

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 640 293**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/113** (2010.01)

**A61K 31/713** (2006.01)

**A61P 29/00** (2006.01)

**A61P 35/00** (2006.01)

**A61P 37/06** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.11.2011 PCT/EP2011/070781**

87 Fecha y número de publicación internacional: **31.05.2012 WO12069525**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.11.2011 E 11791249 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.06.2017 EP 2643462**

54 Título: **Inhibidores de SP140 y su uso en terapia**

30 Prioridad:

**25.11.2010 GB 201020015**

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

**02.11.2017**

73 Titular/es:

**GLAXO GROUP LIMITED (100.0%)  
980 Great West Road  
Brentford, Middlesex TW8 9GS, GB**

72 Inventor/es:

**LEE, KEVIN y  
TOUGH, DAVID, FRANCIS**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

ES 2 640 293 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

Inhibidores de SP140 y su uso en terapia

### Campo de la invención

5 La presente memoria descriptiva desvela nuevos procedimientos de tratamiento. Más particularmente, la presente memoria descriptiva desvela procedimientos para el tratamiento o la prevención de enfermedades y afecciones autoinmunitarias e inflamatorias mediante la inhibición o la modificación de la expresión o la función de las proteínas que contienen bromodominios. En un aspecto adicional, la memoria descriptiva se refiere a un procedimiento de identificación de agentes útiles en dichos procedimientos de tratamiento. La memoria descriptiva describe particularmente el papel de ciertas proteínas que contienen bromodominios, particularmente SP140, en estas enfermedades y afecciones y su uso como objetivos terapéuticos y de identificación sistemática.

### Antecedentes de la invención

15 La cromatina es la compleja combinación de ADN y proteína que compone los cromosomas. Se encuentra dentro de los núcleos de las células eucariotas y se divide entre las formas de heterocromatina (condensada) y eucromatina (extendida). Es posible una variedad de diferentes estados de condensación y la compresión de esta estructura varía durante el ciclo celular, siendo más compacta durante el proceso de división celular. Los componentes principales de la cromatina son ADN y proteínas. Las histonas son los componentes de las proteínas principales de la cromatina, que actúan como bobinas en torno a las cuales se enrolla ADN. Los componentes básicos de la cromatina son los nucleosomas, cada uno de los cuales se compone de 146 pares de bases de ADN envuelto en torno a un octámero de histona que consiste en 2 copias de cada H2A, H2B, H3 y H4. Las funciones de la cromatina se utilizan para empaquetar ADN en un volumen más pequeño para que se integre en la célula, fortalecer el ADN para permitir la mitosis y la meiosis y para servir como un mecanismo para controlar la expresión y la replicación del ADN. La cromatina contiene material genético que sirve como instrucciones para dirigir las funciones celulares. Los genomas de los organismos eucariotas están altamente organizados en el núcleo de la célula. La estructura de la cromatina se controla por una serie de modificaciones post-traduccionales en las proteínas histonas, principalmente las histonas H3 y H4 y más comúnmente en las "colas de las histonas" que se extienden más allá de la estructura del nucleosoma central. Las colas de las histonas tienden a estar libres para la interacción proteína-proteína y son también la porción de la histona más propensa a la modificación post-traducciona. Estas modificaciones incluyen acetilación, metilación, fosforilación, ubiquitinilación, sumoilación. Estas marcas epigenéticas se escriben y borran por las enzimas específicas, que colocan las etiquetas en residuos específicos en la cola de la histona, formando de este modo un código epigenético, que luego se interpreta por la célula para permitir la regulación génica específica de la estructura de la cromatina y por ende de la transcripción.

30 De todas las clases de proteínas, las histonas se encuentran entre las más susceptibles a la modificación post-traducciona. Las modificaciones de las histonas son dinámicas, ya que pueden añadirse o eliminarse en respuesta a estímulos específicos y estas modificaciones dirigen tanto los cambios estructurales en la cromatina como las alteraciones en la transcripción génica. La acetilación de lisina es una modificación de las histonas que forma una marca epigenética en la cromatina para proteínas que contienen bromodominios que se truncan y, a su vez, regulan la expresión génica. Las distintas clases de enzimas, son a saber, histona acetiltransferasas (HATs) e histona desacetilasas (HDACs), residuos de lisina histona específicos de acetilato o deacetilato (1).

40 El bromodominio es actualmente el único dominio proteico conocido por unirse específicamente a residuos lisina acetilada en las colas de histonas. Los bromodominios, que son aproximadamente 110 aminoácidos de longitud, se encuentran en un gran número de proteínas asociadas a la cromatina y a día de hoy se han identificado en aproximadamente 70 proteínas humanas, a menudo adyacentes a otros motivos proteicos (2,3). Las proteínas que contienen un bromodominio pueden contener bromodominios adicionales, así como otros motivos funcionales. Por ejemplo, muchas HATs también contienen un bromodominio (2). Las interacciones entre bromodominios e histonas modificadas pueden ser un importante mecanismo que subyace cambios estructurales en la cromatina y la regulación génica. Las proteínas que contienen bromodominios se han implicado en los procesos de enfermedad, incluyendo cáncer, inflamación y replicación viral. El desarrollo de inhibidores de bromodominios es, de este modo, un medio atractivo de control de la expresión génica y existe una necesidad en la técnica de regular bromodominios que se unen a lisina acetilada con el fin de controlar la expresión génica. Los documentos EP1887008 y EP0989131 desvelan inhibidores de molécula pequeña de proteínas que contienen bromodominios para su uso en el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias y/o inflamatorias. El documento EP223964 desvela inhibidores de molécula pequeña de proteínas que contienen bromodominios para su uso en el tratamiento contra el cáncer. Los presentes inventores han identificado proteínas que contienen bromodominios implicados en la respuesta inflamatoria. La inhibición de estas proteínas que contienen bromodominios al inhibir por lo tanto la expresión y/o la función proporcionarían un enfoque innovador para el tratamiento de enfermedades o afecciones autoinmunitarias e inflamatorias.

### Sumario de la invención

La presente invención proporciona el uso de un inhibidor de la proteína SP140 que contiene bromodominios en la

fabricación de un medicamento para el tratamiento de enfermedades o afecciones autoinmunitarias e inflamatorias o cáncer, en el que el inhibidor se selecciona entre un ARNip, una ribozima o un oligonucleótido antisentido complementario al ARNm de SP140 o un anticuerpo que se une a la proteína SP140. Además, se desvela un procedimiento de tratamiento de enfermedades y afecciones autoinmunitarias e inflamatorias que comprende inhibir una o más proteínas que contienen bromodominios en un mamífero.

En un aspecto adicional se desvela un procedimiento de tratamiento de enfermedades y afecciones autoinmunitarias e inflamatorias en un mamífero que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de SP140.

En un aspecto adicional, se desvela el uso de un inhibidor de SP140 en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de enfermedades y afecciones autoinmunitarias e inflamatorias.

En un aspecto adicional, se desvela un inhibidor de la proteína SP140 que contiene bromodominios para su uso en el tratamiento de enfermedades y afecciones autoinmunitarias e inflamatorias.

En un aspecto adicional, se desvela una formulación farmacéutica para su uso en el tratamiento de enfermedades o afecciones autoinmunitarias e inflamatorias, que comprende un inhibidor de la proteína SP140 que contiene bromodominios, junto con al menos un portador farmacéutico.

En un aspecto adicional, se desvela un procedimiento de identificación sistemática para un inhibidor de la proteína SP140 que contiene bromodominios, en particular que comprende la etapa de determinar si el compuesto inhibe la proteína SP140 que contiene bromodominios o la etapa de determinar si el compuesto activa la proteína SP140 que contiene bromodominios.

## **Descripción de los dibujos**

**Figura 1. Los ARNips dirigidos a SP140 reducen los niveles de ARNm de SP140 en linfocitos T CD4<sup>+</sup> humanos primarios.** Seis ARNips diferentes diseñados para dirigir SP140 se sometieron a ensayo por su capacidad para reducir los niveles de ARNm de SP140 tras la transfección en linfocitos T CD4<sup>+</sup> humanos primarios. Los niveles de ARNm de SP140 se cuantificaron por RT-PCR 24 horas después de la transfección con ARNip de SP140 o ARNip de control no dirigido codificado (denominado All stars). Las cantidades de ARNm de SP140 se normalizaron con GAPDH y los resultados se representan como fracciones de la cantidad detectada en las células transfectadas con los ARNip All stars.

**Figura 2. Los ARNips dirigidos a SP140 inhiben la producción de IL-17 por linfocitos T CD4<sup>+</sup> de memoria/efectores humanos estimulados por células dendríticas.** Los linfocitos T CD4<sup>+</sup> CD45RO<sup>+</sup> CD45RA<sup>-</sup> se transfectaron con 3 ARNips diferentes dirigidos a SP140 o con un ARNip no dirigido codificado como un control negativo. Los linfocitos T transfectados con ARNip se estimularon con células dendríticas (CDs) alogénicas que habían sido activadas por (A) curdlano o B (LPS) y las citoquinas presentes en el medio se midieron 3-4 días más tarde. Los resultados se representan como la fracción de la cantidad de IL-17 producida por las células transfectadas con ARNip de SP140 en comparación con la producida en las células transfectadas con ARNip de control. Para las CDs estimuladas con curdlano, los datos representan la media  $\pm$  D.E. de 10 donantes. Para las CDs estimuladas con LPS, los datos representan la media  $\pm$  D.E. de 6 transfecciones distintas para cada ARNip en CDs procedentes de un único donante.

**Figura 3. Los ARNips dirigidos a SP140 inhiben la producción de citoquinas por linfocitos T CD4<sup>+</sup> de memoria/efectores estimulados con anti-CD3 + anti-CD28.** Los linfocitos T CD4<sup>+</sup> CD45RO<sup>+</sup> CD45RA<sup>-</sup> se transfectaron con 2 ARNips diferentes dirigidos a SP140 o con un ARNip no dirigido codificado como un control negativo. Dos días después de la transfección, se añadieron linfocitos T a placas recubiertas con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 y las citoquinas presentes en los sobrenadantes se midieron después de una incubación adicional durante la noche. Los resultados se representan como fracciones de las cantidades de citoquinas producidas por las células transfectadas con ARNip de SP140 en comparación con las producidas en células transfectadas con ARNip de control. Los datos representan la media  $\pm$  D.E. procedente de 2 donantes.

**Figura 4. Los ARNips dirigidos a SP140 inhiben la producción de citoquinas por una estirpe linfocítica T CD4<sup>+</sup> humana estimulada con anti-CD3 + anti-CD28.** Los linfocitos T HuT78 se transfectaron con 4 ARNips diferentes dirigidos a SP140 o con un ARNip no dirigido codificado como un control negativo. Dos días después de la transfección, los linfocitos T se añadieron a placas recubiertas con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 y las citoquinas presentes en los sobrenadantes se midieron después de una incubación adicional durante la noche. Los resultados se representan como fracciones de las cantidades de citoquinas producidas por las células transfectadas con ARNip de SP140 en comparación con las producidas en células transfectadas con ARNip de control. Tenga en cuenta que SP140-2' diseñado por ARNip parece ser ineficaz para disminuir la expresión de SP140 (véase la Figura 1) y también tiene un escaso efecto sobre la producción de citoquinas. Asimismo, las células se transfectaron con un ARNip contra IL-13, aunque esto tampoco dio resultado en la disminución de la expresión de IL-13 (C). Los datos mostrados son representativos de los resultados de dos experimentos independientes.

