una célula mononuclear.

Según otro aspecto, la presente invención proporciona MGB para uso en un método de tratamiento o para prevenir una afección asociada con una actividad incrementada de la osteopontina específicamente esclerosis múltiple (EM).

40 Un "sujeto" puede ser cualquier animal que sufre una afección asociada con una actividad incrementada de la osteopontina que se puede tratar de acuerdo con los métodos de la invención. Un animal es un organismo vertebrado multicelular vivo, e incluye tanto mamíferos humanos como no humanos.

45 Una "cantidad eficaz" o una "cantidad terapéuticamente eficaz" es una cantidad de un compuesto (por ejemplo, MGBG, un análogo de poliamina o cualquier agente) que es suficiente para conseguir el efecto deseado en un sujeto que se está tratando. Por ejemplo, ésta puede ser la cantidad necesaria para reducir la actividad de la osteopontina o para alterar o aliviar considerablemente los síntomas de una actividad aumentada de la osteopontina. La cantidad eficaz de un compuesto de la presente invención puede variar dependiendo de la vía de administración y de la forma de dosificación. Además, las dosis específicas pueden ajustarse dependiendo de las condiciones de la enfermedad, la edad, el peso corporal, el estado de salud general, del sexo y de la dieta del sujeto, de los intervalos de las dosis, de las vías de administración, de la tasa de excreción y de combinaciones de los agentes.

La presente descripción proporciona un método para disminuir la secreción de osteopontina a partir de monocitos o macrófagos. El método comprende poner en contacto un monocito o macrófago con una cantidad eficaz de un agente que regula la actividad de la osteopontina.

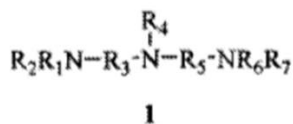
5 Según otro aspecto más, la presente descripción proporciona un método para disminuir la diferenciación de macrófagos a partir de los monocitos. El método comprende poner en contacto un monocito con una cantidad eficaz de un agente que regula la actividad de la osteopontina.

10 El agente útil en los métodos de la invención puede ser cualquier agente que disminuya la actividad de la osteopontina. En una realización, el agente es capaz de inhibir la S-adenosil metionina descarboxilasa ("AMD1") o cualquier ruta que contenga AMD1, por ejemplo, cualquier entidad aguas arriba o aguas abajo de una ruta que contenga AMD1, especialmente cualquier ruta que contenga AMD1 y asociada con la producción de adenosina. En otra realización, el agente es capaz de inhibir la biosíntesis de poliaminas o cualquier ruta implicada en la biosíntesis de poliaminas.

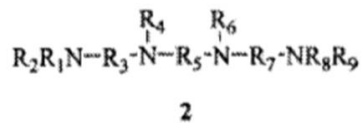
15 Alternativamente, el agente es capaz de aumentar la actividad de la adenosina en la célula, ya sea directamente, o mediante una ruta que contiene adenosina. En general, se entiende que una ruta que contiene AMD1 o adenosina se refiere a una ruta en la que están implicadas AMD1 o adenosina, incluyendo, por ejemplo, como sustrato, catalizador, producto o subproducto.

20 El agente puede ser cualquier tipo de agente conocido o descubierto posteriormente que pueda inhibir la actividad de la enzima S-adenosil metionina descarboxilasa, que pueda inhibir la biosíntesis de poliaminas o que pueda aumentar la actividad de adenosina, por ejemplo, en una célula. En una realización, el agente es un agente químico, incluyendo, pero no limitado a, moléculas orgánicas y sales, derivados protegidos y estereoisómeros de los mismos, moléculas inorgánicas o diversas entidades iónicas o elementales. En otra realización, el agente es un agente biológico o una biomolécula, por ejemplo, un polipéptido, un anticuerpo o un fragmento activo del mismo, o una molécula de ácido nucleico, por ejemplo, RNAi.

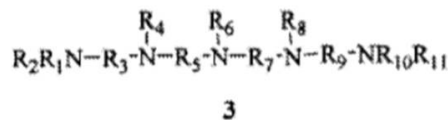
25 De acuerdo con una realización de la presente invención, el agente es un análogo de poliamina o una sal, un derivado protegido, o un estereoisómero del mismo. Cualquier análogo de poliamina es adecuado para su uso en los métodos de la presente invención. Entre los ejemplos de análogos de poliamina usados en los métodos de la invención se incluyen los compuestos de las estructuras 1, 2, 3, 4 y 5, y los correspondientes estereoisómeros, sales y derivados protegidos de los mismos:



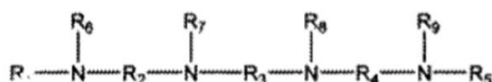
30 donde R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>4</sub>, R<sub>6</sub> y R<sub>7</sub> se seleccionan independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo y arilo, y donde R<sub>3</sub> y R<sub>5</sub> son grupos alquilo;



donde R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>4</sub>, R<sub>6</sub>, R<sub>8</sub> y R<sub>9</sub> se seleccionan independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo y arilo y donde R<sub>3</sub>, R<sub>5</sub> y R<sub>7</sub> son grupos alquilo.



35 donde R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>4</sub>, R<sub>6</sub>, R<sub>10</sub> y R<sub>11</sub>, se seleccionan independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo y arilo, y donde R<sub>3</sub>, R<sub>5</sub>, R<sub>7</sub> y R<sub>9</sub> son grupos alquilo;

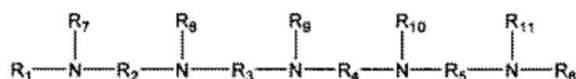


4

donde R<sub>1</sub> y R<sub>5</sub> se seleccionan independientemente del grupo que consiste en metilo, etilo, n-propilo e isopropilo; donde R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub> y R<sub>4</sub> se seleccionan independientemente del grupo que consiste en alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>, cicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-cicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>-alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, arilo C<sub>3</sub>-C<sub>10</sub> y alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-arilo C<sub>3</sub>-C<sub>10</sub>- alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>

5

y donde R<sub>6</sub>, R<sub>7</sub>, R<sub>8</sub>, y R<sub>9</sub> se seleccionan independientemente del grupo que consiste en H, metilo y etilo;



5

donde R<sub>1</sub> y R<sub>6</sub> se seleccionan independientemente del grupo que consiste en metilo, etilo, n-propilo e isopropilo;

R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub> y R<sub>5</sub> se seleccionan independientemente del grupo que consiste en alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>, cicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-cicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>-alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, arilo C<sub>3</sub>-C<sub>10</sub> y arilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>

10

y donde R<sub>7</sub>, R<sub>8</sub>, R<sub>9</sub>, R<sub>10</sub> y R<sub>11</sub> se seleccionan independientemente del grupo que consiste en H, metilo y etilo;

En otra realización, los análogos de poliamina son compuestos de las estructuras 2 y 3, donde R<sub>3</sub>, R<sub>5</sub>, R<sub>7</sub> y R<sub>9</sub> son independientemente grupos (CH<sub>2</sub>)<sub>x</sub>, donde x es un número entero de 2 a 6, y además donde R<sub>4</sub>, R<sub>6</sub> y R<sub>8</sub> son átomos de hidrógeno.

En otra realización más, los análogos de poliamina son los compuestos de las estructuras 2 y 3, en donde R<sub>3</sub>, R<sub>5</sub>, R<sub>7</sub> y R<sub>9</sub> son independientemente grupos (CH<sub>2</sub>)<sub>x</sub>, donde x es un número entero de 2 a 6, y además donde R<sub>4</sub>, R<sub>6</sub> y R<sub>8</sub> son átomos de hidrógeno, y donde R<sub>1</sub> y R<sub>10</sub> son grupos alquilo, y además donde R<sub>2</sub> y R<sub>11</sub> son átomos de hidrógeno.

15

En otra realización más, los análogos de poliamina son compuestos de las estructuras 2 y 3, en donde R<sub>3</sub>, R<sub>5</sub>, R<sub>7</sub> y R<sub>9</sub> son independientemente grupos (CH<sub>2</sub>)<sub>x</sub>, donde x es un número entero de 2 a 6, y además donde R<sub>4</sub>, R<sub>6</sub> y R<sub>8</sub> son átomos de hidrógeno, y donde R<sub>1</sub> y R<sub>10</sub> son grupos alquilo, y además donde R<sub>2</sub> y R<sub>11</sub> son átomos de hidrógeno, y además donde los análogos de poliamina tienen un peso molecular inferior a 500.

20

Otras realizaciones de compuestos de la estructura 4 incluyen aquellas en las que R<sub>6</sub>, R<sub>7</sub>, R<sub>8</sub> y R<sub>9</sub> son H;

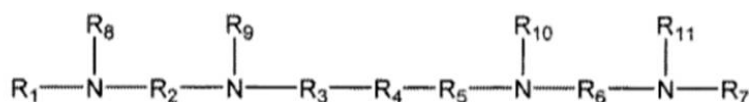
donde R<sub>1</sub> y R<sub>5</sub> son etilo;

donde R<sub>6</sub>, R<sub>7</sub>, R<sub>8</sub> y R<sub>9</sub> son H y R<sub>1</sub> y R<sub>5</sub> son etilo;

y/o donde R<sub>2</sub> y R<sub>4</sub> se seleccionan independientemente del grupo que consiste en alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> y R<sub>3</sub> se selecciona del grupo que consiste en alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>, cicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-cicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>-alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, arilo C<sub>3</sub>-C<sub>10</sub> y alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-arilo C<sub>3</sub>-C<sub>10</sub>- alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>

25

Los análogos de poliamina adicionales útiles en la presente invención incluyen compuestos de la fórmula 6, y los correspondientes estereoisómeros, sales y derivados protegidos de los mismos:



6

30

Donde R<sub>4</sub> es alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>, cicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>, cicloalquenilo C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>, o arilo C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>;

R<sub>3</sub> y R<sub>5</sub> se eligen independientemente de un enlace sencillo, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> o alquenilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>;

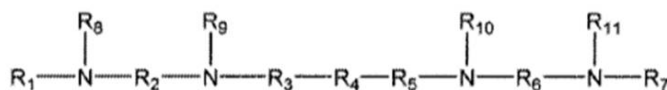
R<sub>2</sub> y R<sub>6</sub> se eligen independientemente de alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, alquenilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, cicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>, cicloalquenilo C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> o arilo C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>;

R<sub>1</sub> y R<sub>7</sub> se eligen independientemente entre H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> o alqueno C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>; y

R<sub>8</sub>, R<sub>9</sub>, R<sub>10</sub>, y R<sub>11</sub> son H.

En ciertas realizaciones de los compuestos de fórmula 6, R<sub>1</sub> y R<sub>7</sub> se eligen independientemente de alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> y alqueno C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>.

- 5 Los análogos de poliamina adicionales útiles en la presente invención incluyen compuestos de la fórmula 7, y los correspondientes estereoisómeros, sales y derivados protegidos de los mismos:



7

donde R<sub>4</sub> es n-alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> o alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> ramificado;

R<sub>3</sub> y R<sub>5</sub> se eligen independientemente de un enlace sencillo o alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>;

- 10 R<sub>2</sub> y R<sub>6</sub> se eligen independientemente entre alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, alqueno C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, cicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>, cicloalqueno C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> o arilo C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>;

R<sub>1</sub> y R<sub>7</sub> se eligen independientemente entre H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> o alqueno C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>; y

R<sub>8</sub>, R<sub>9</sub>, R<sub>10</sub>, y R<sub>11</sub> son H.

- 15 En determinadas realizaciones de los compuestos de fórmula 7, R<sub>2</sub> y R<sub>7</sub> se eligen independientemente entre alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> o alqueno C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>, R<sub>4</sub> es n-alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> saturado o alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> ramificado saturado, y R<sub>3</sub> y R<sub>5</sub> se eligen independientemente de un enlace sencillo o de un alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> saturado.

- 20 Como se usa en el presente documento, una "poliamina" es cualquiera de un grupo de aminas alifáticas de cadena lineal derivadas de manera biosintética de aminoácidos; las poliaminas se revisan en Marton et al. (1995) Ann. Rev. Pharm. Toxicol. 35:55-91. Por "poliamina" se entiende generalmente una poliamina natural o una poliamina que se produce naturalmente en células eucariotas. Los ejemplos de poliaminas incluyen putrescina, espermidina, espermina y cadaverina.

- 25 Como se usa en la presente memoria, un "análogo de poliamina" es un catión orgánico estructuralmente similar pero no idéntico a las poliaminas naturales tales como la espermina y/o espermidina y sus precursores, putrescina diamina. Los análogos de poliamina pueden estar ramificados o no ramificados, o incorporar restos cíclicos. Las poliaminas pueden comprender grupos aminos primarios, secundarios, terciarios o cuaternarios. En una realización, todos los átomos de nitrógeno de los análogos de poliamina son independientemente grupos amino secundarios, terciarios o cuaternarios, pero no están tan limitados. Los análogos de poliamina pueden incluir grupos imina, amidina y guanidina en lugar de grupos amina. El término "análogo de poliamina" incluye estereoisómeros, sales y derivados protegidos de análogos de poliamina.

- 30 Un "estereoisómero" es cualquier isómero óptico de un compuesto, incluyendo enantiómeros y diastereómeros. A menos que se indique otra cosa, las fórmulas estructurales de los compuestos pretenden abarcar todos los estereoisómeros posibles.

- 35 Una "sal" o una "sal farmacéuticamente aceptable" es un compuesto formado por la sustitución de uno o más átomos de hidrógeno por elementos o grupos, que está compuesta de aniones y cationes, que habitualmente se ionizan en agua; se forma una sal, por ejemplo, por neutralización de un ácido por una base. Ejemplos de sales incluyen haluro, por ejemplo cloruro, bromuro o yoduro, nitrato, sulfato, bisulfato, fosfato, fosfato ácido, isonicotinato, acetato, lactato, salicilato, citrato, tartrato, pantotenato, bitartrato, ascorbato, succinato, maleato, gentsinonato, fumarato, gluconato, glucaronato, sacarato, formiato, benzoato, glutamato, metanosulfonato, etanosulfonato, bencensulfonato, p-toluenosulfonato y pamoato (es decir, 1,1' metileno-bis-(2-hidroxi-3-naftoato)).

- 40 "Derivado protegido" se utiliza para referirse a un compuesto protegido con un grupo protector. "Grupo protector" se refiere a un grupo químico que presenta las siguientes características:

- 45 1) reacciona selectivamente con la funcionalidad deseada con buen rendimiento (preferiblemente al menos 80%, más preferiblemente al menos 90%, más preferiblemente al menos 95%, todavía más preferiblemente al menos 99%) para dar un sustrato protegido que es estable en las reacciones proyectadas para las que se desea protección; 2) se puede separar selectivamente del sustrato protegido para producir la funcionalidad deseada; y 3) se puede separar con un buen rendimiento (preferiblemente al menos 80%, más preferiblemente al menos 90%, más preferiblemente al menos 95%, todavía más preferiblemente al menos 99%) mediante reactivos compatibles con los

5 otros grupos funcionales generados en tales reacciones proyectadas. Se pueden encontrar ejemplos de grupos protectores adecuados en Greene et al. (1991) Protective Groups in Organic Synthesis, 2nd ed. (John Wiley & Sons, Inc., Nueva York). Ejemplos de grupos protectores de la funcionalidad amino incluyen, pero no se limitan a mesitilensulfonilo (MesSO<sub>2</sub>), benciloxicarbonilo (CBz), t-butiloxicarbonilo (Boc), t-butildimetilsililo (TBDIMS), 9-fluorenilmetiloxicarbonilo (Fmoc) o grupos protectores fotolábiles adecuados tales como 6-nitroveratrilo carbonilo (Nvoc).