**Figura 5. Los ARNips dirigidos a SP140 inhiben la producción de citoquinas por linfocitos T CD4<sup>+</sup> CD161<sup>+</sup> humanos estimulados con anti-CD3 + anti-CD28.** Los linfocitos CD4<sup>+</sup> CD161<sup>+</sup> aislados de amígdalas humanas se transfectaron con 5 ARNips diferentes dirigidos a SP140, con ARNip dirigido a RORC como control positivo para la producción de IL-17 o con un ARNip no dirigido codificado como control negativo. Dos días después de la transfección, linfocitos T se añadieron a placas recubiertas con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 y las citoquinas presentes en los sobrenadantes se midieron después de una incubación adicional durante la noche. Los resultados se representan como fracciones de las cantidades de citoquinas producidas por las células transfectadas con ARNip de SP140 en comparación con las producidas en células transfectadas con ARNip de control.

**Figura 6. La sobreexpresión de SP140 en linfocitos T CD4<sup>+</sup> de memoria/efectores humanos potencia la producción de citoquinas tras la estimulación con linfocitos T.** Los plásmidos de expresión que codifican SP140 o la proteína verde fluorescente (PVF) se transfectaron en linfocitos T CD4<sup>+</sup> CD45RO<sup>+</sup> CD45RA<sup>-</sup> humanos. Los linfocitos T transfectados se estimularon con células dendríticas (CDs) alogénicas que habían sido activadas por curdlano y las citoquinas presentes en el medio se midieron 3 días más tarde. Los datos mostrados expresan un donante representativo de tres.

**Figura 7. La expresión de la proteína SP140 aumenta tras la activación de células dendríticas o T.** (A, B) Membranas de Western que demuestran la especificidad del anticuerpo anti-SP140. (A) Membrana de Western de lisados de células HeLa no transfectadas (designadas UT) o células HeLa transfectadas con un plásmido que codifica SP140 de longitud completa (designadas SP140) muestra solo una banda del peso molecular esperado (98 kDa) en las células transfectadas. (B) ARNip dirigido a SP140 (SP140-6') reduce la expresión de SP140 en células HeLa transfectadas con plásmido de expresión SP140. Los lisados procedían de células transfectadas con solo el plásmido de expresión de SP140 (carril izquierdo), con el plásmido de expresión más ARNip de control (carril central) o con el plásmido de expresión más ARNip de SP140-6' (carril derecho). La membrana se sondó con un anticuerpo a la proteína histona H3 de control para comparar la cantidad de proteína cargada de los diferentes lisados. (C) Aumento de los niveles de proteína SP140 tras la activación de linfocitos T. CMSPs deplecionadas de monocitos de 2 donantes se dejaron desactivadas o tratadas con anticuerpos anti-CD3 + anti-CD28 durante 24 horas. Los lisados se evaluaron por transferencia de Western con anticuerpos frente a SP140 e histona H3. (D) Aumento de los niveles de proteína SP140 tras la activación de CD. Las CD se dejaron desactivadas o tratadas con LPS durante 24 horas. Los lisados se evaluaron por transferencia de Western con anticuerpos frente a SP140 e histona H3.

**Figura 8. Expresión de SP140 en linfocitos T CD4<sup>+</sup> humanos.** Los linfocitos T CD4<sup>+</sup> purificados se activaron con 0,1 mg/ml de  $\alpha$ -CD3 y 3 mg/ml de  $\alpha$ -CD28 durante los momentos indicados. Las membranas de Western se sondaron con anticuerpos contra SP140 o histona H3 como control de carga. El análisis de intensidad de la banda se realizó utilizando software QuantityOne (Biorad) y los resultados se representan como una relación de la intensidad de las bandas de SP140 a la intensidad de la banda de H3 de control. Las relaciones se representan por separado para las bandas de SP140 superior e inferior.

**Figura 9. Expresión de SP140 en células dendríticas derivadas de monocitos humanos.** Las células CD14<sup>+</sup> se aislaron a partir de CMSPs y se diferenciaron a CDdms utilizando GM-CSF e IL-4 durante 5 días. Las CDs se estimularon con 100 ng/ml de LPS durante los momentos indicados y los lisados celulares totales se recolectaron, se analizaron en un gel Bis-Tris al 4-12 % y se sometieron a transferencia de Western. La membrana se sondó con anticuerpos  $\alpha$ -SP140 y  $\alpha$ -H3. El análisis de intensidad de la banda se realizó utilizando software QuantityOne (Biorad) y los resultados se representan como una relación de la intensidad de las bandas de SP140 a la intensidad de la banda de H3. Las relaciones se representan por separado para las bandas de SP140 superior e inferior.

**Figura 10. Prominencia de las células SP140<sup>+</sup> en infiltrados inflamatorios.** Se utilizó inmunohistoquímica para evaluar la expresión de la proteína SP140 en una variedad de tejidos normales e inflamados. (A) Tejido de amígdala. El control de las amígdalas muestra células positivas en el centro germinal, en la zona del manto y en el espacio interfollicular, incluyendo poblaciones de linfocitos B y T. (B) Íleon normal. Un pequeño foco de células SP140<sup>+</sup> resulta evidente en el tejido linfoide asociado al intestino. (C-H) Ejemplos que muestran infiltrados mononucleares SP140<sup>+</sup> en tejidos inflamados: (C) apendicitis, apéndice, (D) enfermedad de Crohn, colon, (E) artritis psoriásica, membrana sinovial, (F) artritis reumatoide, membrana sinovial, (G) tiroiditis de Hashimoto, tiroides, (H) síndrome de Sjogren, quiste cervical.

**Figura 11. SP140 se asocia con el sitio de inicio de la transcripción de TNF- $\alpha$  tras la activación de células dendríticas.** Los datos muestran resultados de 2 experimentos de ChIP independientes utilizando anticuerpos contra SP140 o un anticuerpo IgG de control negativo (IgG). ChIPs se llevaron a cabo en las células dendríticas en los momentos indicados tras la estimulación con LPS. El enriquecimiento de ADN en las muestras de ChIP se midió en (A, C) el sitio de inicio de la transcripción (SIT) de TNF- $\alpha$  o (B, D) del SIT de  $\beta$ -globina humana. Todos los resultados se representan como el porcentaje de ADN de entrada.

**Descripción detallada de la invención**

Se han identificado y caracterizado varias proteínas que contienen bromodominios. Se menciona particularmente lo siguiente:

SP140:

- 5 La secuencia de ácido nucleico de ARNm de SP140 humano, incluyendo variantes de transcrito, se proporciona por los siguientes números de acceso: NM\_007237.4, NM\_001005176.2.  
La secuencia de aminoácidos de la proteína SP140 humana, incluyendo isoformas, se proporciona por los siguientes números de acceso: NP\_009168.4, NP\_001005176.1.
- 10 Dentro del alcance de la presente invención, se utiliza preferentemente un inhibidor de una proteína humana que contiene bromodominios, más particularmente un inhibidor de SP140, particularmente un compuesto inhibidor.
- Como se utiliza en la presente memoria, el término "polipéptido" se refiere a una cadena de aminoácidos que incluye una proteína de longitud completa, oligopéptidos, péptidos cortos y fragmentos de los mismos, en el que los restos de aminoácidos se vinculan por enlaces covalentes.
- 15 Como se utiliza en la presente memoria, una "variante" es un polipéptido que comprende una secuencia, que difiere (por delección de un aminoácido, inserción de un aminoácido y/o sustitución de un aminoácido con un aminoácido diferente) en una o más posiciones de aminoácidos de la de una secuencia de polipéptido parental. La secuencia variante puede ser una secuencia de origen no natural, es decir, una secuencia que no se encuentra en la naturaleza.
- 20 Como se utiliza en la presente memoria, la expresión "péptido sintético" se refiere a un péptido, incluyendo un péptido corto que se ha sintetizado *in vitro*. El término abarca además péptidos o péptidos cortos que se han modificado por sustitución con aminoácidos inusuales o no naturales.
- Como se utiliza en la presente memoria, "de origen natural", como se aplica a un objeto, se refiere al hecho de que el objeto puede encontrarse en la naturaleza a diferencia de ser producido artificialmente por el hombre.
- 25 Como se utiliza en la presente memoria, un "fragmento" o "subsecuencia" se refiere a cualquier porción de una secuencia dada. Queda entendido que un fragmento o subsecuencia de una secuencia será más corto que la propia secuencia en al menos un resto de aminoácido o de ácido nucleico. De este modo, un fragmento o subsecuencia se refiere a una secuencia de aminoácidos o ácidos nucleicos que comprende una parte de una secuencia más larga de aminoácidos (p. ej., polipéptido).
- 30 Como se utiliza en la presente memoria, la expresión "identidad de secuencia" indica una medida cuantitativa del grado de homología entre dos secuencias de aminoácidos o entre dos secuencias de ácido nucleico de la misma longitud. Si las dos secuencias a comparar no poseen una longitud idéntica, han de alinearse para proporcionar el mejor ajuste posible, lo que permite la inserción de huecos o, alternativamente, el truncamiento en los extremos de las secuencias de polipéptidos o secuencias de nucleótidos.
- 35 Como se utiliza en la presente memoria, la expresión "molécula de ácido nucleico" se refiere a un oligómero o polímero de ácido ribonucleico (ARN) o ácido desoxirribonucleico (ADN) o miméticos de los mismos. Este término incluye moléculas compuestas de nucleobases de origen natural, azúcares y enlaces internucleosídicos covalentes (de fondo) que funcionan de manera similar o combinaciones de los mismos.
- 40 Como se utiliza en la presente memoria, una "secuencia de polinucleótido" (p. ej., un ácido nucleico, polinucleótido, oligonucleótido, etc.) es un polímero de nucleótidos que comprende nucleótidos A, C, T, U, G u otros nucleótidos de origen natural o análogos de nucleótidos artificiales o una cadena de caracteres que representa un ácido nucleico, dependiendo del contexto. El ácido nucleico dado o el ácido nucleico complementario se puede determinar a partir de cualquier secuencia de polinucleótido especificada.
- 45 Como se utiliza en la presente memoria, el término "inhibidor" puede ser cualquier compuesto o tratamiento capaz de inhibir la expresión y/o la función de la proteína que contiene bromodominios, es decir cualquier compuesto o tratamiento que inhibe la transcripción del gen, maduración de ARN, traducción del ARN, modificación post-traduccional de la proteína, unión de la proteína a un objetivo de lisina acetilada y similares. Así, "la inhibición de la proteína SP140 que contiene bromodominios" incluye la inhibición de la expresión y/o la función de la proteína SP140 que contiene bromodominios.
- 50 El inhibidor puede ser de naturaleza y origen variados, incluyendo origen natural [p. ej., vegetal, animal, eucariota, bacteriano, viral] [particularmente una molécula orgánica, inorgánica, sintética o semi-sintética]. Por ejemplo, puede ser un ácido nucleico, un polipéptido, una proteína, un péptido o un compuesto químico. En un aspecto, el inhibidor es selectivo para una proteína que contiene bromodominios particular sin actividad contra otra proteína que contiene bromodominios.
- En un aspecto, el inhibidor es un ácido nucleico antisentido capaz de inhibir la transcripción de las proteínas que

contienen bromodominios o la traducción del ARN mensajero correspondiente. El ácido nucleico antisentido puede comprender la totalidad o parte de la secuencia de la proteína que contiene bromodominios o de una secuencia que es complementaria a la misma. La secuencia antisentido puede ser un ADN y un ARN (p. ej. ARNip), una ribozima, etc. Puede ser monocatenaria o bicatenaria. También puede ser un ARN codificado por un gen antisentido. Cuando se utiliza un ácido nucleico antisentido que comprende parte de la secuencia del gen o ARN mensajero bajo consideración, se prefiere utilizar una parte que comprende al menos 10 bases consecutivas de la secuencia, más preferentemente al menos 15, a fin de garantizar la hibridación específica. En el caso de un oligonucleótido antisentido, este comprende normalmente menos de 100 bases, por ejemplo en el orden de 10 a 50 bases. Este oligonucleótido puede modificarse para mejorar su estabilidad, su resistencia a las nucleasas, su penetración celular, etc. La complementariedad perfecta entre la secuencia de la molécula antisentido y la del gen objetivo o ARN mensajero no se requiere, pero en general resulta preferente.

De acuerdo con otro aspecto de la divulgación, el compuesto inhibidor es un polipéptido. Puede ser, por ejemplo un péptido que comprende una región de la proteína que contiene bromodominios y que es capaz de antagonizar su actividad. Un péptido comprende ventajosamente de 5 a 50 aminoácidos consecutivos de la secuencia primaria de la proteína que contiene bromodominios bajo consideración, normalmente de 7 a 40. El polipéptido también puede ser un anticuerpo contra la proteína que contiene bromodominios o un fragmento o derivado de dicho anticuerpo, por ejemplo un fragmento Fab, una región CDR, o, más preferentemente, un anticuerpo de cadena sencilla (p. ej., ScFv). Los anticuerpos de cadena sencilla son particularmente ventajosos en la medida en que pueden actuar de manera específica e intracelular para modular la actividad de una proteína objetivo. Tales anticuerpos, fragmentos o derivados se pueden producir por técnicas convencionales que comprenden la inmunización de un animal y la recuperación del suero (policlonal) o células del bazo (para producir hibridomas mediante fusión con estirpes celulares apropiadas).

Los procedimientos de producción de anticuerpos policlonales en diversas especies se describen en la técnica anterior. Normalmente, el antígeno se combina con un adyuvante (p. ej., adyuvante de Freund) y se administra a un animal, normalmente por inyección subcutánea. Se pueden realizar repeticiones de inyecciones. Las muestras sanguíneas se recogen y se separa la inmunoglobulina o suero. Los procedimientos convencionales de producción de anticuerpos monoclonales comprenden la inmunización de un animal con un antígeno, seguido de la recuperación de células de bazo, que se fusionan entonces con células inmortalizadas, tales como células de mieloma. Los hibridomas resultantes producen los anticuerpos monoclonales y pueden seleccionarse mediante la limitación de la dilución a fin de aislar clones individuales. Los fragmentos Fab o F(ab')<sub>2</sub> pueden producirse por la digestión de la proteasa, de acuerdo con técnicas convencionales.

Según otro aspecto de la divulgación, el inhibidor es un compuesto químico, de origen natural o sintético, particularmente una molécula orgánica o inorgánica, capaz de modular la expresión o la actividad de la proteína que contiene bromodominios. En un aspecto particular de la divulgación, el inhibidor es una molécula pequeña.

Como se utiliza en la presente memoria, la "cantidad eficaz" significa la cantidad de un fármaco o agente farmacéutico que provocará la respuesta biológica o médica de un tejido, sistema, animal o ser humano que está siendo buscada, por ejemplo, por un investigador o médico. Además, la expresión "cantidad terapéutica" significa cualquier cantidad que, en comparación con un sujeto correspondiente que no ha recibido dicha cantidad, da como resultado un tratamiento mejorado, curación, prevención o mejora de una enfermedad, trastorno o efecto secundario, o una disminución en la velocidad de avance de una enfermedad o trastorno. El término también incluye dentro de su alcance cantidades eficaces para potenciar la función fisiológica normal. "Terapia" y "tratamiento" pueden incluir tratamiento y/o profilaxis.

Si bien es posible que, para su uso en terapia, el inhibidor pueda administrarse como el producto químico crudo, es posible presentar el principio activo como una composición farmacéutica. Por consiguiente, la memoria descriptiva desvela además composiciones farmacéuticas que comprenden un agente que inhibe una o más proteínas que contienen bromodominios, particularmente SP140, y uno o más portadores, diluyentes o excipientes farmacéuticamente aceptables. El portador o portadores, diluyente o diluyentes o excipiente o excipientes han de ser aceptables en el sentido de ser compatibles con los otros principios de la composición y no perjudiciales para el receptor de los mismos. Según otro aspecto de la divulgación, se proporciona también un procedimiento de preparación de una composición farmacéutica que incluye el agente o sales farmacéuticamente aceptables del mismo, con uno o más portadores, diluyentes o excipientes farmacéuticamente aceptables. La composición farmacéutica puede ser para su uso en el tratamiento y/o profilaxis de cualquiera de las afecciones descritas en la presente memoria.

Las composiciones farmacéuticas pueden presentarse en formas de dosis unitarias que contienen una cantidad predeterminada de principio activo por dosis unitaria. Las composiciones de dosificación unitaria preferentes son aquellas que contienen una dosis o subdosis diaria o una fracción apropiada de la misma, de un principio activo. Por lo tanto, tales dosis unitarias se pueden administrar una vez o más de una vez al día. Tales composiciones farmacéuticas pueden prepararse por cualquiera de los procedimientos bien conocidos en la materia de farmacia.

Las composiciones farmacéuticas se pueden adaptar para la administración por cualquier vía apropiada, por ejemplo por vías oral (incluyendo bucal o sublingual), rectal, por inhalación, intranasal, tópica (incluyendo bucal, sublingual o

transdérmica), vaginal o parenteral (incluyendo subcutánea, intramuscular, intravenosa o intradérmica). Tales composiciones se pueden preparar por cualquier procedimiento conocido en la materia de farmacia, por ejemplo asociando el principio activo con el portador o portadores o excipiente o excipientes.

5 Las composiciones farmacéuticas adaptadas para administración oral pueden presentarse como unidades discretas, tales como cápsulas o comprimidos; polvos o gránulos; soluciones o suspensiones en líquidos acuosos o no acuosos; espumas o batidos comestibles; o emulsiones líquidas de aceite en agua o emulsiones líquidas de agua en aceite.

10 Por ejemplo, para administración oral en forma de un comprimido o cápsula, el componente fármaco activo se puede combinar con un portador inerte oral no tóxico farmacéuticamente aceptable, tal como etanol, glicerol, agua y similares. Los polvos se preparan mediante la reducción del compuesto a un tamaño fino adecuado y la mezcla con un portador farmacéutico preparado de forma similar, tal como un carbohidrato comestible, como por ejemplo, almidón o manitol. Pueden estar presentes también aromatizantes, conservantes, dispersantes y agentes colorantes.

15 Las cápsulas se fabrican preparando una mezcla en polvo, como se ha descrito anteriormente, y llenando vainas de gelatina formadas. Los deslizantes y lubricantes, tales como sílice coloidal, talco, estearato de magnesio, estearato de calcio o polietilenglicol sólido se pueden añadir a la mezcla de polvo antes de la operación de relleno. Un agente disgregante o solubilizante, tal como agar-agar, carbonato de calcio o carbonato de sodio también se puede añadir para mejorar la disponibilidad del medicamento cuando se ingiera la cápsula.

20 Además, cuando se desee o sea necesario, también se pueden incorporar en la mezcla aglutinantes, deslizantes, lubricantes, agentes edulcorantes, aromas, agentes disgregantes y agentes colorantes. Los aglutinantes adecuados incluyen almidón, gelatina, azúcares naturales, tales como glucosa o beta-lactosa, edulcorantes de maíz, gomas naturales y sintéticas, tales como acacia, tragacanto o alginato de sodio, carboximetilcelulosa, polietilenglicol, ceras y similares. Los lubricantes utilizados en estas formas de dosificación incluyen oleato de sodio, estearato de sodio, estearato de magnesio, benzoato sódico, acetato sódico, cloruro sódico y similares. Los disgregantes incluyen, sin limitación, almidón, metilcelulosa, agar, bentonita, goma xantana y similares. Los comprimidos se formulan, por ejemplo, por preparación de una mezcla de polvo, granulación o pre-compresión, adición de un lubricante y disgregante y prensado en comprimidos. Una mezcla de polvo se prepara mezclando el compuesto, adecuadamente triturado, con un diluyente o base como se ha descrito anteriormente, y opcionalmente, con un aglutinante, tal como carboximetilcelulosa, alginato, gelatina o polivinilpirrolidona, un retardante de solución, tal como parafina, un acelerador de la resorción, tal como una sal cuaternaria y/o un agente de absorción, tal como bentonita, caolín o fosfato dicálcico. La mezcla de polvo se puede granular humedeciéndose con un aglutinante, tal como jarabe, pasta de almidón, mucílago de acacia o soluciones de materiales celulósicos o poliméricos y prensándola a través de un tamiz. Como alternativa a la granulación, la mezcla de polvo se puede realizar a través de la máquina de comprimidos y el resultado son cápsulas formadas de manera imperfecta en gránulos. Los gránulos se pueden lubricar para evitar que se peguen al comprimido formando matrices por medio de la adición de ácido esteárico, una sal estearato, talco o aceite mineral. La mezcla lubricada se comprime entonces en comprimidos. Los compuestos de la presente invención también se pueden combinar con un portador inerte de flujo libre y comprimir en comprimidos directamente sin pasar por las etapas de granulación o pre-compresión. Se pueden proporcionar un recubrimiento protector transparente u opaco que consiste en una capa de sellado de goma laca, un recubrimiento de azúcar o material polimérico y un recubrimiento pulido de cera. Se pueden añadir materias colorantes a estos recubrimientos para distinguir las diferentes dosificaciones unitarias.

45 Los fluidos orales, tales como solución, jarabes y elixires se pueden preparar en forma de dosificación unitaria de manera que una cantidad dada contenga una cantidad predeterminada del compuesto. Los jarabes se pueden preparar disolviendo el compuesto en una solución acuosa adecuadamente aromatizada, mientras que los elixires se preparan mediante el uso de un vehículo alcohólico no tóxico. Las suspensiones pueden formularse dispersando el compuesto en un vehículo no tóxico. Asimismo se pueden añadir solubilizantes y emulsionantes, tales como alcoholes isoestearílicos etoxilados y éteres de polioxietilensorbitol, conservantes, aditivos de sabor, tales como aceite de menta o edulcorantes naturales o sacarina u otros edulcorantes artificiales, y similares.

50 Cuando sea apropiado, las composiciones de dosificación unitaria para administración oral se pueden microencapsular. La composición también se puede preparar para prolongar o mantener la liberación como por ejemplo revistiendo o embebiendo material particulado en polímeros, cera o similares.

Los compuestos de la invención también pueden administrarse en forma de sistemas de administración de liposomas, tales como vesículas unilamelares pequeñas, vesículas unilamelares grandes y vesículas multilamelares. Los liposomas pueden formarse a partir de una variedad de fosfolípidos, tales como colesterol, estearilamina o fosfatidilcolinas.

55 Las composiciones farmacéuticas adaptadas para la administración transdérmica pueden presentarse como parches discretos que tienen por objeto permanecer en contacto íntimo con la epidermis del receptor durante un periodo prolongado de tiempo.

Las composiciones farmacéuticas adaptadas para la administración tópica pueden formularse como pomadas,

cremas, suspensiones, lociones, polvos, soluciones, pastas, geles, pulverizaciones, aerosoles o aceites.

5 Para tratamientos del ojo u otros tejidos externos, por ejemplo boca y piel, las composiciones se aplican preferentemente como una pomada o crema tópica. Cuando se formula en una pomada, el principio activo se puede emplear con una base de pomada parafínica o miscible en agua. Alternativamente, el principio activo puede formularse en una crema con una base de crema de aceite en agua o una base de agua en aceite.

Las composiciones farmacéuticas adaptadas para administraciones tópicas en el ojo incluyen colirios en los que el principio activo se disuelve o suspende en un portador adecuado, especialmente un disolvente acuoso.