10 Un "alquilo" es un grupo químico cíclico, ramificado o de cadena lineal que contiene carbono e hidrógeno, tal como metilo, butilo, t-butilo, pentilo, ciclopropilo y octilo. Los grupos alquilo pueden estar no sustituidos o sustituidos con uno o más sustituyentes, por ejemplo, halógeno, alcoxi, aciloxi, amino, hidroxilo, mercapto, carboxi, bencilo. Los grupos alquilo pueden ser saturados o insaturados (por ejemplo, que contienen subunidades -C=C o -C≡C), en una o varias posiciones. A menos que se especifique lo contrario, los grupos alquilo comprenderán de 1 a 8 átomos de carbono, pero pueden incluir de 1 a 6, o incluso de 1 a 4 átomos de carbono. "Cicloalquilo" se refiere solamente a grupos alquilo cíclicos, tales como ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, etc. "N-alquilo" se refiere a un grupo alquilo lineal (es decir, de cadena lineal), mientras que "alquilo ramificado" se refiere a grupos alquilo ramificados con exclusión de los grupos alquilo cíclicos y lineales. "Alquenilo" se refiere a un grupo químico cíclico, ramificado o de cadena lineal que contiene carbono e hidrógeno, donde al menos un enlace es monoinsaturado, tal como etenilo, ciclopentenilo o 1,3-butadienilo. Los grupos alquenilo pueden estar sustituidos como se ha indicado para los grupos alquilo. Los grupos alquenilo pueden denominarse cíclicos, lineales (n-alquenilo) o ramificados de una manera análoga a las denominaciones anteriores para un alquilo. Un "arilo" es un grupo carbocíclico aromático insaturado que tiene un anillo único (por ejemplo, fenilo), o múltiples anillos condensados (por ejemplo, naftilo), que pueden estar opcionalmente no sustituidos o sustituidos con amino, hidroxilo, alquilo, alcoxi, cloro, halo, mercapto y otros sustituyentes.

Según otro aspecto de la presente descripción el agente es un resto químico que inhibe la actividad de la S-adenosil metionina descarboxilasa, inhibe la biosíntesis de poliaminas y/o aumenta la actividad de la adenosina.

25 Ejemplos de tales restos incluyen, pero no se limitan a, los enumerados en la Tabla 1. Independientemente de la forma del resto enumerado en la Tabla 1, se entiende que incluye, según corresponda, una sal, un derivado protegido y un estereoisómero de los mismos.

**Tabla 1:** Ejemplos de inhibidores de S-adenosilmetionina descarboxilasa y/o de la biosíntesis de poliamina

<b>Compuesto</b>	<b>Nombre Oficial (No IUPAC)</b>	<b>Pub Chem ID</b>
SAM descarboxilada	s-adenosil-3-metilpropilamina	
Mitoguazona o "MGBG"	Metilglioxal bis(guanil-hidrazona)	5351154
EGBG	Etilglioxal bis(guanil-hidrazona)	9561662
Berenil	Diminazeno o Aceturato de Diminazeno	2354
Pentamidina	4-[5-(4-carbamimidofenoxi) pentoxi]benceno-carboximidamida	4735
	5'-(Dimetilsulfino)-5'-desoxiadenosina	
	S-adenosil-4-metiltio-butirato	
	S-adenosil-S-metil-L-cisteína	
AMA	S-(5'-Desoxi-5'-adenosil)-metiltioetil-hidroxilamina	
EMGBG	Bis(guanilhidrazona) de etilmetilglioxal	9574151
DEGBG	bis(guanilhidrazona) de dietil-metilglioxal	5479208
CGP-33'829	6-((2-carbamimidoil-hidrazono)metil)picolinimidamina	
CGP-36'958		
CGP-39'937	2,2'-bipiridina-6,6'-bis(carboximidamida)	
CPG-48664 o CPG-48664A o SAM 364A	2'-amidohidrazona de 4-amidinoindan-1-ona	5486811

<b>Compuesto</b>	<b>Nombre Oficial (No IUPAC)</b>	<b>Pub Chem ID</b>
AbeAdo o MDL-73811	5'[[Z]-4-amino-2-butenil]metilamino]-5'-desoxiadenosina	6436013
MAOEA	5'-desoxi-5'-[N-metil-N-[2-(aminooxi)etil]amino]adenosina	3081018
MHZPA	5'-desoxi-5'-[N-metil-N-(3-hidrazinopropil)]amino]adenosina	122092
MHZEA	5'-desoxi-5'-[(2-hidrazinoetil)-metilamino]adenosina	
AdoMac	S-(5'-desoxi-5'-adenosil)-1-amonio-4-(metilsulfonio)-2-ciclopenteno	3083364
AdoMao	S-(5'-desoxi-5'-adenosil)-1-aminooxi-4-(metilsulfonio)-2-ciclopenteno	
APA	1-Aminooxi-3-aminopropano	65020
AOE-PU	N-[2-aminooxi)etil]-1,4-diaminobutano	
AP-APA	1-aminooxi-3-N-[3-aminopropil]-aminopropano	
	1,11-bis(etil)noespermina	
BES	1,8-bis(etil)espermidina	
BES	1,12-bis(etil)espermina	
DESPM	N1,N12-dietilespermina	
BE-3-3-3	1,11-bis(etilamino)-4,8-diazaundecano	
BE-4-4-4	1,14- bis(etilamino)-5,10-diazatetradecano	
DEHOP o DEHSPM	Dietilhomoespermina, N1,N14-dietilhomospermina	
DENOP	dietil-noespermina	
BE-4-4-4-4	1,19- bis(etilamino)-5,10,15-triaza-nonadecan	
SL11037	tetrahidrocloruro de N-etil-N'-(2-(3'-etilamino-propilaminometil)-cis-ciclopropilmetil)-propano-1,3-diamina	
SL11038	tetrahidrocloruro de N-etil-N'-(2-(3'-etilamino-propilaminometil)-trans-ciclobutilmetil)-propane-1,3-diamina	
SL11044	tetrahidrocloruro de N-etil-N'-(2-(3'-etilamino-propilaminometil)-trans-ciclopropilmetil)-propano-1,3-diamina	
SL11047 o SL47	tetrahidrocloruro de N,N'-bis(3-etilaminopropil)-cis-but-2-eno-1,4-diamina	
SL11093 o SL93	N,N'-(ciclopropano-1,2-diilbis(metilen))bis(N4-etilbutano-1,4-diamina)	

En otro aspecto más, el agente es un compuesto seleccionado del grupo que consiste en MGBG, MDL73811, CGP48664, Berenil, Pentamidina, SL47 y SL93, o una combinación de dos o más de los mismos. En otra realización más, el agente es MGBG, SL47 o SL93. Las estructuras para MGBG, SL47 y SL93 se muestran en la Figura 1. En otro aspecto más, en los métodos de la descripción se utilizan dos o más agentes para regular la actividad de la osteopontina. Se pueden usar dos o más agentes secuencial o simultáneamente.

5

En un aspecto, el agente es un compuesto seleccionado de la lista de agentes enumerados en la Tabla 1, con la condición de que el agente no sea MGBG. En otro aspecto, el agente no es un análogo de poliamina. En otro aspecto más, el agente no es MGBG o un análogo de poliamina. En aún otro aspecto, el agente no es un inhibidor de biosíntesis de poliamina. En otro aspecto más, el agente es un compuesto seleccionado del grupo que consiste en MDL73811, CGP48664, Berenil y Pentamidina.

10



"MGBG" es 1,1-[metiletanodiolideno]dinitrilodiguanidina y también se conoce como metilglioxal bis(guanilhidrazona), metil-GAG y mitoguanazona. Como se emplea en esta memoria, MGBG incluye la base libre y sales de la misma. Normalmente, pero no necesariamente, se utiliza como dihidrocloruro.

5 El agente también puede administrarse en combinación con una o más entidades. En una realización, la entidad es una entidad terapéutica, que incluye, pero no se limita a, un esteroide u otro agente antiinflamatorio. En otra realización, la entidad es un vehículo farmacéuticamente aceptable.

10 La cantidad eficaz de un agente que inhibe la S-adenosil metionina descarboxilasa o que aumenta la actividad de la adenosina, por ejemplo, en una célula o en un sujeto, puede ser cualquier cantidad que sea suficiente para disminuir la actividad de la osteopontina, por ejemplo en la célula o en el sujeto, normalmente en aproximadamente 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o más. En una realización, la cantidad eficaz de un agente es una cantidad que es suficiente para disminuir la actividad de la osteopontina en un 70% o más. En otra realización, la cantidad eficaz de un agente es una cantidad que es suficiente para disminuir la actividad de la osteopontina en un 80% o más. En otra realización más, el agente inhibe la S-adenosil metionina descarboxilasa y la cantidad eficaz es una cantidad suficiente para activar la adenosina desaminasa ("ADA"). En aún otra realización, el agente inhibe la S-adenosil metionina descarboxilasa y la cantidad eficaz es una cantidad suficiente para aumentar la actividad de la adenosina.

20 La dosis óptima, la frecuencia de administración y la duración del tratamiento con el agente que disminuye la actividad de la osteopontina en un sujeto pueden variar de sujeto a sujeto, dependiendo del estado del sujeto, la edad, el peso del sujeto, la respuesta al tratamiento y la naturaleza de la entidad terapéutica. La dosis óptima y la duración del tratamiento pueden determinarse mejor mediante el control de la respuesta del sujeto durante el transcurso del tratamiento. En algunos casos, la administración de dosis más altas puede permitir una administración menos frecuente, y dosis más bajas pueden requerir una administración más frecuente con el fin de lograr una mejora clínicamente significativa en el estado del sujeto. El agente puede administrarse como una dosis única o en dosis múltiples.

25 Generalmente, una dosis terapéuticamente eficaz del agente de acuerdo con los presentes métodos será una o más dosis de aproximadamente 10 a aproximadamente 1100 mg/m<sup>2</sup>. Los regímenes de dosis más bajas incluyen dosis de 10-200, 10-100, 10-50 y 20-200 mg/m<sup>2</sup>. Los regímenes de dosis más altas incluyen 200-400, 250-500, 400-600, 500-800 600-1000 y 800-1100 mg/m<sup>2</sup>. En una realización, los regímenes de dosis oscilan entre 200 y 400 mg/m<sup>2</sup>. En otra realización, los regímenes de dosis oscilan entre 250 y 500 mg/m<sup>2</sup>. En otra realización más, los regímenes de dosis oscilan entre 600 y 1000 mg/m<sup>2</sup>. En algunas realizaciones, el agente se administra diariamente, una vez por semana, una vez cada dos semanas, o una vez al mes. En una realización, un régimen de dosis que varía de 200-400 mg/m<sup>2</sup> se administra una vez por semana.

En otra realización, se administra una dosis de 250-500 mg/m<sup>2</sup> una vez cada dos semanas.

35 Las dosis pueden ser constantes durante todo el período de tratamiento, o pueden aumentar o disminuir durante el curso del tratamiento. En una realización, el agente se administra una vez a la semana y comienza con la administración de 200 mg/m<sup>2</sup> y aumenta a 300 mg/m<sup>2</sup> y a 400 mg/m<sup>2</sup> en la segunda y tercera semanas, respectivamente. En otra realización, el agente se administra una vez cada dos semanas y se mantiene constante durante toda la duración del tratamiento con la administración de 250 mg/m<sup>2</sup>. Las dosis del agente se pueden administrar durante al menos una semana, al menos dos semanas, al menos tres semanas, al menos cuatro semanas, al menos 6 semanas o incluso al menos 8 semanas. Ajustar la dosis del agente dentro de estos intervalos para un sujeto particular corresponde a la práctica de un médico normal.

45 El agente se puede administrar por cualquier vía convencional normalmente usada para administrar un medicamento que incluye, pero no se limita a, vía intravenosa, vía parenteral (por ejemplo, vía intradérmica, intramuscular o subcutánea), vía oral y vía nasal. El agente se puede administrar como una composición farmacéutica en una variedad de formas incluyendo, pero no limitándose a, líquido, polvo, suspensiones, comprimidos, píldoras, cápsulas, pulverizadores y aerosoles. Las composiciones farmacéuticas pueden incluir diversos aditivos farmacéuticamente aceptables incluyendo, pero no limitándose a, vehículos, excipientes, aglutinantes, estabilizadores, agentes antimicrobianos, antioxidantes, diluyentes y/o soportes. Se describen ejemplos de excipientes y vehículos adecuados, por ejemplo, en "Remington's Pharmaceutical Sciences", Mack Pub. Co., New Jersey (1991). En algunas realizaciones, el agente puede administrarse mediante una infusión intravenosa en una solución acuosa de azúcar. El agente también puede estar asociado con otra sustancia que facilita la administración del agente. Por ejemplo, el agente puede estar asociado a liposomas. Los liposomas, a su vez, se pueden conjugar con la sustancia diana, tal como los receptores de IgGFc.

55 Se proporcionan ejemplos de realización de los presentes métodos en los siguientes ejemplos. Los siguientes ejemplos se presentan para ilustrar los métodos de la invención y para ayudar a un experto en la utilización de los mismos. Los ejemplos no pretenden en modo alguno limitar el alcance de la invención.

**Ejemplos**

Ejemplo 1: Análisis de microarrays de los cambios de expresión génica inducidos por MGBG

Se obtuvieron muestras de sangre de pacientes infectados por VIH (N = 9) con carga viral positiva y recuentos de CD4 reducidos, y controles sanos no infectados con VIH (N = 6). Se recogió sangre en tubos anticoagulantes de heparina y se aislaron las células mononucleares mediante centrifugación en gradiente de Percoll. Las células de cada muestra se dividieron en 2: una mitad recibe MGBG a una concentración de 10 µM y la otra mitad no recibió tratamiento. Posteriormente todas las muestras se cultivaron durante la noche en medio RPMI con suero bovino fetal al 10% a 37°C en condiciones no adherentes. Al día siguiente, las células se recogieron por centrifugación, se lavaron una vez con PBS y se lisaron por resuspensión en TRIZOL, y se preparó el ARN total de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Invitrogen, Carlsbad, CA). La calidad del ARN se verificó mediante la visualización de las bandas de ARNr utilizando un bioanalizador 2100 (Agilent Technologies, véase la Tabla 2 para la relación entre el ARNr de 28 y 18S). Posteriormente el ARN se amplificó para el análisis de microarrays usando un protocolo de amplificación de 2 ciclos de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Affymetrix, Santa Clara, CA). Posteriormente los ARN amplificados se hibridaron con los microarrays 2,0 plus U133 del Genoma Humano (Affymetrix) y los datos de expresión se obtuvieron utilizando un escáner de Affymetrix y los protocolos de GCOS.