Las composiciones farmacéuticas adaptadas para administración tópica en la boca incluyen pastillas para chupar, pastillas y colutorios.

10 Las composiciones farmacéuticas adaptadas para administración rectal pueden presentarse como supositorios o como enemas.

Las formas de dosificación para administración nasal o inhalada pueden convenientemente formularse como aerosoles, soluciones, suspensiones, gotas, geles o polvos secos.

15 Para composiciones adecuadas y/o adaptadas para administración inhalada, se prefiere que el agente esté en una forma reducida de tamaño de partículas, y más preferentemente la forma de tamaño reducido se obtiene o puede obtenerse por micronización. El tamaño de partículas preferente del compuesto de tamaño reducido (p. ej., micronizado) o sal o solvato se define por un valor D50 de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 10 micrómetros (por ejemplo tal como se mide utilizando difracción láser). Las composiciones adaptadas para administración por inhalación incluyen los polvos o nieblas de partículas. Las composiciones adecuadas en las que el portador es un líquido para administración como una pulverización o gotas nasales incluyen soluciones/suspensiones acuosas u oleosas del principio activo que pueden generarse por medio de diversos tipos de aerosoles nebulizadores o insufladores presurizados dosificadores.

20 Las formulaciones de aerosol, p. ej., para administración inhalada, pueden comprender una solución o suspensión fina del agente en un disolvente acuoso o no acuoso farmacéuticamente aceptable. Las formulaciones de aerosol pueden presentarse en cantidades individuales o multidosis en forma estéril en un recipiente sellado, que puede adoptar la forma de un cartucho o recarga para su uso con un dispositivo atomizador o inhalador. Alternativamente, el recipiente sellado puede ser un dispositivo de dispensación unitaria, tal como un inhalador nasal de una sola dosis o un dispensador de aerosol equipado con una válvula dosificadora (inhalador dosificador) que tiene por objeto desecharse una vez que los contenidos del recipiente se hayan agotado.

25 Cuando la forma de dosificación comprende un dispensador de aerosol, contiene preferentemente un propulsor adecuado bajo presión, tal como aire comprimido, dióxido de carbono o un propulsor orgánico, tal como un hidrofluorocarbono (HFC). Los propulsores de HFC adecuados incluyen 1,1,1,2,3,3,3-heptafluoropropano y 1,1,1,2-tetrafluoroetano. Las formas de dosificación de aerosol también pueden adoptar la forma de un atomizador de bomba. El aerosol presurizado puede contener una solución o una suspensión del compuesto activo. Esto puede requerir la incorporación de excipientes adicionales p. ej., co-disolventes y/o tensioactivos para mejorar las características de dispersión y homogeneidad de las formulaciones en suspensión. Las formulaciones en solución también pueden requerir la adición de co-disolventes tales como etanol. Otros modificadores de excipiente también pueden incorporarse para mejorar, por ejemplo, la estabilidad y/o el sabor y/o las características de masa de partículas finas (cantidad y/o perfil) de la formulación.

30 Para composiciones farmacéuticas adecuadas y/o adaptadas para administración inhalada, la composición farmacéutica puede ser una composición inhalable de polvo seco. Tal composición puede comprender una base de polvo, tal como lactosa, glucosa, trehalosa, manitol o almidón, el agente, (preferentemente en forma de partículas de tamaño reducido, p. ej., en forma micronizada), y opcionalmente un modificador del rendimiento, tal como L-leucina u otro aminoácido, octaacetato de celobiosa y/o sales metálicas de ácido esteárico, tales como estearato de magnesio o calcio.

35 Las formulaciones de aerosol se disponen preferentemente de manera que cada dosis medida o "pulsación" de aerosol contenga una cantidad particular de un compuesto de la invención. La administración puede realizarse una vez al día o varias veces al día, por ejemplo 2, 3 u 8 veces, dando por ejemplo 1, 2 o 3 dosis cada vez. La dosis diaria total y la dosis dosificada suministrada por cápsulas y cartuchos en un inhalador o insuflador será generalmente el doble que con formulaciones de aerosol.

Las composiciones farmacéuticas adaptadas para administración vaginal pueden presentarse como pesarios, tampones, cremas, geles, pastas, espumas o formulaciones de pulverización.

40 Las composiciones farmacéuticas adaptadas para administración parental incluyen soluciones de inyección estériles acuosas y no acuosas que pueden contener antioxidantes, tampones, bacteriostáticos y solutos que hacen que la composición sea isotónica con la sangre del receptor previsto; y suspensiones estériles acuosas y no acuosas que pueden incluir agentes de suspensión y agentes espesantes. Las composiciones se pueden presentar en recipientes



de dosis unitaria o multidosis, por ejemplo ampollas selladas y viales, y pueden almacenarse en una condición secada por congelación (lío-filizado) que requiere solo la adición del portador líquido estéril, por ejemplo agua para inyecciones, inmediatamente antes del uso. Las soluciones y suspensiones para inyección extemporánea pueden prepararse a partir de polvos estériles, gránulos y comprimidos.

- 5 Debe entenderse que además de los principios particularmente mencionados anteriormente, las composiciones pueden incluir otros agentes convencionales en la técnica teniendo en cuenta el tipo de formulación en cuestión, por ejemplo aquellos adecuados para administración oral pueden incluir agentes aromatizantes.

Las moléculas de interferencia de ARN o antisentido se pueden administrar al mamífero en necesidad de las mismas. Alternativamente, se pueden administrar las construcciones que incluyen las mismas. Tales moléculas y construcciones pueden utilizarse para interferir con la expresión de la proteína de interés, p. ej., la proteína que contiene bromodominios y como tal modificar la expresión génica. Normalmente la administración se efectúa por medios conocidos en la técnica.

10

Las moléculas antisentido o de interferencia de ARN pueden administrarse *in vitro* a células o *in vivo*, p. ej., a tumores de un mamífero. Los modos de administración se pueden utilizar sin limitaciones, incluyendo: administración intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, intraarterial, local durante la cirugía, endoscópica, subcutánea, y per os. Los vectores se pueden seleccionar para propiedades deseables para cualquier aplicación particular. Los vectores pueden ser virales o plásmidos. Los vectores adenovirales son útiles en este sentido. Los promotores específicos de tejido, específicos de tipo celular o regulables pueden utilizarse para controlar la transcripción de las moléculas de polinucleótidos inhibidores. Los portadores no virales, tales como liposomas o nanoesferas también se pueden utilizar.

15

20

Una cantidad terapéuticamente eficaz del agente dependerá de una serie de factores que incluyen, por ejemplo, la edad y el peso del sujeto, la condición precisa que requiere un tratamiento y su gravedad, la naturaleza de la formulación y la vía de administración, y la voluntad en última instancia se dejará a la discreción del médico o veterinario responsable. En particular, el sujeto a ser tratado es un mamífero, particularmente un ser humano.

- 25 El agente puede administrarse en una dosis diaria. Esta cantidad se puede administrar en una dosis única por día o más usualmente en un número (tal como dos, tres, cuatro, cinco o seis) de subdosis al día, tal que la dosis diaria total sea la misma.

El agente se pueden emplear solo o en combinación con otros agentes terapéuticos.

- 30 El agente para su uso en la presente invención se puede utilizar en combinación o incluir uno o más de otros agentes terapéuticos y se puede administrar secuencialmente o simultáneamente por cualquier vía conveniente en composiciones farmacéuticas separadas o combinadas.

El agente y las composiciones farmacéuticas contenidos en la invención pueden utilizarse en combinación o incluir uno o más de otros agentes terapéuticos, por ejemplo seleccionarse entre AINEs, corticosteroides, inhibidores COX-2, inhibidores de citoquinas, agentes anti-TNF, inhibidores de la oncostatina M, anti-malaria, inmunosupresores y citostáticos.

35

### **Procedimientos de tratamiento y enfermedades**

Se desvelan en la presente memoria procedimientos de tratamiento o prevención de afecciones y enfermedades autoinmunitarias e inflamatorias que se pueden mejorar mediante la inhibición de proteínas que contienen bromodominios y de este modo, p. ej., modular el nivel de expresión de genes objetivo activados por acetilación y reprimidos por acetilación. Un procedimiento puede comprender administrar a un sujeto, p. ej., un sujeto en necesidad del mismo, una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente descrito en la presente memoria.

40

Así, en un aspecto se desvela el uso de un inhibidor de bromodominio en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de enfermedades o afecciones autoinmunitarias e inflamatorias.

En un aspecto adicional, se desvela un procedimiento de tratamiento de enfermedades o afecciones autoinmunitarias e inflamatorias en un mamífero que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de bromodominio.

45

En un aspecto, la proteína que contiene bromodominios es SP140.

En un aspecto, el inhibidor inhibe la proteína SP140 que contiene bromodominios.

Basándose en al menos en el hecho de que se ha descubierto que el aumento de la acetilación de histonas se asocia con la inflamación, un procedimiento de tratamiento de inflamación en un sujeto puede comprender administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más agentes que disminuyen la acetilación o restauran la acetilación a su nivel en las células normales correspondientes.

50

La inflamación representa un grupo de respuestas vasculares, celulares y neurológicas al traumatismo. La

inflamación puede caracterizarse como el movimiento de células inflamatorias, tales como monocitos, neutrófilos y granulocitos en los tejidos. Esto se asocia generalmente con la reducción de la función de la barrera endotelial y edema en los tejidos. La inflamación puede clasificarse como aguda o crónica. La inflamación aguda es la respuesta inicial del cuerpo a los estímulos nocivos y se logra mediante el aumento del movimiento de plasma y los leucocitos de la sangre a los tejidos lesionados. Una cascada de eventos bioquímicos propaga y madura la respuesta inflamatoria, que implica el sistema vascular local, el sistema inmunológico, y varias células dentro del tejido lesionado. La inflamación prolongada, conocida como inflamación crónica, conduce a un cambio progresivo en el tipo de células que están presentes en el sitio de inflamación y se caracteriza por la destrucción simultánea y la curación del tejido del proceso inflamatorio.

- 5
- 10 Cuando se produce como parte de una respuesta inmunitaria a una infección o como una respuesta aguda a un traumatismo, la inflamación puede ser beneficiosa y normalmente es autolimitante. No obstante, la inflamación puede ser perjudicial en diversas condiciones. Esto incluye la producción de inflamación excesiva en respuesta a agentes infecciosos, que pueden conducir a daños en los órganos relevantes y muerte (por ejemplo, en el nivel de sepsis). Además, la inflamación crónica es generalmente perjudicial y es la raíz de numerosas enfermedades crónicas, causando daños graves e irreversibles en los tejidos. En tales niveles, la respuesta inmunitaria es a menudo dirigida contra auto-tejidos (autoinmunidad), aunque las respuestas crónicas a entidades extranjeras también pueden conducir a daños inespecíficos en los auto-tejidos.

Por lo tanto, el objetivo de la terapia anti-inflamatoria es reducir esta inflamación, para inhibir la autoinmunidad cuando esté presente y permitir el progreso del proceso fisiológico o la curación y la reparación de los tejidos.

- 20 Los agentes se pueden utilizar para tratar la inflamación de cualquier tejido y órgano del cuerpo, incluyendo la inflamación musculoesquelética, inflamación vascular, inflamación neural, inflamación del sistema digestivo, inflamación ocular, inflamación del sistema reproductivo y otras inflamaciones, como se ejemplifica a continuación.