Los datos de los microarrays se analizaron con GeneSpring Microarray Suite. Los resultados se normalizaron utilizando un conjunto de 100 grupos de sondas determinado por el fabricante para tener una expresión relativamente invariable en la mayoría de los tipos de células. Los parámetros clínicos de las muestras empleadas, el análisis de calidad de ARN (proporción de picos de ARNr de 28 y 18S) y el número de las 54.675 sondas presentes se presentan en la Tabla 2.

**Tabla 2:** Características de la muestra de ARN y clínica

Muestra	Tipo	% CD14/16	CD14 HLA-DR	CD4 / µl	Carga Viral	% Reducción		rRNA		% Presente	
						14/16	14	-	+	-	+
H5-1293	HIV	68%	1390					1.5	1.7	46.5%	46.7%
H5-1294	HIV	62%	935	12	46.4			1.0	1.9	40.0%	46.8%
H5-1327	HIV	35%	805	43	712	< 0%	< 0%	1.3	1.3	42.9%	45.3%
H5-1333	HIV	53%	861	567	13.6	71%	58%	1.7	1.6	46.6%	47.2%
H6-004	HIV	55%	1161	567	13.6	26%	26%	0.1	0.1	41.2%	43.5%
H6-017	HIV	38%	882	240	31.0		21%	0.1	0.2	44.2%	43.6%
H6-071	HIV	54%	615	11	> 500			1.5	1.4	42.5%	41.4%
H6-144	HIV	38%	557	54	43.0	53%	53%	1.2	1.0	40.3%	37.3%
H6-145	HIV	18%	438	567	13.0	91%	76%	1.3	1.5	46.5%	47.8%
<b>Promedio</b>		<b>46.8%</b>	<b>849</b>	<b>258</b>	<b>124.7</b>	<b>60.3%</b>	<b>46.8%</b>	<b>1.1</b>	<b>1.2</b>	<b>43.4%</b>	<b>44.4%</b>
C6-019	Healthy		469					1.4	1.2	43.3%	41.6%
C6-139	Healthy	41%	1105			54%	26%	1.8	1.8	48.0%	46.6%
C6-146	Healthy	73%	1950			61%	31%	1.7	1.5	47.5%	48.2%
C6-186	Healthy	30%	634					1.8	1.8	49.6%	47.9%
C6-187	Healthy	19%	667					1.8	1.7	48.8%	45.7%
M6-177	ALS	23%	496					1.7	1.8	47.2%	45.0%
<b>Promedio</b>		<b>37.2%</b>	<b>887</b>			<b>57.5%</b>	<b>28.5%</b>	<b>1.7</b>	<b>1.6</b>	<b>47.4%</b>	<b>45.8%</b>

Los espacios en blanco indican que no hay datos disponibles. Los valores de la carga viral se expresan en miles por mililitro de plasma. El % de reducción indica la disminución en la producción de células CD14<sup>+</sup> o CD14/16<sup>++</sup> en presencia de 10µM de MGBG como se determina en el 5º día de cultivo. Se cuantificó el número de células en presencia o ausencia de fármaco por citometría de flujo. El ARNr indica la proporción de picos de ARNr de 28 y 18S determinada por el Bioanalizador 2100 a partir de cada muestra en ausencia (-) y presencia (+) de MGBG. La nota 1.8 a 2.0 se considera una proporción perfecta. El % presente indica el número de sondas llamadas presentes por GCOS de cada muestra en ausencia (-) y presencia (+) de MGBG

Utilizando las señales promedio obtenidas de las muestras de MGBG y no tratadas, 489 sondas están reguladas a la baja por lo menos 1,5 veces y 382 sondas están reguladas al alza por lo menos 1,5 veces. No todas estas sondas cambiaron consistentemente (por ejemplo, siempre reguladas al alza o reguladas a la baja). Por ejemplo, los resultados obtenidos con un conjunto de sondas específicas para TNFα se presentan en la Tabla 2. Aunque el cambio promedio en presencia de MGBG para el conjunto de sonda de TNFα fue una regulación al alza de 8,7 veces, la inspección de los resultados de las muestras individuales indica que 2 de 6 controles y 6 de 9 individuos infectados con VIH cambiaron menos de 2 veces en presencia de MGBG en relación con la incubación sin fármaco (Tablas 3A y 3B). De forma similar, aunque el cambio promedio en la señal de IL10 en presencia de MGBG fue una regulación al alza de 5,6 veces, la inspección de las muestras individuales reveló que el aumento de las señales en presencia de MGBG se produjo principalmente en muestras infectadas con VIH pero no en controles (Tablas 4A y 4B).

**Tabla 3A:** Resultados obtenidos con sonda para TNF $\alpha$ . ID de la sonda = 207113\_s\_at

	C6-139	C6-146	C6-19	C6-186	C6-187	M6-177
<b>MGBG</b>	112.4	308.3	325.3	256.8	725.4	840.6
<b>ON</b>	104.3	150.7	185.7	110.1	147.8	146.1
<b>Proporción MGBG/ON</b>	1.08	2.05	1.75	2.33	4.91	5.75

Las muestras MGBG que no cambian significativamente en presencia de MGBG están sombreadas

**Tabla 3B:** Resultados obtenidos con sonda para TNF $\alpha$ . ID de la sonda = 207113\_s\_at

	H6-144	H6-145	H6-17	H6-4	H6-71	H5-1293	H5-1294	H5-1327	H5-1333
<b>MGBG</b>	518.3	333.2	519.6	64.9	718.3	180.8	2,954	76.4	230.5
<b>ON</b>	258.6	385.7	840.8	67.6	153.9	236.9	29.5	50.3	240.2
<b>Proporción MGBG/ON</b>	2.00	0.86	0.62	0.96	4.67	0.76	100.1	1.52	0.96

Las muestras MGBG que no cambian significativamente en presencia de MGBG están sombreadas

**Tabla 4A:** Resultados obtenidos con sonda para IL10, ID de la sonda = 207433\_a

	C6-139	C6-146	C6-19	C6-186	C6-187	M6-177
<b>MGBG</b>	61.5	414.6	190.2	623.6	279.1	261.6
<b>ON</b>	166.9	195.3	71.2	345.8	458.3	492.2
<b>Proporción MGBG/ON</b>	0.37	2.12	2.67	1.80	0.61	0.53

Las muestras MGBG que no cambian significativamente en presencia de MGBG están sombreadas

**Tabla 4B:** Resultados obtenidos con sonda para IL10, ID de sonda = 207433\_a

	H6-144	H6-145	H6-17	H6-4	H6-71	H5-1293	H5-1294	H5-1327	H5-1333
<b>MGBG</b>	91.7	160	60.9	93.5	311.8	72.2	167.9	80.6	95.4
<b>ON</b>	74.8	13.7	359.4	56.9	12.7	16.7	58	3.5	13.3
<b>Proporción MGBG/ON</b>	1.23	11.68	0.17	1.64	24.55	4.32	2.89	23.03	7.17

Las muestras MGBG que no cambian significativamente en presencia de MGBG están sombreadas

De todos los genes que tuvieron cambios en su señal promedio en presencia de MGBG, seis genes fueron seleccionados para su posterior análisis.

15 Cuatro de los genes fueron regulados a la baja en presencia de MGBG y estos incluyen el receptor IA Fc gamma (FCGR1a o el receptor de alta afinidad IgG o CD64), el receptor de leucocitos tipo inmunoglobulina, la subfamilia A (con dominio TM), el miembro 1 (LILRA1 también denominado LIR6 o CD85 I), la osteopontina (o fosfoproteína 1 secretada o SPP1), y la secretogranina V o proteína 1 neuroendocrina de gránulos secretores (SGNE1). Dos de las proteínas habían aumentado la señal en presencia de MGBG y estas incluyeron la adenosina desaminasa (ADA) y la interleuquina 24 (IL24). Las señales obtenidas en los experimentos de microarrays con estos seis genes se presentan en la Tabla 5. El cambio calculado obtenido en cada muestra se presenta en la Tabla 6. FCGR1A y LILRA1 se regulan al alza en más de 2 veces por MGBG en 6 de 9 y 5 de 9 muestras de VIH, respectivamente, pero no en muestras control que tuvieron cambios mucho más variables que los individuos infectados con VIH. SPP1 y SGNE1 exhiben 2 o más reducciones en las señales en 12 y 13 de las 15 muestras evaluadas. También hay que tener en cuenta la falta de cambios en sentido contrario. ADA está regulada al alza consistentemente por MGBG en todas las muestras analizadas. IL24 se regula al alza después de la exposición a MGBG en muestras infectadas con VIH pero no en los controles. Por consiguiente, estos seis genes se evaluaron más a fondo mediante PCR cuantitativa en tiempo real con transcriptasa inversa.

**Tabla 5:** Señales obtenidas con los 6 genes modificados más consistentemente

Muestra	FCGR1a		LILRA1		SPP1		SGNE1		ADA		IL24	
	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
H5-1293	264	2416	21	137	64	3875	14	45	1845	578	350	65
H5-1294	33	142	1	18	22	9523	8	488	4290	84	1364	247
H5-1327	14	38	15	37	1684	2276	79	188	832	231	59	23
H5-1333	347	874	164	81	487	2789	44	130	5472	376	577	127
H6-004	415	917	40	44	1480	8780	17	751	769	130	111	25
H6-017	461	201	129	369	113	7689	7	1039	6724	3365	85	3376
H6-071	59	723	10	148	34	1938	10	99	6874	376	1940	10
H6-144	800	1012	65	413	143	247	13	40	1964	839	178	294
H6-145	1561	2078	246	187	458	2772	12	80	7488	336	375	14
Promedio	439	933	77	159	498	4432	23	318	4029	702	560	465
C6-019	136	40	73	1055	53	5314	13	1603	5384	1509	578	2035
C6-139	51	91	42	313	81	1972	2	265	2900	1014	206	173
C6-146	612	188	99	191	264	988	3	33	5895	1055	1549	474
C6-186	53	46	94	344	232	1629	45	208	5781	1559	925	788
C6-187	1362	68	212	647	1519	3456	13	122	6428	1519	163	748
M6-177	1435	494	277	3219	1647	1080	2	112	6731	2104	166	360
Promedio	608	155	133	962	633	2407	13	391	5520	1460	598	763

**Tabla 6:** Cambios de los seis genes modificados más consistentemente

Genes regulados a la baja en MGBG: proporción ON/MGBG									
Gen:	H5-1293	H5-1294	H5-1327	H5-1333	H6 - 4	H6 - 17	H6 - 71	H6 - 144	H6 - 145
FCGRIA	9.2	4.3	2.7	2.5	2.2	<b>0.4</b>	12.3	1.0	0.9
LILRA1	6.5	13.8	2.4	0.5	1.1	2.9	14.6	1.3	1.3
SPPI	60.5	438.8	1.4	5.7	5.9	68.0	57.9	4.2	1.2
SGNE1	3.3	58.8	2.4	3.0	45.5	159.8	10.1	6.3	0.8
Gen:	C6 - 139	C6 - 146	C6 - 19	M6 - 177	C6 - 186	C6 - 187			
FCGRIA	1.3	<b>0.3</b>	<b>0.3</b>	<b>0.3</b>	0.9	<b>0.1</b>			
LILRA1	1.8	<b>0.3</b>	<b>0.3</b>	11.6	3.7	3.1			
SPPI	47.8	11.5	43.9	0.7	7.0	2.3			
SGNE1	7.4	1.9	14.4	53.3	4.7	9.3			
Genes regulados al alza en MGBG: proporción MGBG/ON									
Gen:	H5-1293	H5-1294	H5-1327	H5-1333	H6 - 4	H6 - 17	H6 - 71	H6 - 144	H6 - 145
ADA	3.2	51.2	3.6	14.6	5.9	2.0	18.3	2.3	22.3
IL24	5.4	5.5	2.6	4.5	4.5	<b>0.03</b>	192.1	0.6	26.0
Gen:	C6 - 139	C6 - 146	C6 - 19	M6 - 177	C6 - 186	C6 - 187			
ADA	2.9	5.6	3.6	3.2	3.7	4.2			
IL24	1.2	3.3	<b>0.3</b>	0.5	1.2	<b>0.2</b>			

5 *Cambio (regulación a la baja en el panel superior, regulación al alza en el grupo inferior) en presencia de 10 µM de MGBG. Las casillas sombreadas no se modificaban significativamente. Los números en negrita indican muestras que tuvieron cambios en la señal de más de 2 veces en el sentido contrario a la mayoría de las muestras de un gen dado.*

Ejemplo 2: Confirmación por RT-PCR cuantitativa de los genes afectados por MGBG

10 Para evaluar el efecto de MGBG en la expresión génica, se obtuvieron muestras de sangre de pacientes (N = 18, 10 infectados con VIH y 8 controles sanos). Las células mononucleares se aislaron mediante centrifugación en gradiente de Percoll. Las células se dividieron en dos tubos, uno tratado con 10 µM de MGBG y el otro no tratado. Posteriormente las células se cultivaron durante la noche en medio RPMI más suero bovino fetal al 10% a 37°C en condiciones no adherentes, se recogieron, se lisaron usando una solución de Trizol y se preparó el ARN total de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Invitrogen, Carlsbad, CA).

15 Aproximadamente 200 ng del ARN total preparado de cada muestra se convirtieron en ADNc utilizando el kit de síntesis de ADNc de First Strand para el kit de RT-PCR [AMV] (Roche Applied Diagnostics, Indianapolis, IN) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Posteriormente se utilizaron aproximadamente 5 ng de la muestra de ADNc para la llevar a cabo una PCR en un LightCycler (Roche Applied Diagnostics, Indianapolis, IN) usando el kit LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I. Las condiciones de PCR son las siguientes: 1 ciclo de desnaturalización a 95°C durante 10 minutos, seguido de 45 ciclos de 95°C durante 10 segundos, 68°C durante 10 segundos y 72°C durante 16 segundos.

20 A continuación se enumeran las secuencias de los cebadores específicos de los genes evaluados. Todas las muestras se amplificaron también con el grupo de Primer-LightCycler (Roche Diagnostics) de β-actina humana.

Tabla 7: Cebadores empleados para la RT-PCR cuantitativa (QRT-PCR)

Gen	Sentido (5' → )	Antisentido (5' ←)
G1P3	AGCAGCGTCGTCATAGGTAAT SEQ ID NO: 1	ACAGGAGGATCACTTGAGGCT SEQ ID NO: 2
TGFB1	CCAGCATCTGCAAAGCTCC SEQ ID NO: 3	TTGTACAGGGCCAGGACCTT SEQ ID NO: 4
CSF3R	TGTTCGGCCTCCTGCTGTT SEQ ID NO: 5	GCTTCTTTTCATCCTCCTCCA SEQ ID NO: 6
GPR43	TGCTACGAGAACTTCACCGAT SEQ ID NO: 7	GAAGCACACCAGGAAATTGA SEQ ID NO: 8
MX2	TCTTCCCTGACCTTCACGAA SEQ ID NO: 9	CATTTATTAAGCAGTTACAATGCTG SEQ ID NO: 10
TNFSF10	CTACCTCATATCAGTTTGCTAGCAG SEQ ID NO: 11	CGATCTTTTAGTGGTGCCTCTT SEQ ID NO: 12
IFIT2	CAGTAAAGAGCTTACTCCTGTAGCG SEQ ID NO: 13	AAGCCTCAGAACTGTGCTCCATT SEQ ID NO: 14
FCAR	GACTTCCCATGCCTTTCAT SEQ ID NO: 15	ACCGAATCTGTAGTGCCTTA SEQ ID NO: 16
ORM1	CGACAGGACCAGTGCATCTAT SEQ ID NO: 17	AACTCTCCAGTTGCTCCTT SEQ ID NO: 18
TNFRSF10c	CCCAGCTGCTGAAGAGACAAT SEQ ID NO: 19	ATGATCCCTACGATGGTGCAT SEQ ID NO: 20
CLECSF7	GGATAGCTGTTGTTTCAGAGAAAGG SEQ ID NO: 21	CTTCTCACAAATACTATATGAGGGC SEQ ID NO: 22
GPR86	AACACGACCATCGTAGGGTGA SEQ ID NO: 23	TTGAGGTGATGGTGGGATA SEQ ID NO: 24
CSPG2	CACCGATGGCCATGTAAATA SEQ ID NO: 25	TGTCCAGGAAAAGCCATCTT SEQ ID NO: 26
CD14	TGGAACAGGTGCCTAAAGGA SEQ ID NO: 27	ACAGGGTCGAACGTGCACA SEQ ID NO: 28
NBS1	TGAATGAGGAGTTCTGGTACCT SEQ ID NO: 29	AGTCAAGCCACAGACTAGGTGTAA SEQ ID NO: 30
CHI3L1	ACACAGATTTGAGCTCAGCCC SEQ ID NO: 31	ATGTTGGCTCCTTGGTGAT SEQ ID NO: 32
CLEC4E	AGGTATTAAGCCCAGTGCCTAA SEQ ID NO: 33	GAAAATTATGTCTTTTGTGGGAACA SEQ ID NO: 34
SIGLEC5	TTTCTGAGATGAAGTCGAGGG SEQ ID NO: 35	TCTGCTGGAGCACTTAAACA SEQ ID NO: 36
GPR109B	AATTGTGTTGCTCCTGGAGGA SEQ ID NO: 37	CAATGCCATTTCTTTCCCA SEQ ID NO: 38
TNFa	Quantitect cat # QT01079561	104 bp amplicon
lQgag	TTGCCATGGTTCCAGAACAAG SEQ ID NO: 39	GGGATTTTTCTTGTGTTTTCA SEQ ID NO: 40
8pGAG	AGTATGGATCTCAGGCGGT SEQ ID NO: 41	CATCGGTTGTAACATTACC SEQ ID NO: 42
PI3	ATGGCCTTAGCTCTTAGCCAA SEQ ID NO: 43	GCTCTGCGCTTTGACTTTA SEQ ID NO: 44
IL1RN	AGACCTTCTATCTGAGGAACAACCA SEQ ID NO: 45	TTGTCCTGCTTTCTGTTCTCG SEQ ID NO: 46
IL6	TCCACTGGGCACAGAACTTAT SEQ ID NO: 47	TCTGGCTCTGAAACAAAGGA SEQ ID NO: 48
IL1A	TGCCTTCTGCTTTTAAAGTTGC SEQ ID NO: 49	GATGAAGGGGTTCCCATAAA SEQ ID NO: 50
SPP1	AGCCACAAGCAGTCCAGATTAT SEQ ID NO: 51	TTGACCTCAGAAGATGCACTATC SEQ ID NO: 52
FCGR1A	ACTCTGGGTTATACTGGTGCGA SEQ ID NO: 53	CAAAGAGATTTCTAAATCCAC SEQ ID NO: 54
SGNE1	TCCCTGTGAATGACAGCATGT SEQ ID NO: 55	AAACTGCAAGAAATCTGAGCC SEQ ID NO: 56
LILRA1	CAGTCAGGCAGAAGTATGCAAA SEQ ID NO: 57	TCCCTTGTCTAGAAAGTTGAGG SEQ ID NO: 58
ADA	GCTACCACACCCTGGAAGA SEQ ID NO: 59	CCGTTTGGTCATCTGGTAATC SEQ ID NO: 60
IL24	AACAGAGAGGGATGCTTGAT SEQ ID NO: 61	CACCAAGGGAAAGGGATGAT SEQ ID NO: 62

De los genes evaluados, MGBG tiene el mayor efecto sobre SPP1 (Tabla 8). Regula a la baja consistentemente los niveles de SPP1 en todas las muestras sin clasificar examinadas, con cambios entre no tratadas y tratadas de hasta 300 en determinadas muestras. IL1RN parece estar regulado a la baja, aunque no tan consistentemente (15 de 18 muestras) como SPP1. SGNE3 también parece estar mayoritariamente regulado a la baja, aunque el nivel de inhibición en la mayoría de las muestras es bajo. Los genes que están regulados al alza por MGBG incluyen ADA e IL24. ADA está fuertemente inducida y se regula al alza en todas las muestras excepto una. IL24 no mostró un patrón consistente de cambio en presencia de MGBG (Tabla 8). Estos resultados contrastan con los resultados obtenidos por QRT-PCR con muchos otros genes, en la Tabla 9 se presentan los resultados de 6 genes cuya transcripción parece no estar afectada por MGBG. Por lo tanto, los efectos de MGBG sobre la osteopontina y la adenosina desaminasa son altamente específicos.

**Tabla 8:** Cambio de 5 genes identificados por microarray por QRT-PCR

Muestra	Genes regulados a la baja			Genes regulados al alza	
	SPP1	IL1RN	SGNE3	IL24	ADA
H1293	<b>-18.90</b>	<b>-4.92</b>	1.79	<b>2.50</b>	<b>3.01</b>
H1294	<b>-300.25</b>	<b>-2.31</b>	<b>-7.11</b>	-2.41	<b>3.76</b>
H1327	<b>-2.14</b>	<b>-8.28</b>	<b>-2.50</b>	-1.48	1.16
H1333	<b>-18.90</b>	<b>-17.75</b>	<b>-4.41</b>	-1.30	<b>7.16</b>
H6_4	<b>-20.11</b>	<b>-10.41</b>	1.58	<b>5.35</b>	<b>16.80</b>
H6_17	<b>-83.87</b>	<b>-3.73</b>	<b>-3.25</b>	1.20	<b>4.69</b>
H6_71	<b>-6.59</b>	1.12	-1.30	1.09	<b>18.77</b>
H6_144	-1.30	-1.73	<b>-2.39</b>	-1.13	<b>2.33</b>
H6_145	<b>-8.82</b>	-1.36	<b>-2.43</b>	1.12	<b>13.00</b>
H1334	<b>-95.67</b>	<b>-14.22</b>		<b>11.88</b>	<b>3.34</b>
C6_139	<b>-7.89</b>	-1.87	-1.48	<b>2.57</b>	<b>5.90</b>
C6_146	-1.95	-1.78	1.61	<b>2.55</b>	<b>10.06</b>
C6_19	<b>-46.21</b>	<b>8.63</b>	<b>-3.61</b>	<b>2.25</b>	<b>7.52</b>
C6_186	<b>-5.90</b>	<b>-2.27</b>	-1.66	1.01	<b>4.23</b>
C6_187	<b>-2.11</b>	1.59	-1.13	-1.17	<b>7.21</b>
C5_75	<b>-6.15</b>	<b>-8.17</b>		1.92	1.38
C5_76	-1.28	<b>-19.56</b>		1.32	-0.73
C5_78	<b>-467.88</b>	-1.77		1.79	<b>6.68</b>
Promedio	-60.9	-4.9	-1.9	1.6	6.5
STDEV	+/- 124.2	+/- 7.1	+/- 2.5	+/- 3.2	+/- 5.3
MIN	-467.9	-19.6	-7.1	-2.4	-0.7
MAX	-1.3	8.6	1.8	11.9	18.8
% de cambio >2 veces	<b>83 %</b>	<b>55 %</b>	<b>50 %</b>	<b>33 %</b>	<b>83 %</b>

La Tabla 8 muestra los genes afectados por MGBG en las muestras sin clasificar. Los números representan el cambio entre no tratados y tratados. Los números negativos indican reducción y los números positivos representan aumento del cambio. Las muestras que no fueron evaluadas con un gen particular están sombreadas en gris. Las reducciones o incrementos significativos ( $\geq 2$  veces) están en negrita. Como se muestra, OPN o SPP1 están altamente inhibidos después del tratamiento con MGBG.

15

**Tabla 9:** Resultados obtenidos con seis genes que no estaban afectados por MGBG

Muestra	G1P3	MX2	IL6	NBS1	FCGR1A	LILRA1
H1293	<b>-2.85</b>	1.13	1.74	<b>-4.35</b>	<b>-10.78</b>	1.34
H1294	1.47	<b>-2.11</b>	<b>-6.15</b>	<b>-8.51</b>	<b>-17.15</b>	<b>-4.79</b>
H1327	1.22	<b>-2.85</b>	-1.09	<b>-2.51</b>	<b>-2.22</b>	-1.31
H1333	-1.66	1.23	<b>-5.46</b>	-1.89	<b>-3.86</b>	1.28
H6_4	1.68	<b>6.06</b>	<b>14.72</b>	<b>3.63</b>	1.05	<b>13.45</b>
H6_17	1.92	2.03	<b>-5.31</b>	1.68	-1.61	-1.91
H6_71	-1.25	-1.09	<b>3.71</b>	1.25	-1.84	1.01
H6_144	1.31	1.16	1.04	1.35	-1.01	<b>-3.10</b>
H6_145	-1.25	-1.01	1.01	-1.56	-1.72	1.31
H1334	<b>-2.03</b>	<b>4.35</b>	<b>-2.93</b>	<b>2.07</b>	<b>-3.73</b>	
C6_139	-1.14	1.56	<b>-4.17</b>	3.51	1.72	-2.87
C6_146	<b>-2.04</b>	<b>-2.81</b>	<b>2.20</b>	-1.09	<b>5.94</b>	1.52
C6_19	2.13	<b>3.07</b>	<b>2.83</b>	<b>3.51</b>	<b>2.39</b>	<b>-3.97</b>
C6_186	-1.14	1.16	-2.71	1.04	-1.97	<b>-2.27</b>
C6_187	1.22	-1.33	<b>-4.06</b>	<b>4.08</b>	<b>19.03</b>	1.11
C5_75	<b>-2.99</b>	-1.77	1.74	<b>2.31</b>	1.16	
C5_76	<b>-6.63</b>	<b>-3.27</b>	1.30	1.14	-0.41	
C5_78	-1.95	1.36	1.46	1.27	-0.43	
Promedio	0.96	1.55	1.91	1.65	<b>2.25</b>	1.71
STDEV	0.57	1.52	3.35	1.26	4.42	3.41
MIN	<b>-6.63</b>	<b>-3.27</b>	<b>-6.15</b>	<b>-8.51</b>	<b>-17.15</b>	<b>-4.79</b>
MAX	<b>2.13</b>	<b>6.06</b>	<b>14.72</b>	<b>4.08</b>	<b>19.03</b>	<b>13.45</b>

## Ejemplo 3: Evaluación de los cambios inducidos por MGBG para OPN, ADA y otros genes

Los cambios inducidos por MGBG en diferentes tipos de células sanguíneas se determinaron para la osteopontina y la adenosina desaminasa y para otros 7 genes. Para este experimento, se obtuvieron muestras de sangre de 6 controles sanos (3 hombres / 3 mujeres de 20 a 55 años de edad) y las células mononucleares se aislaron mediante centrifugación en gradiente de Percoll. Posteriormente, las células se incubaron durante 3 horas en un medio RPMI más suero bovino fetal al 10% a 37°C. En ese momento se añadió MGBG 10 µM a la mitad de cada muestra y después se incubaron las células a 37°C durante 20 horas más. Las células se unieron a perlas magnéticas recubiertas con anticuerpos de CD16 humano. Las células unidas (que expresan CD16) se separaron de las células no unidas utilizando un AutoMACs de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Miltenyi, Auburn CA). A continuación, las células CD16+ se liberaron de las perlas magnéticas y ambas células CD16+ y CD16- se combinaron con las perlas magnéticas recubiertas con anticuerpos de CD14 humano. Las células unidas a anticuerpo y las no unidas se separaron después usando el aparato de AutoMACs. Esto da lugar a cuatro fracciones celulares diferentes:

1. Células que no expresan CD16 ni CD14 (Células -/-). Se trata principalmente de linfocitos T;
2. Células que sólo expresan CD16. Esto incluye la contaminación de granulocitos no eliminados por la centrifugación con Percoll y los monocitos CD16+ con expresión muy baja de CD 14;
3. Células que expresan CD16 y CD14. Esto incluye monocitos que expresan CD16+ y macrófagos (que expresan altos niveles de ambos); y
4. Células que sólo expresan CD 14. Esto incluiría la mayoría de los monocitos humanos normales.

Después de la separación, las células de cada fracción se lavan con PBS y se determina el número de células viables por exclusión de azul de tripano. Posteriormente se prepara el ARN a partir de cada grupo celular usando TRIZOL, de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Los resultados obtenidos se presentan en la Figura 2. Se puede apreciar que de las cuatro fracciones celulares, las células -/- son las más numerosas con un rendimiento promedio de 4,2 millones de células. Se aislaron



aproximadamente diez veces menos células CD14+ y doble positivas ( $4.7$  y  $3.8 \times 10^5$  células, respectivamente). El número más bajo de células corresponde a la fracción simple positiva de CD16 que tenía un rendimiento promedio de  $6,0 \times 10^4$  células. Los niveles de beta-actina medidos por QRT-PCR reflejaron con precisión los recuentos de células con los ciclos de umbral más altos obtenidos a partir de CD16+ y los valores más bajos de las células doble negativas. Para la osteopontina, las señales más altas de  $\beta$ -actina normalizada se obtuvieron a partir de monocitos CD14+ y monocitos CD14/16++ y macrófagos. Después de la exposición a la osteopontina, los niveles de ARN de la fracción de monocitos CD14+ fueron los que más disminuyeron con una reducción promedio de 4,8 veces (0,21 de no MGBG) que fue significativamente menor que 1,0 (sin cambio) con la prueba de los rangos con signo de Wilcoxon ( $p = 0,03$ ). Por el contrario, los cambios inducidos por MGBG en las células CD14/16 ++, células CD16+ y células doble negativas fueron 0,61, 1,12 y 0,70, respectivamente. Ninguno de estos cambios fue significativamente diferente de 1.0. Por lo tanto, en individuos sanos la exposición a MGBG reduce de forma reproducible las señales de ARN de osteopontina en monocitos.

Para la adenosina desaminasa, los niveles de la señal de ARN fueron aproximadamente iguales en las cuatro fracciones de células (niveles de actina de 1 al 10%). La exposición a MGBG dio lugar a aumentos significativos en la transcripción de ADA en monocitos CD14 (cambio promedio de 10,8 veces,  $p = 0,0156$ ). Se observaron cambios mucho menores pero todavía significativos en las células CD14/CD16++ (cambio promedio 2,8 veces). Las células doble negativas y las células CD16+ no cambiaron significativamente. Por lo tanto, como en el caso de la osteopontina, los cambios de ARN en los monocitos se observan principalmente tras la exposición a MGBG. Se detectan cambios más pequeños también en las células CD14/CD16 doble positivas. Por tanto, los monocitos y los macrófagos son los objetivos celulares primarios de MGBG.