25 La inflamación musculoesquelética se refiere a cualquier afección inflamatoria del sistema músculoesquelético, en particular las afecciones que afectan a las articulaciones esqueléticas, incluyendo articulaciones de la mano, muñeca, codo, hombro, mandíbula, columna vertebral, cuello, cadera, rodilla, tobillo y pie, y las afecciones que afectan a los tejidos que conectan los músculos a los huesos, tales como tendones. Ejemplos de inflamación musculoesquelética que se pueden tratar con los compuestos de la invención incluyen artritis (incluyendo, por ejemplo, osteoartritis, artritis reumatoide, artritis psoriásica, espondilitis anquilosante, artritis infecciosa aguda y crónica, artritis asociada con gota y pseudogota y artritis juvenil idiopática), tendinitis, sinovitis, tenosinovitis, bursitis, fibrositis (fibromialgia), epicondilitis, miositis y osteítis (incluyendo, por ejemplo, enfermedad de Paget, osteítis pubis, y osteítis fibrosa quística).

30 La inflamación ocular refiere a la inflamación de cualquier estructura del ojo, incluyendo los párpados. Ejemplos de inflamación ocular que pueden tratarse con los compuestos de la invención incluyen blefaritis, blefarocalasia, conjuntivitis, dacrioadenitis, queratitis, queratoconjuntivitis sicca (ojo seco), escleritis, triquiasis y uveítis.

- 35 Ejemplos de inflamación del sistema nervioso que pueden tratarse con los compuestos de la invención incluyen encefalitis, síndrome de Guillain-Barre, meningitis, neuromiotonía, narcolepsia, esclerosis múltiple, mielitis y esquizofrenia.

Ejemplos de la inflamación de la vasculatura o el sistema linfático que pueden tratarse con los compuestos de la invención incluyen aterosclerosis, artritis, flebitis, vasculitis y linfangitis.

- 40 Ejemplos de afecciones inflamatorias del sistema digestivo que pueden tratarse con los compuestos de la invención incluyen colangitis, colecistitis, enteritis, enterocolitis, gastritis, gastroenteritis, enfermedad inflamatoria del intestino (como la enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa), ileítis y proctitis.

45 Ejemplos de afecciones inflamatorias del sistema reproductor que pueden tratarse con los compuestos de la invención incluyen cervicitis, corioamnionitis, endometritis, epididimitis, omfalitis, ooforitis, orquitis, salpingitis, absceso tubo-ovárico, uretritis, vaginitis, vulvitis y vulvodinia.

50 Los agentes se pueden utilizar para tratar afecciones autoinmunitarias que tienen un componente inflamatorio. Tales afecciones incluyen alopecia diseminada aguda universalis, enfermedad de Behçet, enfermedad de Chagas, síndrome de fatiga crónica, disautonomía, encefalomielitis, espondilitis anquilosante, anemia aplásica, hidradenitis supurativa, hepatitis autoinmunitaria, ooforitis autoinmunitaria, enfermedad celíaca, enfermedad de Crohn, diabetes mellitus tipo 1, arteritis de células gigantes, síndrome de Goodpasture, enfermedad de Grave, síndrome de Guillain-Barre, enfermedad de Hashimoto, púrpura de Henoch-Schönlein, enfermedad de Kawasaki, lupus eritematoso, colitis microscópica, poliarteritis microscópica, enfermedad mixta del tejido conectivo, esclerosis múltiple, miastenia gravis, síndrome opsoclonus mioclono, neuritis óptica, tiroiditis de Ord, pénfigo, poliarteritis nodosa, polimialgia, artritis reumatoide, síndrome de Reiter, síndrome de Sjogren, arteritis temporal, granulomatosis de Wegener, anemia hemolítica autoinmunitaria cálida, cistitis intersticial, enfermedad de Lyme, morfea, psoriasis, sarcoidosis, esclerodermia, colitis ulcerosa y vitíligo.

55 Los agentes pueden utilizarse para tratar enfermedades de hipersensibilidad mediadas por linfocitos T que tienen un

componente inflamatorio. Tales afecciones incluyen hipersensibilidad por contacto, dermatitis por contacto (incluyendo la debida a la hiedra venenosa), urticaria, alergias de la piel, alergias respiratorias (fiebre del heno, rinitis alérgica) y enteropatía sensible al gluten (enfermedad celíaca).

5 Otras afecciones inflamatorias que pueden tratarse con los agentes incluyen, por ejemplo, apendicitis, dermatitis, dermatomiositis, endocarditis, fibrositis, gingivitis, glositis, hepatitis, hidradenitis supurativa, iritis, laringitis, mastitis, miocarditis, nefritis, otitis, pancreatitis, parotiditis, pericarditis, peritonitis, faringitis, pleuritis, neumonitis, prostatitis, pielonefritis, y estomatitis, rechazo a trasplantes (que implica órganos tales como riñón, hígado, corazón, pulmón, páncreas (p. ej., células de los islotes), médula ósea, córnea, intestino delgado, aloinjertos de piel, homoinjertos de piel, y xenoinjertos de válvulas del corazón, enfermedad del suero y enfermedad del injerto contra huésped),  
 10 pancreatitis aguda, pancreatitis crónica, síndrome de dificultad respiratoria aguda, síndrome de Sexary, hiperplasia suprarrenal congénita, tiroiditis no supurativa, hipercalcemia asociada con el cáncer, pénfigo, dermatitis herpetiforme bullosa, eritema multiforme grave, dermatitis exfoliativa, dermatitis seborreica, rinitis alérgica estacional o perenne, asma bronquial, dermatitis de contacto, dermatitis atópica, reacciones de hipersensibilidad a fármacos, conjuntivitis alérgica, queratitis, herpes zóster oftálmico, iritis y oiridociclitis, coriorretinitis, neuritis óptica, sarcoidosis sintomática,  
 15 quimioterapia de tuberculosis pulmonar fulminante o diseminada, púrpura trombocitopénica idiopática en adultos, trombocitopenia secundaria en adultos, anemia hemolítica adquirida (autoinmunitaria), leucemia y linfomas en adultos, leucemia aguda de la infancia, enteritis regional, vasculitis autoinmunitaria, esclerosis múltiple, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, rechazo de trasplante de órganos sólidos, sepsis. Los tratamientos preferentes incluyen el tratamiento del rechazo de trasplantes, artritis reumatoide, artritis psoriásica, esclerosis múltiple, diabetes tipo 1, asma, enfermedad inflamatoria del intestino, lupus eritematoso sistémico, psoriasis, enfermedad pulmonar crónica e inflamación que acompaña a las enfermedades infecciosas (p. ej., sepsis).  
 20

Los usos de la invención se pueden utilizar en los mamíferos, particularmente en seres humanos.

La presente memoria descriptiva también desvela un procedimiento de identificación de agentes que pueden ser compuestos candidatos para el tratamiento de enfermedades o afecciones autoinmunitarias e inflamatorias que comprende determinar si un compuesto es capaz de inhibir la proteína SP140 que contiene bromodominios.  
 25

#### **Procedimientos de identificación sistemática**

La presente memoria descriptiva propone, por primera vez que las proteínas que contienen bromodominio, particularmente SP140, son objetivos terapéuticos para el tratamiento de enfermedades y afecciones inflamatorias y autoinmunitarias. Así, la presente memoria descriptiva desvela nuevos objetivos para la identificación, validación,  
 30 selección y optimización de agentes activos sobre la base de su capacidad para modular la expresión o actividad de las proteínas que contienen bromodominios, particularmente la proteína SP140 que contiene bromodominios. Tales agentes activos incluyen inhibidores como se ha descrito anteriormente.

La presente memoria descriptiva desvela de este modo un procedimiento de identificación, identificación sistemática, caracterización o definición de un agente que es capaz de modular la actividad de la proteína SP140 que contiene bromodominios. Los procedimientos se pueden utilizar para identificar sistemáticamente la proteína SP140 que contiene bromodominios. Los procedimientos se pueden utilizar para identificar sistemáticamente, por ejemplo, un gran número de compuestos candidatos para su uso clínico en enfermedades inflamatorias y autoinmunitarias.  
 35

Los ensayos (procedimientos de identificación sistemática) se pueden realizar en un sistema basado en células, un sistema animal o por un sistema libre de células. Tales técnicas resultarán evidentes para un experto en la materia y pueden basarse en una medida de interacción [p. ej., ensayos de unión, desplazamiento o competencia) o una medida de la función de la actividad, transcripción y similares.  
 40

Así, por ejemplo, la presente memoria desvela un procedimiento de ensayo de la capacidad de un agente para modular la expresión de la proteína SP140 que contiene bromodominios, particularmente para inhibir la expresión. En otro ejemplo, la presente memoria descriptiva desvela un procedimiento de ensayo de la capacidad de un agente para unirse y opcionalmente modular la actividad de la proteína SP140 que contiene bromodominios, particularmente para inhibir la actividad. En un ejemplo adicional, la presente memoria descriptiva desvela un procedimiento para ensayar la capacidad de un agente para modular la actividad de la proteína SP140 que contiene bromodominios, particularmente para inhibir la actividad. En la memoria descriptiva se desvelan procedimientos de identificación sistemática para identificar agentes que inhiben proteínas que contienen bromodominios como potencialmente útiles en el tratamiento de prevención de enfermedades y afecciones autoinmunitarias e inflamatorias y/o cáncer. Un procedimiento implica la identificación sistemática de un inhibidor de la actividad de la proteína que contiene bromodominios, que incluye las etapas de poner en contacto un péptido, que puede modificarse por acetilación, con un bromodominio, particularmente la proteína SP140 que contiene bromodominios o un fragmento de los mismos en presencia y ausencia de una sustancia de ensayo, e identificar una sustancia de ensayo como un inhibidor o activador de la actividad de bromodominio. Los agentes de ensayo (o sustancias) para la identificación sistemática como inhibidores de bromodominio pueden proceder de cualquier fuente conocida en la materia. Pueden ser productos naturales, purificados o mezclas, compuestos sintéticos, miembros de bibliotecas de compuestos, etc. Las sustancias de ensayo se pueden seleccionar entre aquellas que han sido previamente identificadas que tienen actividad biológica o de fármacos o de aquellas que no tienen.  
 45  
 50  
 55

En un aspecto adicional de la divulgación, el procedimiento de identificación sistemática para un inhibidor de la proteína que contiene bromodominios incluye un ensayo de unión. Así, un compuesto que inhibe la unión de la proteína SP140 que contiene bromodominios a su sustrato puede identificarse en ensayos de competencia o unión directa. Ambos formatos de ensayo de unión directa y de competencia son similares a los formatos utilizados en inmunoensayos y ensayos de unión al receptor y serán generalmente conocidos por un experto en la materia.

En un aspecto, la proteína que contiene bromodominios es SP140.

Normalmente, los procedimientos utilizan péptidos de la proteína SP140. En particular, los procedimientos utilizan una proteína humana. Más particularmente, la proteína tiene la secuencia de aminoácidos de la proteína SP140 humana como se describe en el número de acceso NP\_001420.2. o un fragmento de la misma o una secuencia que tiene al menos 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de homología con la secuencia de aminoácidos de la proteína SP140 humana o un fragmento de la misma.

Preferentemente, los fragmentos son al menos 110 aminoácidos de longitud e incluyen el bromodominio.

La presente divulgación contempla además análogos de las secuencias de aminoácidos formados por sustitución de aminoácidos conservadora. El principio detrás de la sustitución de aminoácidos conservadora es que ciertos pares de aminoácidos tienen cadenas laterales compatibles de tal manera que, cuando un aminoácido es sustituido con otro, habrá solo cambios mínimos en la estructura terciaria del péptido. Las reglas para sustituciones conservadoras se explican en Bowie y col. *Science* 247 (1990) 1306-1310. Es objeto de la presente divulgación utilizar polipéptidos, fragmentos y variantes que retienen la capacidad de la proteína para unirse al sustrato.