Para determinar si el tratamiento con MGBG podría afectar globalmente a los monocitos y a los macrófagos estudiamos cuatro genes adicionales que se sabe que están altamente expresados en monocitos y macrófagos. Los genes eran CD14 (que proporciona también un nivel de control de calidad en las separaciones celulares) y el antagonista del receptor de interleucina 1 (IL1RN), el receptor 43 acoplado a G (GPR43, también conocido como receptor de ácidos grasos libres) y la citoquina TNF $\alpha$ . Para todos los cuatro genes los niveles de ARN de los monocitos y macrófagos oscilaron de 10 a 100 veces más que los observados en los linfocitos doble negativos.

IL1RN CD 14 y TNF $\alpha$  tenían niveles de señal de ARN aproximadamente iguales tanto en monocitos CD14+ como en macrófagos CD14/CD16 ++. Para GPR43, el promedio de los niveles de ARN fue 5 a 10 veces mayor en las células CD14/16++ en relación con los monocitos CD14+. La exposición a MGBG no dio lugar a una clara tendencia en los cambios de expresión. En particular, la exposición a MGBG disminuyó significativamente la señal de ARN de TNF $\alpha$  en los monocitos (señal promedio= 0,32,  $p = 0,03$ ), pero no las señales de los otros 3 genes. En contraste, la exposición a MGBG causó un ligero aumento en la expresión de GPR43 (señal promedio= 2,4,  $p = 0,03$ ) y una ligera disminución en las señales de ARN para CD14 (señal promedio= 0,55,  $p = 0,02$ ) en los macrófagos CD14/CD16 ++. Por tanto, la evaluación de otros genes específicos de monocitos y macrófagos proporcionó evidencia de un efecto global y sistemático de MGBG en la expresión de genes en esas células. Por lo tanto, los efectos más profundos de MGBG sobre la osteopontina y la adenosina desaminasa son específicos.

Ejemplo 4: Efecto de MGBG sobre la secreción de la proteína osteopontina.

Se aislaron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de pacientes diagnosticados con esclerosis lateral amiotrófica (ALS), enfermedad de Alzheimer (AD), virus de inmunodeficiencia humana (VIH), cáncer de mama, demencia asociada al SIDA y donantes sanos. La sangre heparinizada se mezcló con volúmenes iguales de disolución salina tamponada con fosfato estéril (PBS libre de Ca $^{++}$ , Mg $^{++}$ ) y se dispuso en capas sobre Percoll (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ) a 1,087 g/ml. Las células se centrifugaron y se recogió la capa de células mononucleares. Las PBMC se cultivaron en una concentración de  $1 \times 10^6$  células/ml en condiciones no adherentes en tubos de polipropileno que contenían un medio completo (RPMI 1640, 10% de suero bovino fetal (HyClone, Logan, UT), 1% de piruvato sódico y se incubaron en una incubadora humidificada a 37°C, con 5% de CO $_2$ . Las células se cultivaron en presencia de MGBG 0  $\mu$ M, 0,1  $\mu$ M, 1  $\mu$ M, 10  $\mu$ M o 100  $\mu$ M más medio completo y al quinto día se aislaron los sobrenadantes del cultivo celular (CCS) y se congelaron a -20° C hasta que estuvieron listos para ser probados.

Se midieron los niveles de osteopontina humana (OPN) con el kit ELISA de Osteopontina Humana (R & D Systems, Inc., Minneapolis, MN) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los CCS se examinaron por duplicado y se utilizó el software Magellan v. 4.0 (Salzburgo, Austria) para analizar los resultados.

Se midieron los niveles promedio de OPN (ng/ml) en MGBG 0  $\mu$ M, 0,1  $\mu$ M, 1  $\mu$ M, 10  $\mu$ M o 100  $\mu$ M. Los resultados se representan en las figuras 3-7 como un gráfico que compara la muestra enferma con la muestra normal. En las figuras 3-7, cada punto en el gráfico es el promedio de cada muestra con el error estándar representado como barras de error. Las líneas continuas representan células enfermas y las líneas discontinuas representan células normales.

Los niveles promedio de OPN obtenidos de los CCS de las muestras sanas/normales ( $n = 3$ ) fueron de 270, 9,69, 4,85, 1,07 y 0,14 ng/ml en cultivos con MGBG 0  $\mu$ M, 0,1  $\mu$ M, 1  $\mu$ M, 10  $\mu$ M o 100  $\mu$ M, respectivamente. Los niveles promedio correspondientes de OPN obtenidos a partir de los CCS de muestras de cáncer de mama ( $n = 3$ ), como se

muestran en la figura 3, fueron 125, 96, 20,89, 8,87, 2,12 y 0,84 ng/ml. Los niveles promedio correspondientes de OPN obtenidos a partir de los CCS de la muestra de AD (n = 1), como se muestra en la figura 4, fueron 0,926, 0,477, 0,201, 0,136 y 0 ng/ml. Para AD, cada punto en el gráfico es el promedio de los duplicados ensayados en la placa ELISA. Los niveles promedio correspondientes de OPN obtenidos a partir de los CCS de muestras de HIV (n = 2), como se muestra en la figura 5, fueron 78.698, 11.833, 3.481, 0.447 y 0 ng / ml.

Las PBMC obtenidas a partir de pacientes de ALS y con demencia asociada al SIDA se ensayaron solamente con 0  $\mu$ M y 10  $\mu$ M. El promedio de los valores CCS de ALS (n = 2), como se muestra en la figura 6, fueron 525.644 (0  $\mu$ M) y 17.669 (10  $\mu$ M); y el valor promedio de los valores CCS de la demencia asociada al SIDA (AIRL2005-374), como se muestra en la figura 7, fue 30.958 (0  $\mu$ M) y 0.8905 (10  $\mu$ M). Los datos de viabilidad celular mostraron que las células para cada concentración de MGBG eran al menos 75% viables cuando se recogieron los CCS.

Adicionalmente, se investigaron las células a las que se dirige MGBG. El análisis fenotípico mostró que las concentraciones crecientes de MGBG dieron lugar a una disminución de los rendimientos de los macrófagos CD14+ pero no afectaron a los niveles de las células CD16+/CD14. Para elucidar los efectos de MGBG y OPN en la motilidad celular, se llevaron a cabo ensayos de migración. MGBG 10  $\mu$ M inhibió la producción de osteopontina de los macrófagos desde >200 ng/ml hasta niveles no detectables mientras que simultáneamente inhibía la invasión de células HeLa en una matriz de Matrigel. Los resultados muestran que MGBG inhibe la producción de OPN de células mononucleares in vitro y que la inhibición de OPN por MGBG es suficiente para inhibir la migración celular.

Ejemplo 5: Efecto de la eliminación de la osteopontina extracelular en la diferenciación de los macrófagos

Para observar los efectos del anticuerpo bloqueador de OPN sobre la activación de los macrófagos, se añadieron 10  $\mu$ g de anticuerpo (Immuno-Biological Laboratories, Inc., Minneapolis, MN) a cultivos de PBMC no adherentes durante 24 y 72 horas. Las células se etiquetaron con CD14-TriColor (Invitrogen, Carlsbad, CA) anti-humano de ratón y CD16-FITC anti-humano de ratón (isotiocianato de fluoresceína, Dako, Carpintería, CA) según sugerencia del fabricante; se utilizó también un control de isotipo. Se analizaron los monocitos CD14+ y los macrófagos CD14+/CD16+ por citometría de flujo a las 24 y 72 horas después del aislamiento celular (BD FACScan, San José, CA con el software FACS Express 3). Los resultados mostraron que la incubación con anticuerpos neutralizantes de la osteopontina aumentó 5,9 veces el rendimiento de los monocitos CD14+ a las 24 horas (CD14+ 2,5% en presencia de Ab de SPP1 frente a 0,4% con Ab de control) y 16,9 veces a las 72 horas (CD14+ 3,7% vs 0,2%). Adicionalmente, a las 24 horas, el rendimiento de los macrófagos CD14/16++ se redujo 4,5 veces en presencia de los anticuerpos neutralizantes de osteopontina (0,6 vs 2,5% en presencia de Ab de control). Además, las células CD14/16++ aisladas en presencia de anticuerpos neutralizantes de osteopontina nunca alcanzaron el aumento típico de dispersión lateral visto en condiciones normales. Por tanto, la eliminación de la osteopontina evita la diferenciación normal de los macrófagos y aumenta la prevalencia de los monocitos CD16.

Ejemplo 6: Efecto de la adición de OPN exógena en el rendimiento de macrófagos

Para determinar el papel del OPN humana recombinante exógena (rOPN) en la activación de macrófagos, se añadieron 10  $\mu$ g/ml de rOPN (R & D Systems, Inc., Minneapolis, MN) a cultivos de PBMC no adherentes cultivados en suero completo o en medio sin suero durante 24 y 72 horas, y se analizaron mediante citometría de flujo. Las células se etiquetaron con (eje-x) TriColor-CD14 anti-humano de ratón (Invitrogen, Carlsbad, CA) y con (eje Y) FITC-CD16 anti-humano de ratón (isotiocianato de fluoresceína, Dako, Carpintería, CA), según sugerencia del fabricante. Como se observa en la Figura 8, el rOPN aumenta la población de células CD14+/CD16+. A las 24 horas, las células incubadas con rOPN en medio completo no tuvieron acumulación significativa de células CD14+/CD16+ en comparación con el control (sin rOPN en el medio). Sin embargo, a las 72 horas se observó un aumento de 11 veces en las células CD14+/CD 16+ en las células incubadas con rOPN en comparación con el control. También se observó un aumento de 2,97 veces de las células CD14+/CD16+ con células cultivadas con rOPN durante 72 horas en condiciones libres de suero en comparación con el control libre de suero.

En el cuadrante superior derecho de la Figura 8 se muestra el porcentaje de células que son doble positivas para los marcadores de superficie CD14 y CD16.

Ejemplo 7: La osteopontina induce el aumento de la activación de los macrófagos y la secreción de citoquinas

Se investigó la activación de los macrófagos mediante citometría de flujo y los niveles de las citocinas anti-inflamatorias en sobrenadantes de células celulares mononucleares. Se añadieron 10  $\mu$ g/ml de OPN humana recombinante (rOPN) a las células mononucleares cultivadas durante 3 días, con y sin suero bovino fetal (FBS) en un medio de cultivo celular, y se analizaron mediante citometría de flujo. A las 24 horas, las células incubadas con rOPN y FBS no tenían acumulación significativa de células CD14+/CD16+ en comparación con el control de FBS solo. Sin embargo, a las 72 horas, se observó un aumento de 12 veces de las células CD14+/CD16+ en las células incubadas con rOPN en comparación con el control. También se observó un aumento en las células CD14+/CD16+ con células cultivadas en medio libre de suero y rOPN en comparación con el control. Para observar los efectos del anticuerpo neutralizante de OPN en la activación de los macrófagos, se añadieron 10  $\mu$ g de anticuerpo a los cultivos durante 3 días. La cantidad de células CD14+/CD16+ se inhibió 3,97 veces a las 24 horas y 3,76 veces a las 72 horas. También se investigaron los niveles de citoquinas pro y anti-inflamatorias en todos los sobrenadantes del

cultivo celular de cada punto de tiempo. En promedio, IL-6, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-10 e IL-12p40 fueron al menos 50 veces más altos con rOPN a las 24 y 72 horas en todas las condiciones de cultivo en comparación con el control. Los niveles de IL-12p70 y de IL-4 no presentaron diferencias significativas en ningún momento y condición del cultivo. En conclusión, hemos encontrado que rOPN aumentó la activación de macrófagos en el tercer día. También se observaron niveles elevados de la mayoría de las citocinas medidas cuando las células fueron expuestas a rOPN, lo que sugiere que OPN induce a las células mononucleares para que secreten estas citocinas.

#### Ejemplo 8: Efecto de MGBG sobre osteopontina in vivo

Muchas enfermedades crónicas están asociadas con la elevación de la producción de osteopontina en tejidos enfermos. Con el fin de probar si MGBG, que regula la producción de OPN in vitro, tendría el mismo efecto in vivo, se realizó un estudio en un modelo animal. Los macacos rhesus infectados con el virus de la inmunodeficiencia del simio (SIV) desarrollan el SIDA y un proceso infiltrativo de macrófagos de demencia asociada al cerebro en los meses posteriores a la infección. Se utilizó MGBG en dos ensayos en animales infectados con SIV. Se infectaron Macacos Rhesus con SIVmac251 y con los linfocitos T CD8+ reducidos mediante la administración de un anticuerpo humanizado que reduce CD8. Esto dio como resultado una rápida disminución de los linfocitos T CD8+ y una infección viral muy rápida con un desarrollo en poco tiempo del SIDA. Estos monos fueron entonces tratados con MGBG como se describe.

En el primer ensayo se utilizaron tres animales (2 tratados y 1 no tratado). Los animales tratados con MGBG recibieron inicialmente 200 mg/m<sup>2</sup> de MGBG, y posteriormente se trataron 7 y 14 días con 300 mg/m<sup>2</sup> y 400 mg/m<sup>2</sup> de MGBG respectivamente. Mientras que el animal no tratado desarrolló SIVE a la tercera semana, los animales tratados no mostraron indicaciones de infiltración de SIVE o DRG. El ensayo se interrumpió cuando los animales tratados desarrollaron toxicidad GI severa a una dosis MGBG de 400 mg/m<sup>2</sup>.

En el segundo ensayo se utilizaron 2 animales tratados y 2 no tratados. En este ensayo, los animales se trataron con una dosificación de 250 mg/m<sup>2</sup> de MGBG dos veces a la semana. Los animales no tratados resultaron SIVE+ 50 días después de la infección y desarrollaron SIDA/SIVE dentro de los 85 días siguientes. Los animales tratados no mostraron evidencia de enfermedad SIV. Además, no se observó toxicidad relacionada con fármacos a lo largo de los 8 ciclos de MGBG.

En ambos ensayos, los animales infectados no tratados desarrollaron SIDA y demencia, pero ninguno de los animales tratados enfermó. La figura 9 muestra que en los cerebros de animales infectados no tratados, se observó una infiltración de macrófagos característica, pero con el tratamiento con MGBG (PA001) no se observó ninguna patología. Los macacos infectados con SIV tratados con 4 dosis de MGBG (PA001) demostraron ausencia de macrófagos asociados a SIV en la corteza frontal en comparación con los no tratados.

Estos mismos cerebros teñidos con un anticuerpo para OPN, mostraron que el tratamiento estaba asociado con la eliminación completa de OPN, mientras que el cerebro del animal no infectado que habían sido infectado tenía grandes concentraciones de OPN (figura 10). De forma similar, como se muestra en la figura 11, los nódulos linfáticos de los animales mostraron niveles diferenciales de tinción con OPN con el tratamiento (B146 y CB18) asociados con niveles marcadamente disminuidos de OPN. Estos resultados muestran que el tratamiento con MGBG de una enfermedad asociada con OPN desactiva la producción de OPN in vivo con la inversión asociada de los procesos patológicos.

#### Ejemplo 9: Efecto de MGBG en el ARN de la osteopontina y la producción de proteínas

Se compararon los análogos de poliamina SL47 y SL93 así como MGBG, con dexametasona y el factor de crecimiento MCSF en un ensayo de inhibición de la producción de OPN. Se añadieron 10  $\mu$ M de cada fármaco a los cultivos de PBMC no estimulados en tiempo = 0 y se recolectaron las células 1,3 y 6 días después para el análisis cuantitativo de la producción de ARN de OPN y de proteína. La figura 12 muestra el efecto de SL47, SL93, MGBG, dexametasona y MCSF en el ARN de OPN (de izquierda a derecha). Como se observa en la figura 12, la expresión del ARN de OPN se inhibió de una manera dependiente del tiempo para SL47, SL93 y MGBG. La dexametasona y MCSF, por otro lado, no tuvieron ningún efecto en la expresión del ARN de OPN.

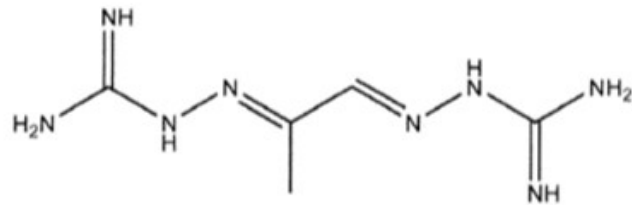
Se observaron resultados similares para la producción de OPN. La figura 13 muestra los niveles cuantitativos de OPN producidos en los cultivos tratados con SL47, SL93, MGBG y dexametasona como se ha descrito anteriormente. La inhibición completa de la producción de la proteína OPN se observó en los PBMC tratados con MGBG, así como con los análogos de poliamina SL47 y SL93.

Debe observarse que hay formas alternativas de implementar la presente invención. Por consiguiente, las presentes realizaciones han de considerarse como ilustrativas y no restrictivas, y la invención no debe limitarse a los detalles dados en la presente descripción, pero puede modificarse dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

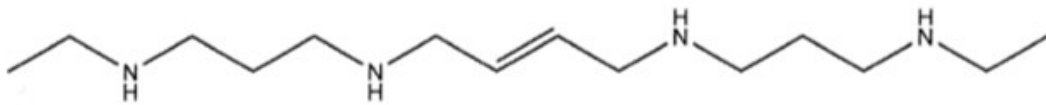
**REIVINDICACIONES**

1. Metilgloxal bis(guanilhidrazona), o sales de la misma, para uso en el tratamiento o prevención de la esclerosis múltiple.

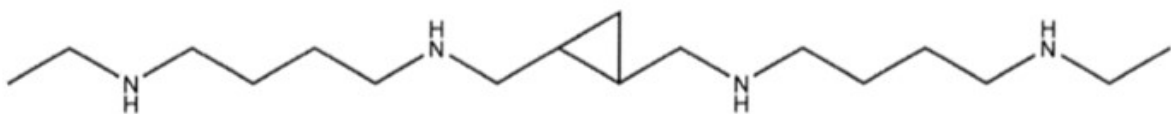
FIG. 1



1,1'[metiletano-diiliden-dinitrilo]diguanidina  
Metilgloxal bis(guanil-hidrazona) o MGBG



N,N'-bis(3-etilaminopropil)-cis-but-2-eno-1,4-diamina  
SL11047 o SL47



N¹,N¹'-(ciclopropano-1,2-diilbis(metilen))bis(N⁴-etilbutano-1,4-diamina  
SL11093 o SL93