Cuando se requiera, cada uno de los polipéptidos, fragmentos y variantes, cuando se precisen, pueden proporcionarse ya sea en forma purificada o no purificada, por ejemplo como extractos celulares o mediante purificación del componente relevante de tales extractos. Alternativamente, los polipéptidos, fragmentos y variantes se pueden producir de forma recombinante mediante técnicas de expresión recombinante, y purificarse para su uso en el ensayo. Alternativamente, los polipéptidos, fragmentos y variantes pueden expresarse de forma recombinante en una célula para su uso en ensayos basados en células.

Normalmente, un polinucleótido que codifica el componente relevante se proporciona dentro de un vector de expresión. Tales vectores de expresión se construyen rutinariamente en la técnica y pueden implicar, por ejemplo el uso de ADN plásmido e iniciadores, promotores, potenciadores y otros elementos apropiados, tales como por ejemplo señales de poliadenilación que pueden ser necesarias y que se posicionan en la orientación correcta con el fin de permitir la expresión de la proteína completa. Los vectores adecuados resultarán con facilidad evidentes para los expertos en la materia, tales como los descritos con más detalle en los ejemplos de la presente solicitud. Las secuencias promotoras pueden ser promotores inducibles o constitutivos en función del formato de ensayo seleccionado.

Como se han descrito sustratos naturales para bromodominios que incluyen péptidos de histonas acetiladas, sustratos preferentes podrían comprender péptidos correspondientes a estas secuencias y modificaciones. Por el contrario, podrían utilizarse otros péptidos con afinidad adecuada para SP140.

Así, por ejemplo el sustrato puede ser un péptido, tal como un péptido sintético que comprende residuos N-terminales de 3 o 4 histonas, al menos 10, 20, 30, 40, 50 o de longitud completa. El sustrato puede ser al menos 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, homólogo al mismo.

También puede ser preferente utilizar un sustrato seleccionado entre histonas a granel, péptidos sintéticos y nucleosomas.

Los siguientes ejemplos se exponen para ilustrar la eficacia del enfoque descrito en la presente invención y para ejemplificar adicionalmente aplicaciones particulares de procedimientos generales descritos anteriormente. Por consiguiente, la siguiente sección de ejemplos no tiene por objeto en modo alguno limitar el alcance de la invención contemplado en la presente memoria.

## **Ejemplos**

Para investigar si SP140 podría representar un objetivo para el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias e inflamatorias, se realizó una serie de experimentos que exploran la función de esta proteína en las células inmunitarias. Estos estudios se centraron principalmente en los linfocitos T CD4<sup>+</sup> debido a su papel clave en la inflamación y la autoinmunidad. El enfoque inicial fue evaluar las consecuencias funcionales de reducción de la expresión de SP140 utilizando ARN inhibidor pequeño (ARNip). Puesto que un número de factores dispares puede influir en si un ARNip puede reducir eficazmente la expresión de su gen objetivo, y aún no se han desarrollado algoritmos avanzados capaces de predecir con precisión ARNips eficaces (4), se sometió a ensayo en primer lugar varios ARNips por su capacidad para reducir los niveles de ARNm de SP140 en los linfocitos T CD4<sup>+</sup> humanos (Tabla 1). Como se muestra en la Figura 1, cinco de seis ARNips sometidos a ensayo fueron capaces de reducir ARNm de SP140, mientras que un sexto (SP140-2') demostró una actividad escasa o nula.

Tabla 1. Listado de ARNips utilizados para reducir la expresión de SP140

| Nombre de ARNip | Secuencia             |
|-----------------|-----------------------|
| SP140-2'        | TCGGGTGTGATCCTAGGCCAA |
| SP140-5'        | CAGGATGGTGCAGAGATCCA  |
| SP140-6'        | CAGGATTAACCTGATGGCCTA |
| SP140-7'        | CCCAGTGACAAGAGTGATGTA |
| SP140-10'       | AAAGGGCATTAAACGGGAAA  |
| SP140-12'       | CACCTCCATGCAGAAGCCCTA |
| SP140-13'       | CTGGTTTGCCACTGACTTCAA |

5 Los linfocitos T implicados en la autoinmunidad/inflamación muestran signos de haber sido previamente activados, exhibiendo un fenotipo de memoria o efector. Tales células pueden identificarse y aislarse en la base de la isoforma de CD45 que se expresa siendo positiva para CD45RO y negativa para CD45RA. Por lo tanto, se examinó el efecto de reducir la expresión de SP140 en linfocitos T CD4<sup>+</sup> de memoria/efectores CD45RO<sup>+</sup> CD45RA<sup>-</sup> humanos.

10 Los ARNips dirigidos a SP140 se introdujeron en linfocitos T CD4<sup>+</sup> de memoria/efectores primarios humanos de la sangre periférica de donantes sanos. Estas células se estimularon posteriormente con células dendríticas (CDs) derivadas de donantes no relacionados. Tales CDs expresan antígenos del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) que son reconocidos por el receptor de linfocitos T (RLT) de los linfocitos T que responden. Las CDs también se pretrataron previamente con LPS o curdlano, dos productos derivados de bacterias que activan las CDs y aumentan su capacidad estimuladora de linfocitos T. Puesto que CDs activadas son las células clave que intervienen en la estimulación de linfocitos T *in vivo*, este protocolo se diseñó para imitar estrechamente las condiciones fisiológicas de la activación de linfocitos T.

15 Las citoquinas presentes en el medio de los cultivos de linfocitos T-CD se cuantificaron después de 3 días de cocultivo. Se ha demostrado que los ARNips dirigidos contra la proteína SP140 que contiene bromodominios inhiben consistentemente la producción de la citoquina pro-inflamatoria IL-17 cuando se introduce en linfocitos T CD4<sup>+</sup> de memoria/efectores (Figura 2). Esto era evidente si las CDs se activaron con curdlano (Figura 2A) o LPS (Figura 2B). Dada la importancia de IL-17 en la promoción de la inflamación (5,6), el efecto inhibitorio de ARNip de SP140 sobre la producción de los resultados de esta citoquina indicó que SP140 contribuye a un fenotipo de linfocitos T pro-inflamatorio.

20 Además de utilizar las CD activadas para estimular los linfocitos T, también se examinaron las respuestas después de la activación de linfocitos T mediante una combinación de anticuerpos anti-CD28 y anti-CD3. Como se muestra en la Figura 3, los linfocitos T CD4<sup>+</sup> CD45RO<sup>+</sup> CD45RA<sup>-</sup> transfectados con ARNips contra SP140 demostraron una reducción de la producción de todas las citoquinas efectoras (IL-17, IFN- $\gamma$ , IL-13, TNF- $\alpha$ , IL-10) medida después de este tipo de estimulación. Además, se observaron resultados similares cuando se utilizaron ARNips de SP140 para reducir la expresión de SP140 en una estirpe linfocítica T CD4<sup>+</sup> humana, HuT78 (Figura 4). Como se observó después de la estimulación con anti-CD3/CD28 de linfocitos T CD4<sup>+</sup> CD45RO<sup>+</sup> CD45RA<sup>-</sup> primarios, las células HUT78 transfectadas con ARNips de SP140 demostraron una reducción de la producción de todas las citoquinas en comparación con las células transfectadas con ARNip de control.

25 Dada la importancia de IL-17 e IFN- $\gamma$  en la promoción de la autoinmunidad y la inflamación (5,6), se estudió aún más el papel de SP140 en linfocitos T especializados en la producción de estas citoquinas. Específicamente, se examinó el efecto de ARNips de SP140 sobre la función de linfocitos T CD4<sup>+</sup> CD161<sup>+</sup>, un subconjunto de linfocitos T notificado por especializarse en la producción de IL-17, pero que también puede producir IFN- $\gamma$  y está implicado en diferentes tipos de inflamación (7). Como se muestra en la Figura 5, la transfección de ARNips de SP140 en linfocitos T CD4<sup>+</sup> CD161<sup>+</sup> CD45RO<sup>+</sup> antes de la estimulación con anti-CD3/CD28 redujo la producción de tanto IL-17 como IFN- $\gamma$  por estas células. Tomados en conjunto, estos estudios de ARNip implican SP140 en la producción de citoquinas pro-inflamatorias por linfocitos T CD4<sup>+</sup> e indican que los enfoques para inhibir la expresión y/o función de esta proteína que contiene bromodominios serían beneficiosos para el tratamiento de enfermedades y afecciones autoinmunitarias e inflamatorias.

35 Ya que un enfoque adicional evalúa la función de SP140 en los linfocitos T, se examinaron artificialmente los efectos de sobreexpresión de SP140 en linfocitos T CD4<sup>+</sup>. Los plásmidos que codifican SP140 de longitud completa, o la proteína verde fluorescente (PVF) como control, se transfectaron en linfocitos T CD4<sup>+</sup> CD45RO<sup>+</sup> CD45RA<sup>-</sup>. Las células transfectadas se estimularon con CDs alogénicas activadas con curdlano y se midieron las citoquinas presentes en el medio tres días más tarde. Como se muestra en la Figura 6, las células transfectadas con el plásmido de expresión de SP140 produjeron niveles más altos de IL-17 e IFN- $\gamma$  que las células de control. Tomados en conjunto con el hecho de que el tratamiento de ARNip produjo el fenotipo inverso, estos datos implican fuertemente SP140 en la producción de citoquinas pro-inflamatorias por los linfocitos T.

Para investigar aún más la asociación entre SP140 y la función inflamatoria inmunitaria, se evaluó la expresión de la proteína SP140 bajo condiciones de reposo frente a activadas/inflamadas. Para examinar la regulación de la expresión de SP140 en los linfocitos T, la proteína SP140 se midió por transferencia de Western, inicialmente en CMSPs enriquecidas con linfocitos T deplecionados con monocitos antes y después de la activación con anti-CD3/CD28 (Figura 7). Si bien se detectó la proteína SP140 en las células en reposo, se observó un fuerte aumento de la proteína SP140 después de la estimulación de linfocitos T (Figura 7C). La evaluación de la expresión de la proteína SP140 en linfocitos T CD4<sup>+</sup> purificados en diferentes momentos después de la estimulación con anti-CD3/CD28 confirmó que SP140 fue de hecho expresada en los linfocitos T y que la expresión de linfocitos T de SP140 aumentó después de la activación (Figura 8). La proteína SP140 se elevó 24 h después de la estimulación de linfocitos T y los niveles continuaron aumentando al menos hasta 96 horas post-activación. Del mismo modo, se observó un marcado aumento en la proteína SP140 en CDs 24 horas después de la estimulación con LPS (Figura 7D, 9). Los niveles de proteína SP140 en DC permanecieron elevados al menos hasta 48 h después del tratamiento con LPS (Figura 9). Así, la expresión elevada de la proteína SP140 se asocia con linfocitos T y la activación de CDs.

Pruebas adicionales para la regulación positiva de SP140 bajo condiciones de activación inmunitaria se proporcionaron mediante el examen de la expresión de SP140 en tejidos humanos por inmunohistoquímica (Figura 10). La evaluación de la expresión en una variedad de tejidos sanos e inflamados reveló que la proteína SP140 se restringió a las células mononucleares. Por ende, se observó tinción en SP140 en los linfocitos T y B en los tejidos linfoides normales, pero era en gran parte ausente en los tejidos no linfoides sanos (aparte de estructuras linfoides normales presentes en algunos tejidos). Sorprendentemente, se observaron grandes infiltrados de células fuertemente teñidas para SP140 en numerosos tejidos inflamados de una variedad de afecciones autoinmunitarias/inflamatorias. Esto incluyó: tiroiditis de Hashimoto, tiroides; enfermedad de Crohn, colon; apendicitis, apéndice; síndrome de Sjogren, quiste cervical; artritis reumatoide, membrana sinovial; artritis psoriásica, membrana sinovial; tiroiditis granulomatosa subaguda, tiroides; cirrosis biliar, hígado; sarcoidosis, pulmón; colitis ulcerosa, colon (Figura 10 y datos no mostrados). Así, la expresión de SP140 aumenta en las células inmunitarias después de la activación y las células SP140<sup>+</sup> son prominentes en los tejidos inflamados, que implican aún más esta proteína en la inflamación y la autoinmunidad.