FIG. 2

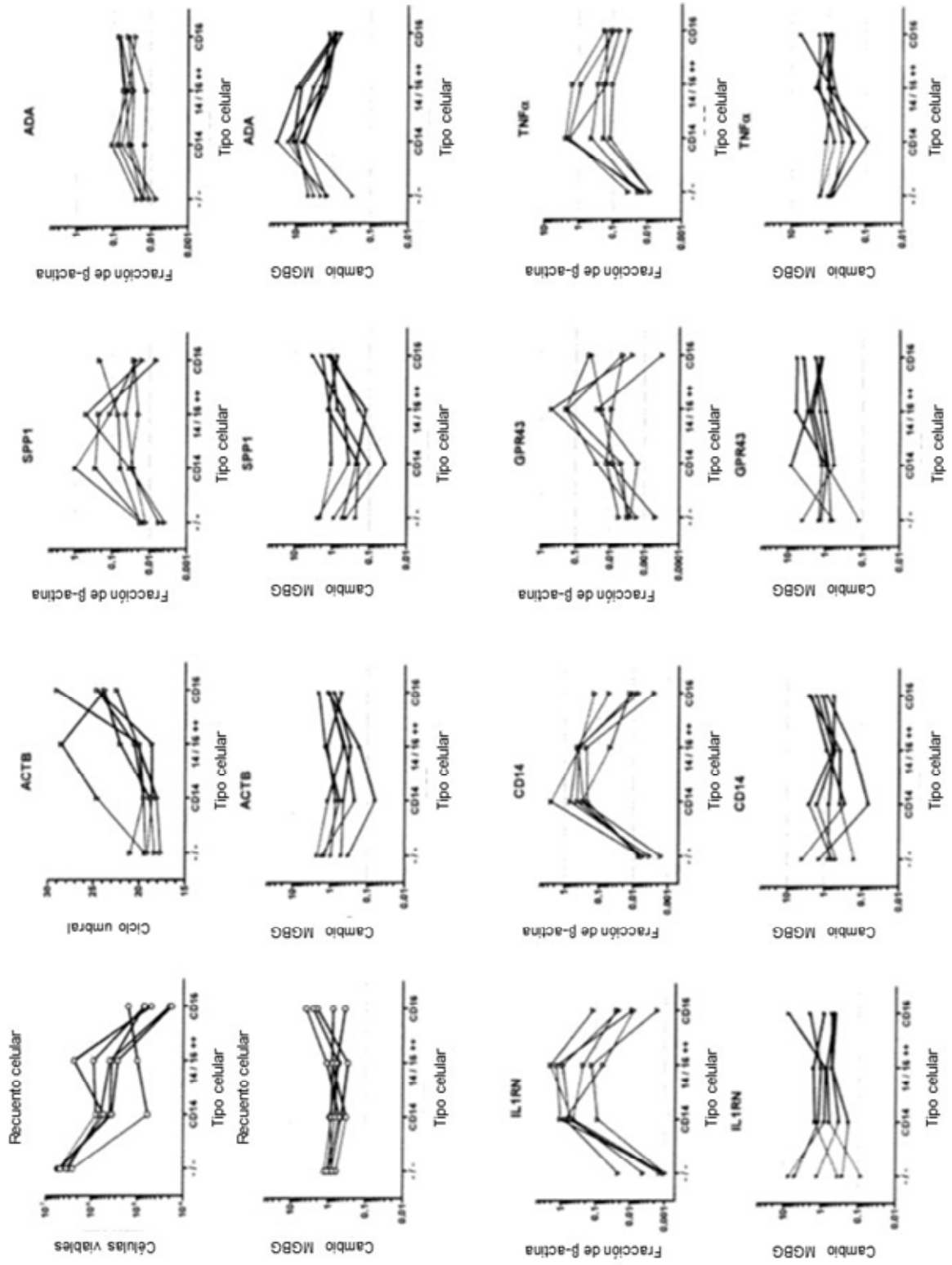


FIG. 3

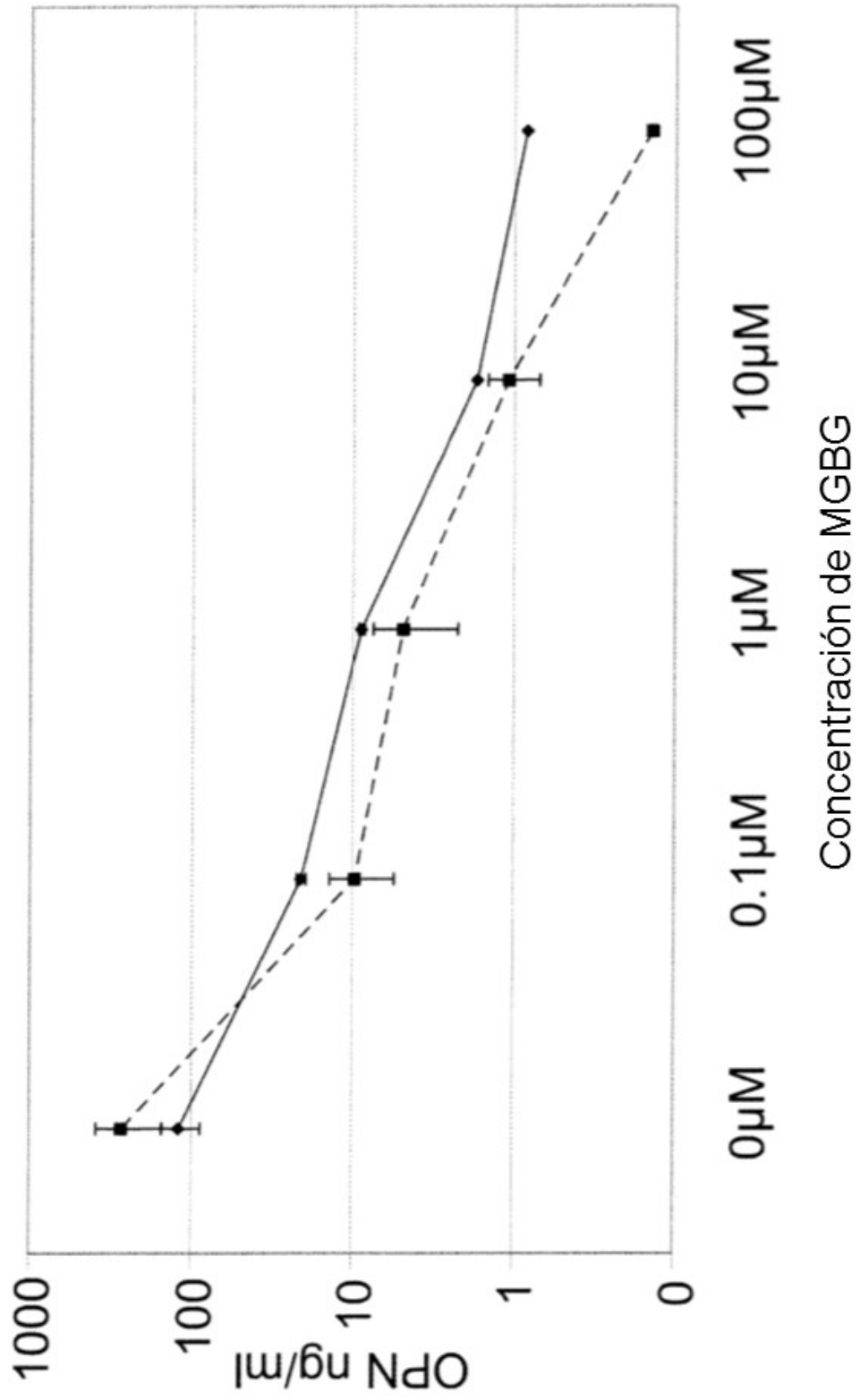


FIG. 4

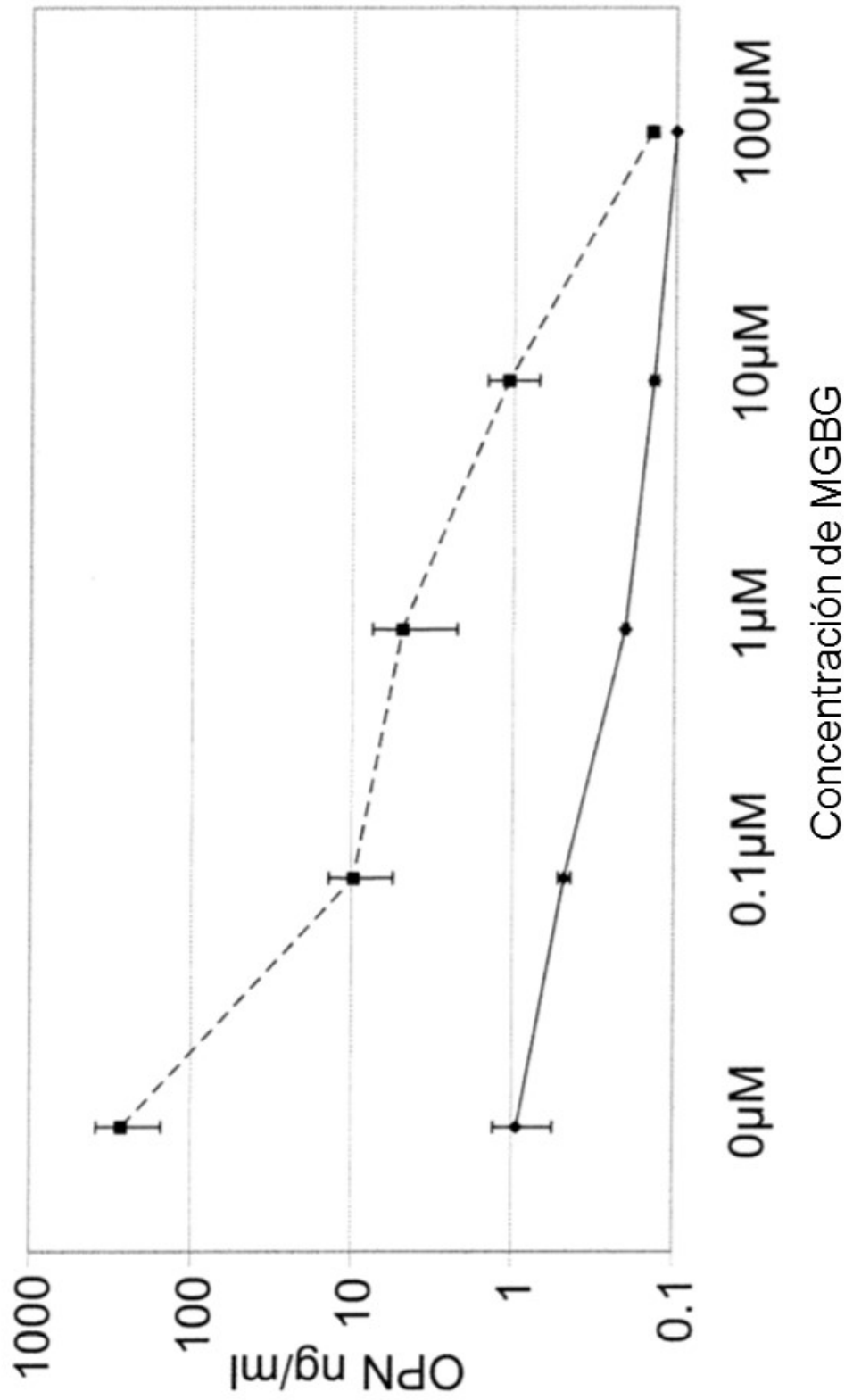




FIG. 5

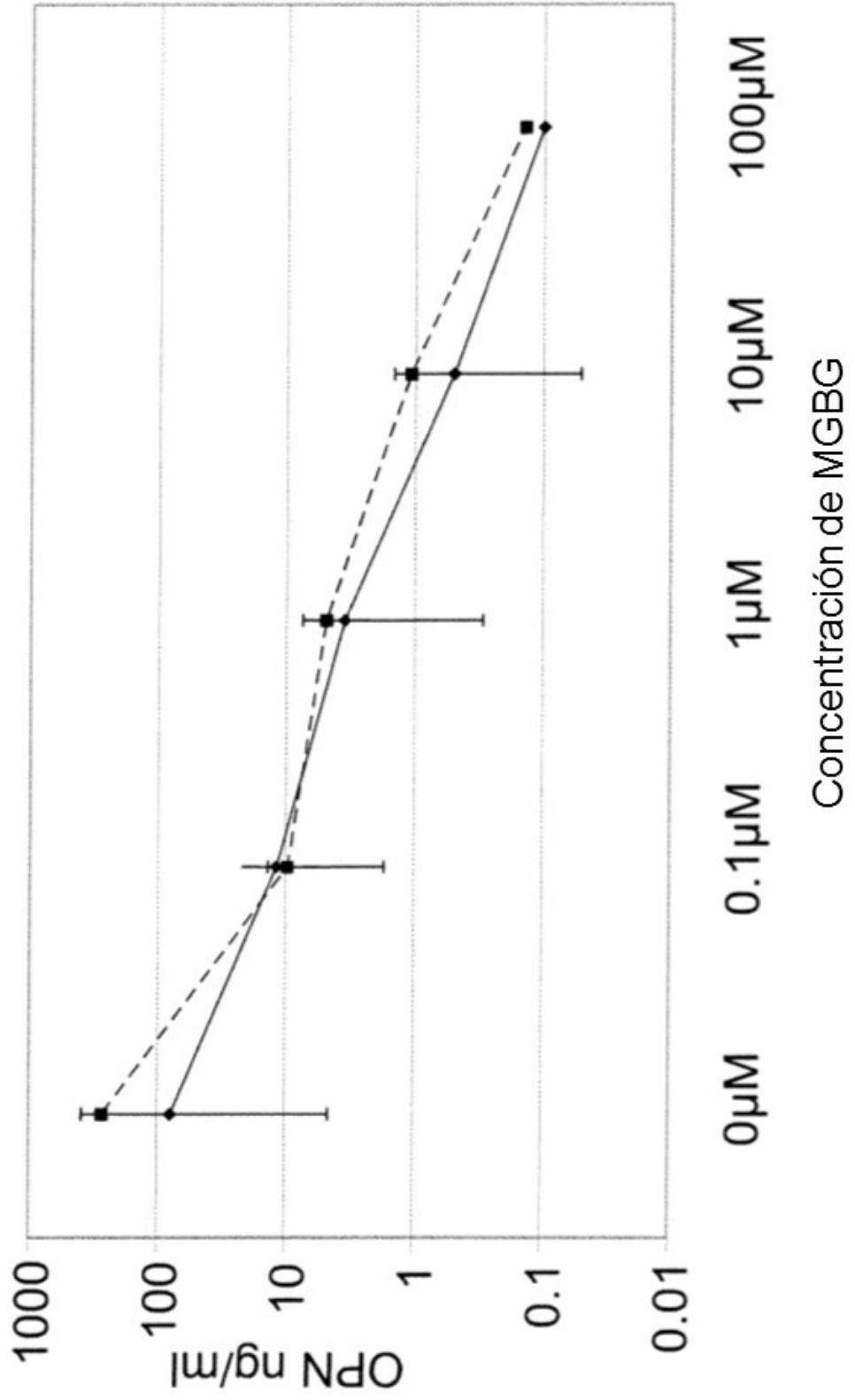


FIG. 6

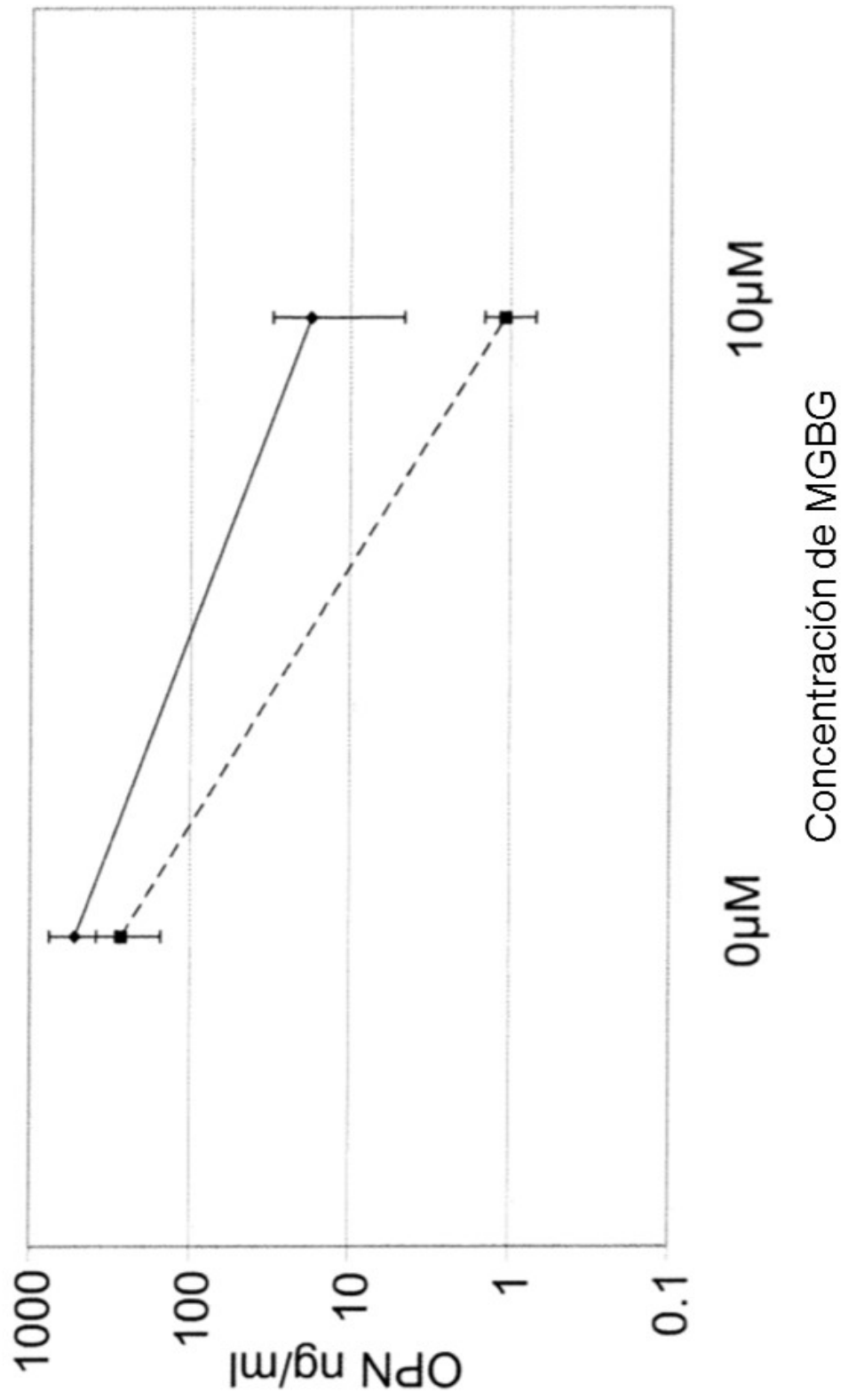


FIG. 7

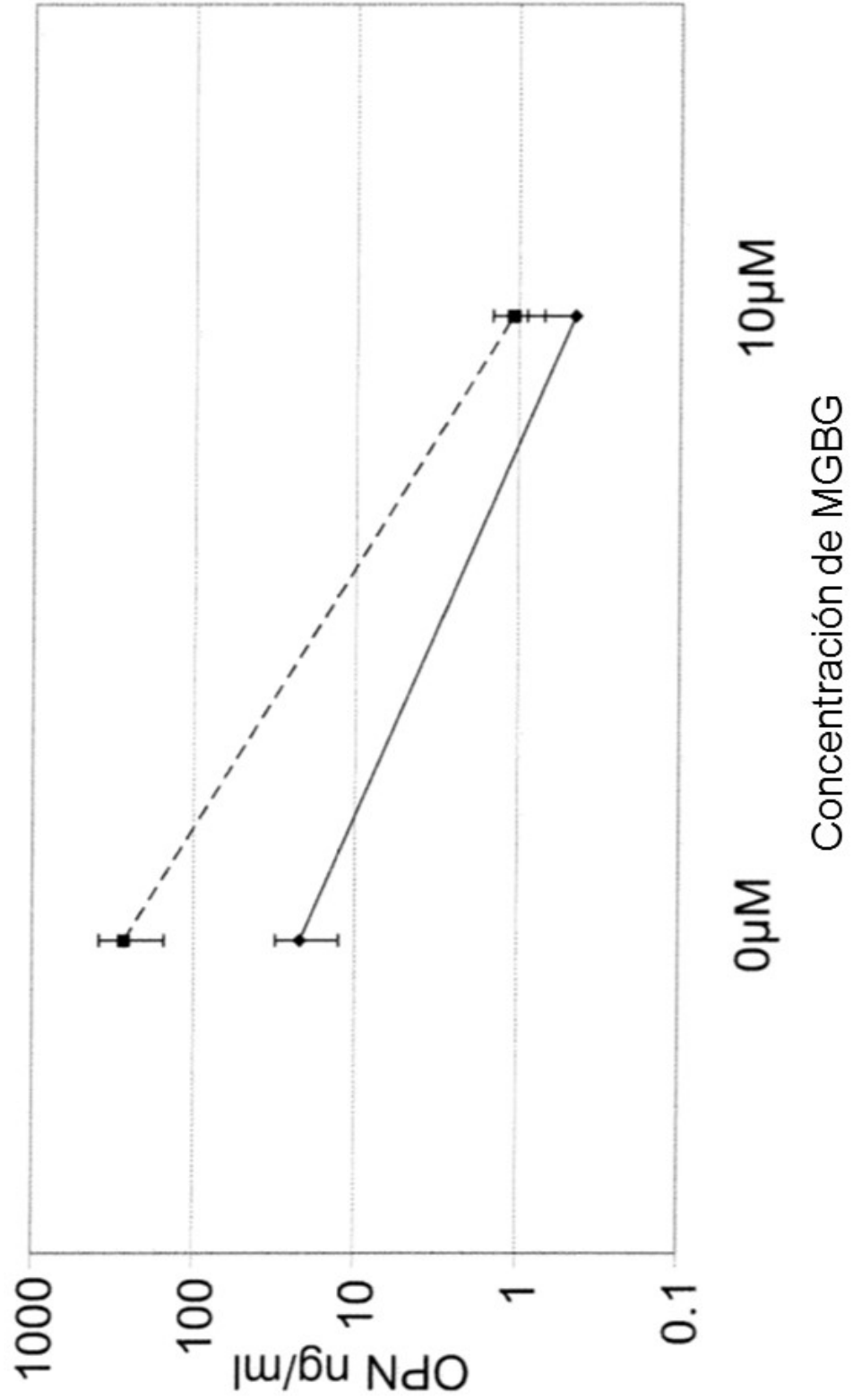


FIG. 8

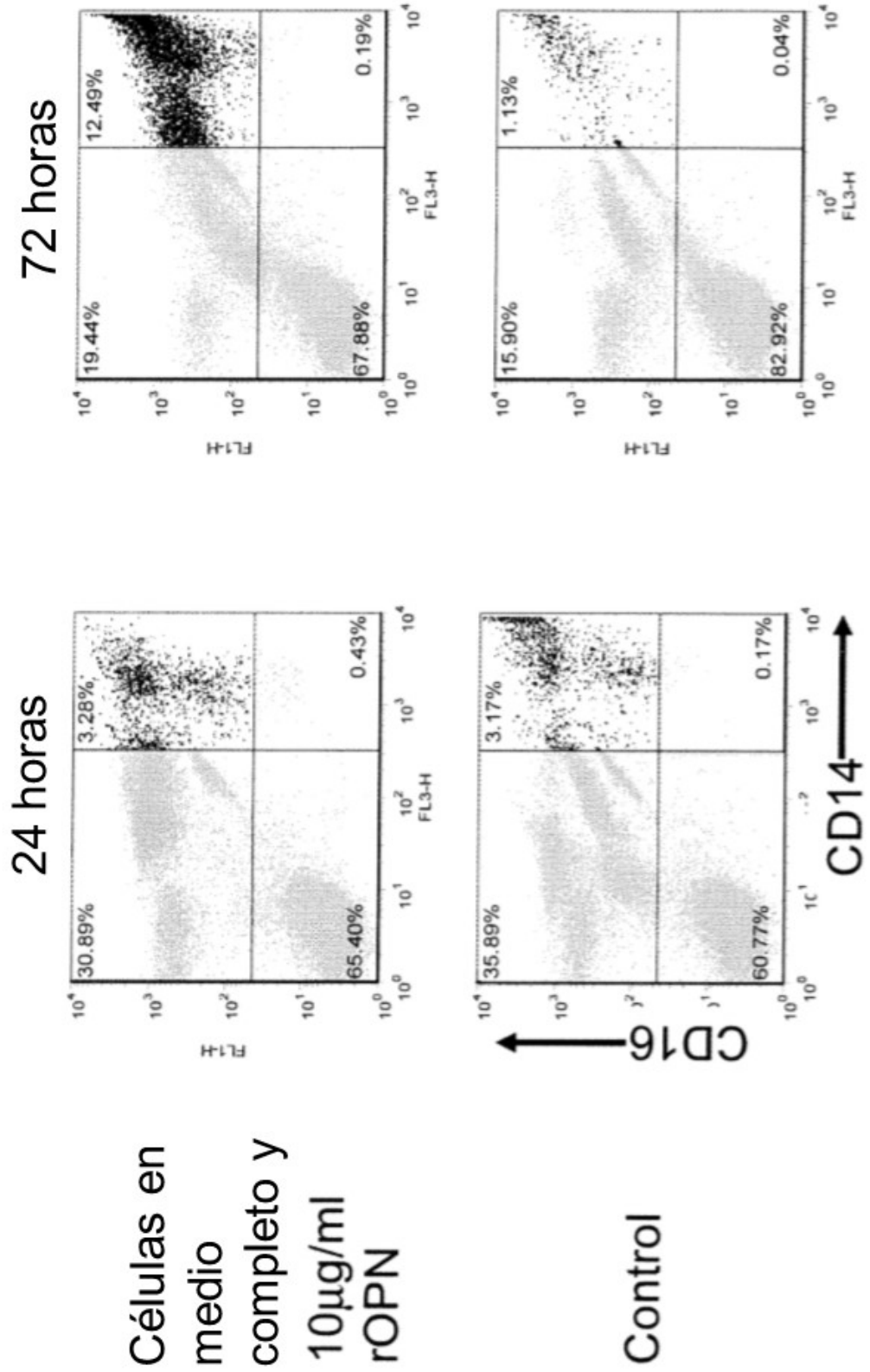


FIG. 9

Tratamiento con PA001 de macacos infectados con SIV con resultado de disminución de macrófagos infectados con CNS

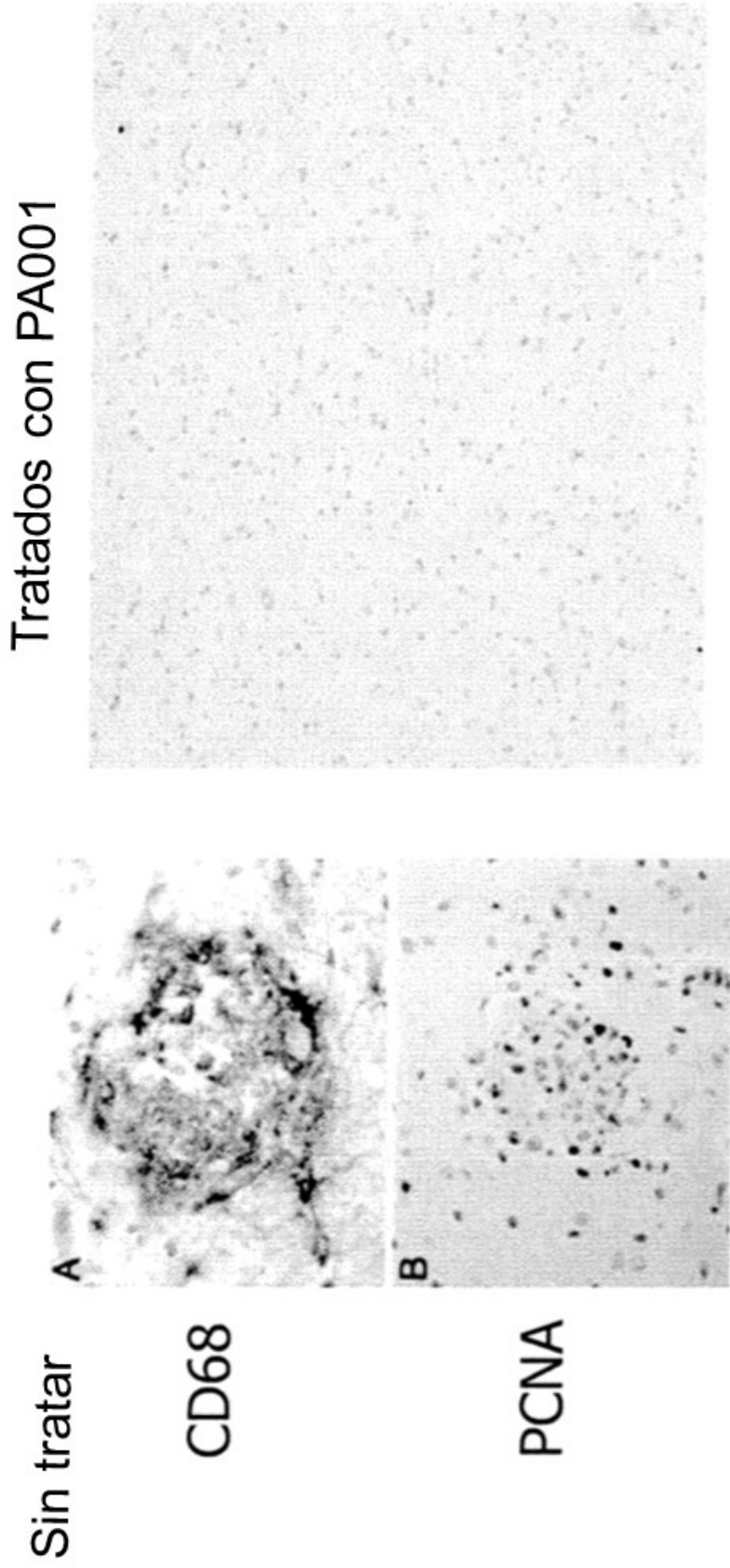


FIG. 10

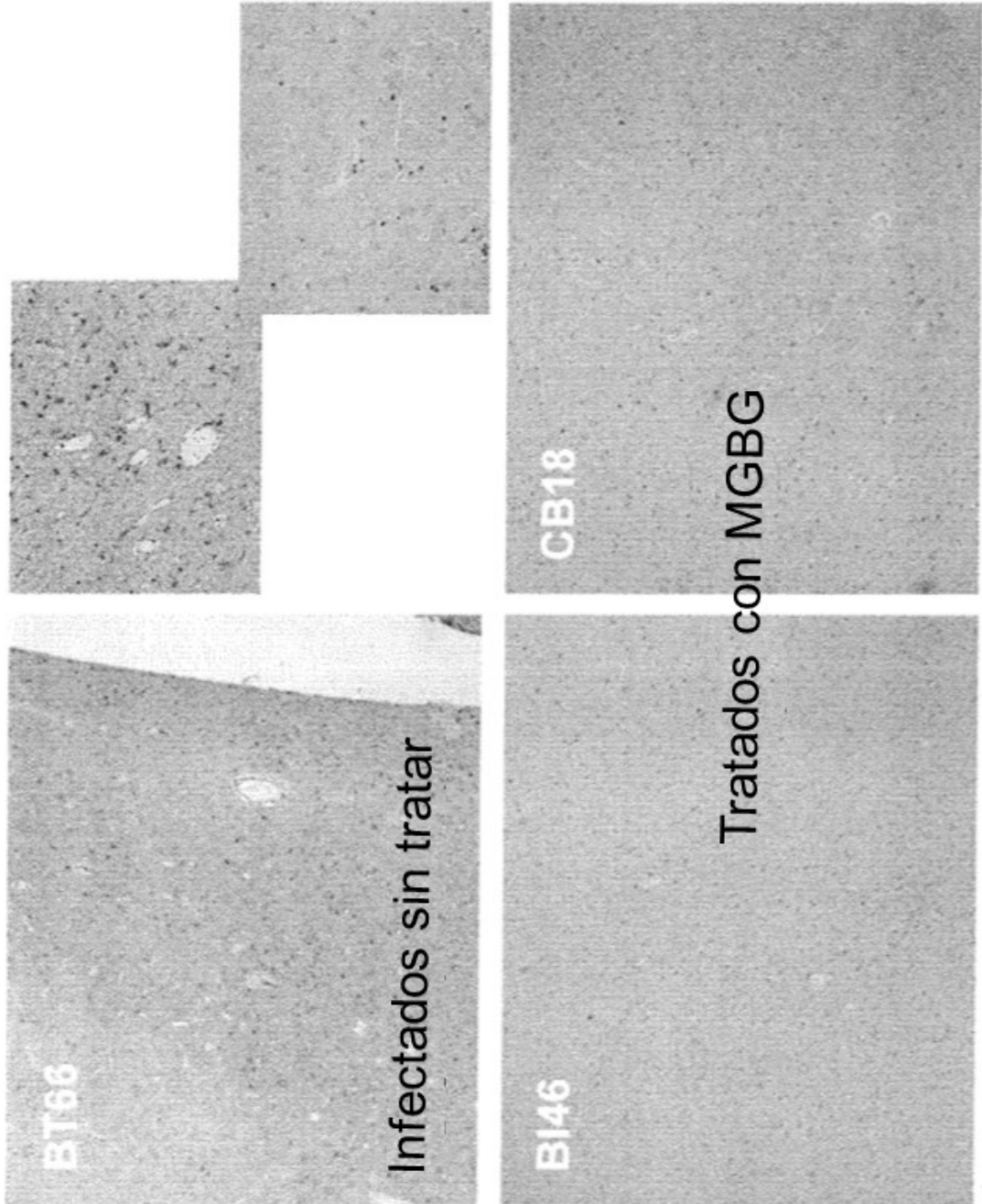


FIG. 11

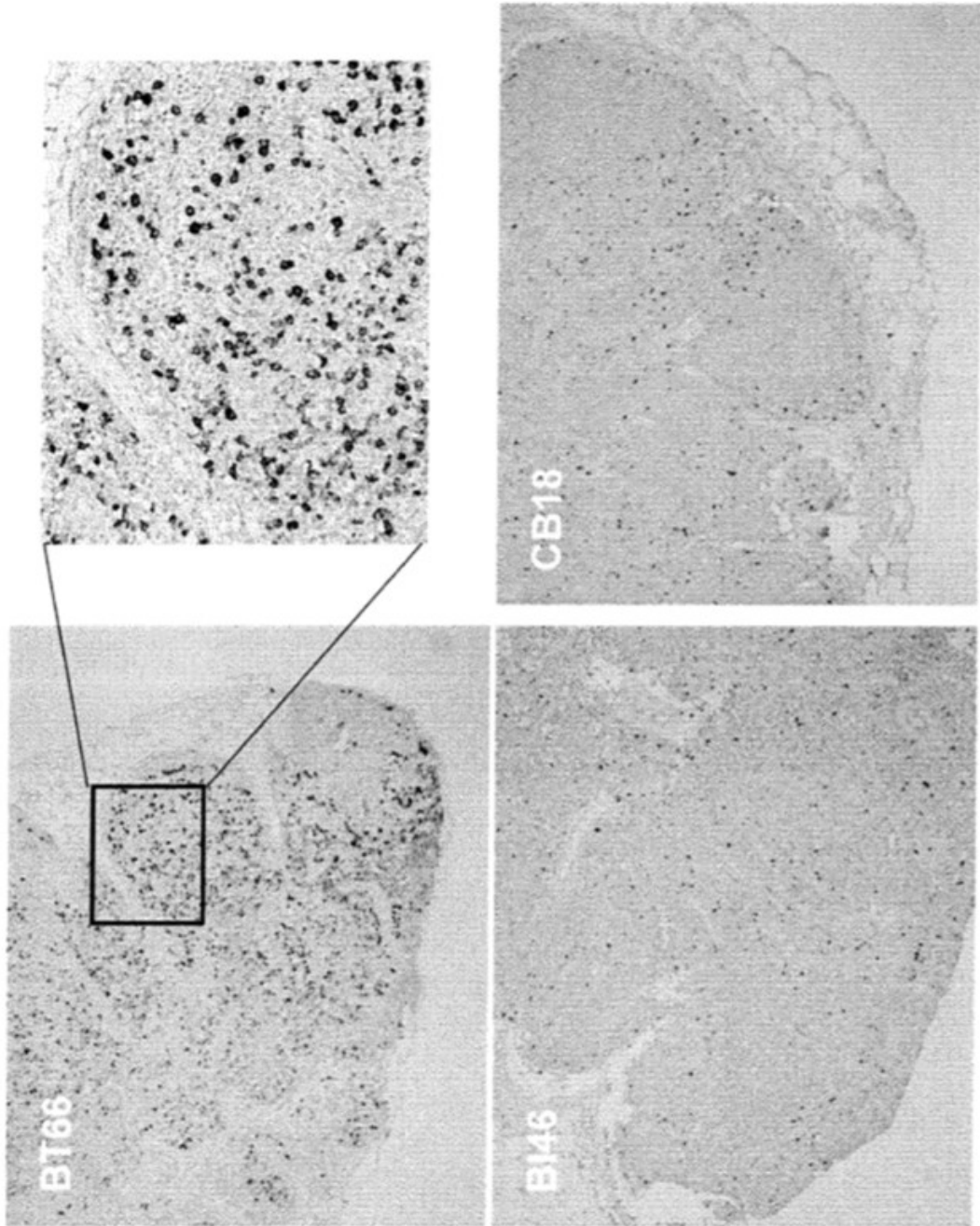


FIG. 12

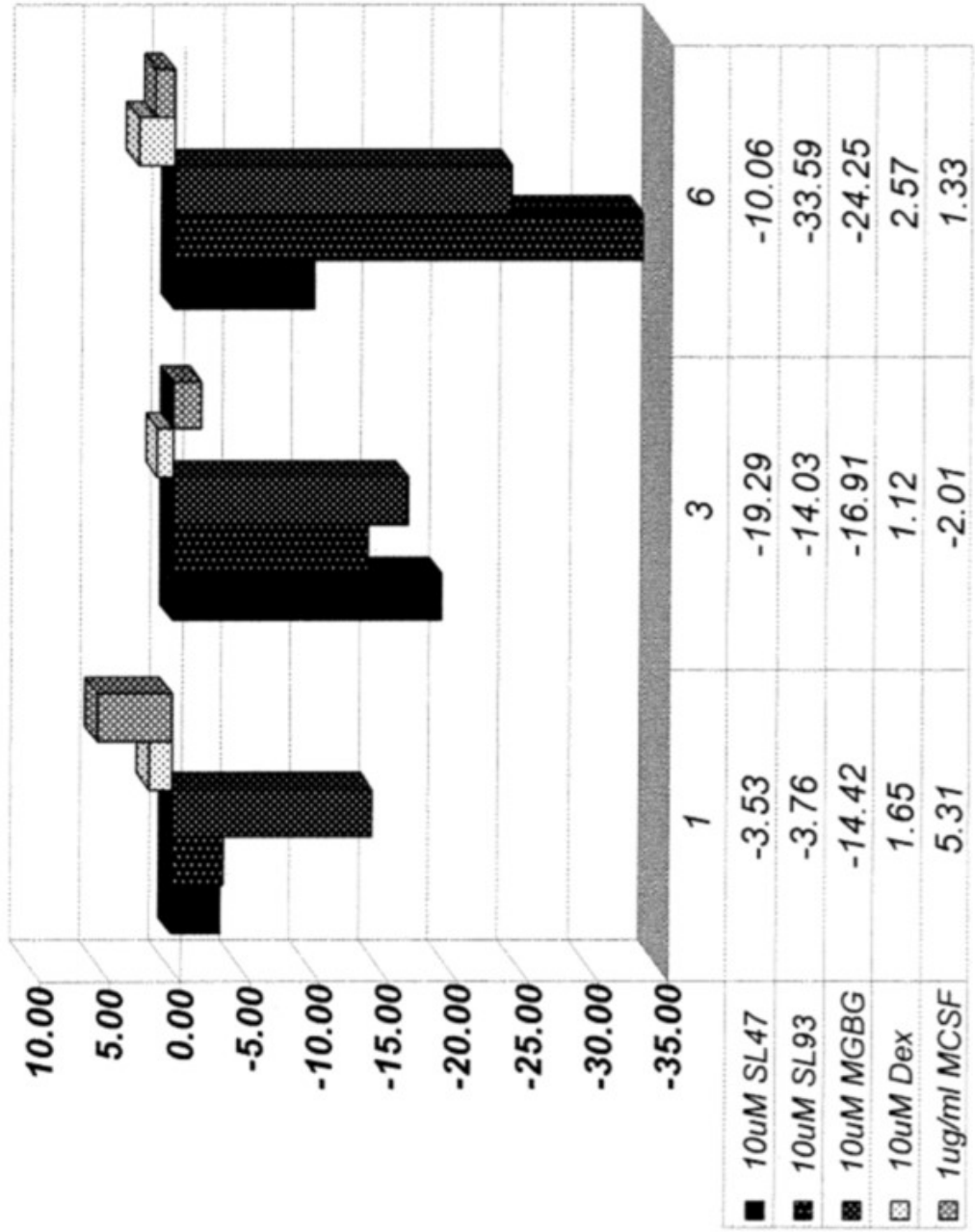




FIG. 13