Por último, se exploró la posibilidad de que la función de SP140 esté ligada a su capacidad para unirse a la cromatina, una propiedad clave de las proteínas que contienen bromodominios. Por ende, una forma en que SP140 podría funcionar para controlar la producción de citoquinas sería mediante la unión a la cromatina en o cerca de genes de citoquinas y la regulación del acceso del gen a componentes de la maquinaria transcripcional. No obstante, ninguna información se ha publicado en relación con una asociación entre SP140 y cromatina. Para abordar esta posibilidad, se realizaron experimentos de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) para determinar si la proteína SP140 puede asociarse con genes de citoquinas en CDs, y si esto se ve influenciado por la activación de CD.

ChIP se llevó a cabo en las CDs no tratadas y las CDs en varios intervalos temporales después del tratamiento con LPS (Figura 11). En comparación con un anticuerpo de control negativo, ChIP que utiliza un anticuerpo anti-SP140 mostró un enriquecimiento de ADN en el sitio de inicio de la transcripción (SIT) de TNF- $\alpha$  en CDs en reposo (Figura 11A, C). Esta observación sugirió que SP140 exhibe asociación basal con este locus del gen de citoquina en CDs no activadas. Notablemente, una hora después del tratamiento de las CDs con LPS, SP140 mostró un fuerte aumento de la asociación con el SIT de TNF- $\alpha$  (Figura 11A), pero no con el SIT del gen de  $\beta$ -globina, que no se expresa en CDs (Figura 11B, D). La cantidad de SP140 asociada con el SIT de TNF- $\alpha$  volvió al valor basal 8 horas después del tratamiento con LPS (Figura 11C). Estos datos proporcionan la primera evidencia de que SP140 puede asociarse con la cromatina y son consistentes con la idea de que SP140 desempeña un papel en la regulación de la expresión de citoquinas inflamatorias a través de su capacidad para asociarse con la cromatina en los loci de genes de citoquinas.

En resumen, estos datos demuestran un papel inesperado para la proteína SP140 que contiene bromodominios en la respuesta inmunitaria inflamatoria. La inhibición de la expresión y/o la función de esta proteína representa un enfoque innovador para el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias e inflamatorias.

#### Procedimientos:

Aislamiento de CMSPs humanas: (Preparación realizada en RT). La sangre humana desfibrinada (25-30 ml/tubo) se centrifugó a 2.000 rpm durante 10 min, después de lo cual se separó el suero y se inactivó por calor a 56 °C durante 30 min. Los tubos se llenaron hasta 50 ml con TFS (+ Ca + Mg) y se mezclaron a fondo. 25 ml de sangre diluida se dispusieron en capas sobre 15 ml de Lymphoprep y se centrifugaron a 2.500 rpm durante 20 min a TA (suspensión). Las monocapas se transfirieron a tubos limpios etiquetados (dos monocapas agrupadas/tubo). Los tubos se llenaron hasta 50 ml con TFS y se centrifugaron durante 10 min a 2.500 rpm.

Aislamiento de linfocitos T CD4<sup>+</sup>: CMSP se volvieron a suspender en 1 ml de SFB al 2 % en TFS en un tubo de 50 ml. Se contaron las células y el volumen de la suspensión de CMSP se ajustó a  $1 \times 10^7$  células/0,1 ml de SFB al 2 % en TFS. Se añadieron 20  $\mu$ l de mezcla de anticuerpo (proporcionada en kit)/ $1 \times 10^7$  células. Las células se incubaron durante 10 minutos a 4 °C (en frigorífico). El volumen en el tubo se llevó hasta 50 ml con SFB al 2 % en TFS, después de lo cual el tubo se centrifugó durante 5 minutos a 1.600 rpm. Las células se volvieron a suspender en 0,9

ml de SFB al 2 % en TFS/10<sup>7</sup> células. Se añadieron 100 µl de perlas Dynal lavadas/10<sup>7</sup> células. Las células se mezclaron con las perlas a TA durante 15 minutos. Las rosetas se volvieron a suspender por pipeteado cuidadoso y el volumen en el tubo se aumentó mediante la adición de 1 ml de SFB al 2 % en TFS/10<sup>7</sup> células. Después, el tubo se colocó en un imán Dynal durante 2 minutos y el sobrenadante se transfirió (linfocitos T CD4<sup>+</sup>) a un tubo reciente.

5 Las células se centrifugaron a 1.600 rpm durante 5 minutos en una centrífuga de sobremesa Sorvall. Las células se volvieron a suspender en 1 ml de medio en un tubo Eppendorf y se colocaron en un imán Eppendorf para eliminar cualquier contaminación de perlas Dynal restantes. Las células se transfirieron a un Eppendorf limpio y el procedimiento se repitió una segunda vez. Las células se contaron y se volvieron a suspender en medio a 5x10<sup>6</sup> células/ml. En algunos casos, se purificaron linfocitos T CD4<sup>+</sup> de memoria/efectores de un total de linfocitos T CD4<sup>+</sup> utilizando el kit T cell memory negative selection de Miltenyi (Miltenyi Biotech Ltd) siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante.

15 Preparación de CDs derivadas de monocitos: CMSPs se volvieron a suspender en 10<sup>8</sup> células/ml en tampón Miltenyi a 4 °C. Se añadieron 100 µl de perlas CD14 MACS por cada 10<sup>8</sup> células y la mezcla se incubó en hielo durante 15 minutos. Se añadió 10 X al volumen de tampón Miltenyi y las células se sedimentaron por centrifugación. Las células se volvieron a suspender en 1 ml de tampón Miltenyi/10<sup>8</sup> células. Se analizaron 3 ml de tampón Miltenyi a través de una columna LS en lugar del imán, tras lo cual se añadió la suspensión celular a la columna. Una vez que las células habían entrado en la columna, se añadieron 3 ml de tampón Miltenyi y esta etapa se repitió dos veces más. Las columnas LS se sacaron del imán y se colocaron sobre tubos de 15 ml. Se añadieron 5 ml de tampón Miltenyi y las células se eluyeron utilizando el cuerpo de jeringa como un émbolo. Las células se sedimentaron por centrifugación y se volvieron a suspender en 1 ml de medio para un recuento de células. Los monocitos purificados se volvieron a suspender en 10<sup>6</sup> células/ml en RPMI 1640/L-Glu/P/S/10% SFB CI + 30 ng/ml de GMCSF y 20 ng/ml de IL-4 (R&D Systems n.º 204-IL).

25 Activación de CD: Después de 7 días de cultivo en GMCSF y IL-4, las células se recogieron en un tubo Falcon de 50 ml, se centrifugaron a 1.600 rpm durante 5 minutos, se contaron y se volvieron a suspender en 1 x 10<sup>6</sup> células/ml. Se añadió curdlano (WAKO número cat. 034-09901) en 100 µg/ml, o se añadió LPS a 100 ng/ml y las CDs se cultivaron durante 4 horas a 37 °C/CO<sub>2</sub> al 5 %. Las células se centrifugaron a 1.600 rpm durante 5 minutos y se descartó el sobrenadante. Las células se lavaron una vez con medio IMDM (IMDM (Gibco) suero humano autólogo inactivado por calor al 10 %/ penicilina/ estreptomycin/L-glutamina) y luego se volvieron a suspender en medio IMDM.

30 Transfección y activación de linfocitos T: Después del cultivo durante la noche a 37 °C/CO<sub>2</sub> al 5 %, los linfocitos T primarios se transfectaron con ARNips por nucleofección (kit T cell nucleofector Amaxa - DHPA-1002). Los reactivos de ARNip se pre-sembraron en placas (2 µl de 20 µM de solución) en una placa de fondo en u de 96 pocillos de manera tal que se alcanzaría una concentración final de 2 µM. Los linfocitos T se centrifugaron a 1.500 rpm durante 10 minutos y todos los medios de crecimiento se eliminaron. Se añadió tampón Nucleofector (más suplemento, fabricado de acuerdo con el protocolo del fabricante) a las células de manera que cada 20 µl contenían 100.000 células. Se añadieron las células (20 µl) al reactivo de ARNip en las placas de fondo en u. 20 µl de alícuotas de células/reactivo se añadieron cuidadosamente a cada pocillo de placas nucleofector de 96 pocillos. Las placas se colocaron en el nucleofector Amaxa y se aplicó el programa EH-100 a todos los pocillos. Después de la retirada de la placa de Amaxa, se añadieron 100 µl de medio pre-calentado (IMDM/suero autólogo inactivado por calor al 10 %/penicilina/estreptomycin/L-glutamina), más 1 ng/ml de IL-7 a cada pocillo. Las células se retiraron inmediatamente de los pocillos de la placa Amaxa (100 µl por pocillo recuperado) y se añadieron a una segunda placa de fondo en u que contiene 100 µl adicionales de medio pre-calentado. Las células se cultivaron durante otras 48 horas a 37 °C para permitir que se proceda a la disminución. Posteriormente, se eliminaron 160 µl de medio y se añadieron 80 µl de medio reciente. Para la activación de linfocitos T por CDs, 100 µl de la suspensión celular se transfirieron a continuación a una placa de fondo plano de 96 pocillos junto con 100 µl de CDs activadas por LPS o curdlano por pocillo. Los sobrenadantes de cultivo se recogieron 3-4 días más tarde para el análisis de citoquinas. Para la activación de linfocitos T por los anticuerpos, las células se estimularon con 0,1 mg/ml de α-CD3 y 3 mg/ml de α-CD28.

50 Transfección y activación de células HuT78: 10<sup>6</sup> células se suspendieron en 100 µl de tampón de nucleofección (Lonza, n.º cat VCA-1001) y 20 µl de ARNip (20 µM) se añadieron a la suspensión celular. Además de ARNips que se dirigen a SP140, ARNip versus IL-13 (Ambion, n.º de cat AM16704) se utilizó en estos estudios. La suspensión que contiene células y ARNips se transfirió a cubetas Amaxa, colocadas en un nucleofector Amaxa y se aplicó voltaje (programa V-001). 500 µl de medio (RPMI 1640, SFB al 10 %, Glutamax 2 mM, penicilina/estreptomycin) se añadieron, después de lo cual la suspensión de células se transfirió a una placa de 24 pocillos y se cubrió con otros 500 µl de medio. Las células se incubaron a 37 °C durante 48 horas, se recogieron, se sedimentaron y se volvieron a suspender en 1 ml de medio. Se añadieron 12,5 µl de humano T-activator Dynabeads (Invitrogen, n.º cat. 11131D\_ (50254642)) a cada pocillo de muestra. Las células se incubaron durante 24 horas, después de lo cual se retiraron los sobrenadantes para el análisis de citoquinas.

Análisis de citoquinas: Las citoquinas se ensayaron utilizando placas de MSD y se leyeron en un lector de placas MSD Sector 6000.

60 Inmunohistoquímica: Un anticuerpo anti-SP140 producido en conejo (HPA006162; Sigma Prestige Antibody) se utilizó para visualizar la proteína SP140 en una micromatriz de tejido humano normal Cambridge Bioscience

69571061, una matriz autoinmunitaria humana Cambridge Bioscience 4.013.301, una matriz de colitis humana Cambridge Bioscience 4.013.101 y en muestras sinoviales de artritis reumatoide internas. El anticuerpo anti-SP140 se detectó con un anticuerpo secundario polimérico Leica. Las secciones se desparafinaron utilizando tampones patentados ER1, bajo pH 6 y ER2, alto pH 8 durante 20 minutos a ~98 °C. Los sitios de unión a anticuerpo se visualizaron con peroxidasa y DAB. La tinción se realizó en un instrumento de inmunotinción Leica Bondmax, utilizando el protocolo IHC F.

#### Membrana de Western:

Lisados de células enteras se prepararon mediante la resuspensión de los sedimentos celulares en una lisis y la reducción de tampón que contiene 100 µl de DTT 1,5 M, 275 µl de H<sub>2</sub>O y 375 µl de tampón de muestra LDS NuPAGE® (Invitrogen). Las muestras de SDS-PAGE se calentaron durante 5 min a 80-95 °C (termobloque) y después se sometieron a ultrasonidos durante 1-5 segundos. Las muestras se cargaron en un gel de Bis-Tris al 4-12 % IVuPAGE® (Invitrogen) y se analizan durante una hora a 100 mA/gel. Las proteínas se transfirieron a membranas mediante transferencia semi-seca utilizando mini kits Gel Transfer Stacks Nitrocellulose iBlot™ (Invitrogen). Para la detección, la membrana de nitrocelulosa se incubó con 10 ml de TFS que contenía leche descremada al 3 %, pH 7,4 (Sigma) durante 1-3 horas a temperatura ambiente con agitación para bloquear los sitios no específicos. Se añadió el anticuerpo primario (anticuerpo anti-SP140 Prestige, HPA006162, Sigma, utilizado a 1:500) y la membrana se incubó durante la noche a 4 °C con agitación. La membrana se lavó en mQ TFS-Tween 20 al 0,1 % para eliminar el exceso de anticuerpo primario. Se añadió el anticuerpo secundario (anti-conejo IgG-PR, Sigma) y la membrana se incubó durante una hora a TA con agitación y se lavó en TFS-Tween 20 al 0,1 % como se ha descrito anteriormente. La imagen de la membrana se desarrolló utilizando el kit West Femto Maximun Sensitivity Substrate SuperSignal® (Thermo Scientific) o solución Femto (Pierce, Northumberland, R.U.) y se capturó utilizando el generador de imágenes de quimioluminiscencia LAS-3000 (Fujifilm o Carestream). Los anticuerpos se eliminaron y la membrana se volvió a sondar con un anticuerpo anti-histona H3 (Abcam). La histona H3 sirvió como control de carga.

#### Estudios de CHIP en CDs:

CDs se sembraron en placas a una concentración de 1x10<sup>6</sup>/ml en 4 ml en placas de 6 pocillos y se incubaron durante 0, 2, 4, 6 o 24 horas con 100 ng/ml de LPS. Se incubaron las células en la misma concentración sin estimulación como control. Después de la incubación, las células de un pocillo tratadas con LPS y un pocillo sin estimular se contaron como representativas de la placa. 5x10<sup>6</sup> células se recolectaron para cada condición.

Se añadieron 400 µl de solución fija a cada pocillo, se mezclaron y se incubaron las células a 37 °C durante 10 minutos. Se añadió glicina 125 mM (200 µl/pocillo) para detener la fijación y las células se incubaron a TA durante 5 minutos. Las células se recolectaron y se lavaron dos veces con TFS enfriado en hielo por centrifugación a 1.500 rpm a 4 °C durante 5 minutos después de cada lavado. El sedimento celular se congeló rápidamente en nitrógeno líquido y se almacenó a -80 °C durante cuatro días.

Los sedimentos celulares se descongelaron en hielo y se volvieron a suspender en 100 µl de tampón de lisis/IP, se incubaron en hielo durante 10 minutos con mezclado cada pocos minutos. Los núcleos se sometieron a ultrasonidos utilizando el Bioruptor ultrasonificador durante 30 minutos, 30 segundos encendido y 30 segundos apagado. Los restos celulares se eliminaron por centrifugación (5 minutos a 1.500 rpm) y la cromatina se transfirió a un nuevo tubo.

2,4 ml de perlas de proteína A/ADN de esperma de salmón se lavaron cinco veces con TFS (+PIC) y dos veces con tampón de dilución (+PIC), centrifugándose a 2.000 rpm durante 1 minuto entre lavados. 25 µl de cromatina se reservaron como entrada y se almacenaron a -20 °C mientras que el resto se alicuotó en tubos Eppendorf en 100 µl de alícuotas y se diluyó 1:10 con tampón de dilución. 40 µl de perlas de proteína A/ADN de esperma de salmón se añadieron a cada Eppendorf con el fin de pre-limpiar la cromatina y la cromatina se incubó con rotación a 4 °C durante 3 horas. Después de la incubación, la cromatina se centrifugó a 2.000 rpm 1 minuto y se llevó a un tubo reciente. Se añadieron a las muestras 5 µg de anticuerpo según se indica:

| Anticuerpo | Compañía             | Lote y conc.          |
|------------|----------------------|-----------------------|
| Entrada    | -                    | -                     |
| Conejo IgG | Abcam ab37415        | 681902 5mg/ml         |
| α-SP140    | Abnova H00011626-MO7 | 08221-359 WULZ 1mg/ml |

La cromatina se incubó con el anticuerpo con rotación a 4 °C durante la noche.

Se añadieron 80 µl de perlas de proteína A pre-lavada/ADN de esperma de salmón para cada muestra y la cromatina se incubó en un mezclador rotatorio durante 5 horas a 4 °C. Las muestras se centrifugaron a 2.000 rpm durante 1 minuto, se eliminó el sobrenadante y las perlas se lavaron en los siguientes tampones de lavado durante 5 minutos con rotación a TA: tampón con bajo contenido en sal x1, tampón con alto contenido en sal x1, tampón LiCl x1, TE x2.



Después del lavado final, las perlas se volvieron a suspender en 100 µl de tampón de elución y se incubaron a TA con rotación durante 10 minutos. La cromatina eluida se llevó a un tubo reciente y las perlas se incubaron con 100 µl más de tampón de elución. Los dos eluatos se combinaron y se incubaron con 8 µl de NaCl 5 M a 65 °C durante la noche. Las muestras se incubaron con 0,2 µl de 20 mg/ml de ARNasa A durante 1 hora a 37 °C y luego con 4 µl de EDTA 0,5 M, 8 µl de Tris-HCl 1 M pH 6,5 y 0,4 µl de 20 mg/ml de proteinasa K durante 1 hora a 45 °C. El ADN se purificó utilizando el Kit Zymo CHIP DNA Clean & Concentrator de Taqman. Siguiendo las instrucciones del fabricante, se añadió a cada muestra 1 ml de tampón de unión de ADN, se mezcló y las muestras se cargaron en las columnas. Para las muestras inmunoprecipitadas con H3, el 50 % de la muestra se cargó en las columnas. Las columnas se lavaron dos veces con 200 µl de tampón de lavado de ADN y el ADN se eluyó con 100 µl de tampón de elución.

ADN se amplificó utilizando SYBR Green y los cebadores contra SIT de TNFα y 5' β-globina humana (cebadores de Invitrogen).

TNFαF (SIT\_TNFαF) GGGACATATAAAGGCAGTTGTTGG  
 TNFαR (SIT\_TNFαR) TCCCTCTTAGCTGGTCCTCTGC  
 β-globina F humana (5C\_HBBF) AACAGCCAAGTCAAATCTGC  
 β-globina R humana (5C\_HBBR) GGCACACGTGTATCCCTGAG

PCRs se realizaron en un volumen de 10 µl con 4 µl de ADN, 5 µl de mezcla SYBR Green y 0,1 µl de cebador directo 25 mM y 0,1µl de cebador inverso 25 mM. Las PCR se realizaron por triplicado en Applied Biosystems 9700HT, utilizando el siguiente programa: 50 °C, 2 minutos, 95 °C, 10 minutos y 40 ciclos de 95 °C, 15 segundos, 60 °C, 1 minuto. 1-1x10<sup>5</sup> copias de patrones de ADN genómico humano se utilizaron para obtener la curva convencional.

La cantidad de ADN obtenido después de la amplificación se determinó por el software de Applied Biosystems SDS a partir de la curva convencional. La cantidad se promedió a partir de los triplicados y se expresó como el porcentaje de entrada. N.B. Cualquier resultado discrepante obvio que ocurre debido a errores de pipeteo, particularmente notable cuando hay niveles bajos de plantilla, no se incluye en los cálculos.

Reactivos y soluciones  
 Reactivo detalles de la orden de fuente

Materiales:

Tampón Miltenyi: TFS sin Ca y Mg, ASB al 0,5 %, EDTA 5 mM  
 Perlas CD14 Miltenyi (MACS): microperlas CD14, 2 ml humano, contiene ASB al 0,1 %, azida al 0,05 % (en temperatura fría).  
 ASB: Albúmina, polvo V de fracción bovina (Sigma, A-1933)  
 EDTA: ácido etilendiaminotetraacético (Sigma, E-7889). Conc. madre 0,5 M  
 ARNips: Todos los ARNips se obtuvieron en Qiagen.  
 Tampón de muestra NuPage 4X SDS (Invitrogen, NP0007)  
 DTT 1,4 ditiotreitól (Roche, 10708984001)  
 Antioxidante NuPage (Invitrogen, NP0005)  
 Tampón de migración NuPage MES SDS (Invitrogen, NP0002)  
 Gel Bis Tris al 4-12 % NuPage 1,5 mm 15 pocillos (Invitrogen, NP0336BOX)  
 Gel transfer stacks nitrocellulose iBlot (Invitrogen, IB3010-01)  
 Patrón preteñido SeeBlue Plan2 (Invitrogen, LC5925)  
 TFS + 3 % leche descremada (Sigma, P2194)  
 Kit de tinción con azul coloidal Novex (Invitrogen, LC6025)  
 Kit Super signal West femto (Thermo Scientific, 34096)  
 Tampón de elución de IgG (Thermo Scientific, 21004)  
 Solución de secado de gel seco (Invitrogen, LC4025)  
 DMEM (Invitrogen, 32430027)  
 Perlas de proteína A/ADN monocatenario (Fisher Scientific, MZ16157)  
 Cóctel inhibidor de la proteasa (Roche Diagnostics, 11836170001)  
 Sol. De formaldehído (Sigma, F1635)  
 EDTA (Sigma, E-7889)  
 NaCl (Sigma, S5886)  
 Tris-HCl pH 8 (Sigma, T3038)  
 Triton X-100 (Sigma, x-100)  
 NP-40 (Fluka, 74385)  
 SDS (Sigma, L4509)  
 Cloruro de litio (Sigma, L7026)  
 Desoxicolato de sodio (Sigma, D6750)  
 Proteinasa K (20 mg/ml) (Invitrogen, AM2548)  
 Kit para limpieza de ADN Zymo CHIP (Cambridge Bioscience, D5201)  
 Placas de 384 pocillos ópticas (Invitrogen, 4326270)

Película adhesiva óptica (Invitrogen, 4311971)  
 Mezcla maestra de Sybr Green (Invitrogen, 4364344)  
 Proteinasa K (20 mg/ml) (Invitrogen, AM2548)  
 Kit para limpieza de ADN Zymo ChIP (Cambridge Bioscience, D5201)  
 5 Placas de 384 pocillos ópticas (Invitrogen, 4326270)  
 Solución fija: formaldehído al 10 %, NaCl 0,1 M, EDTA 1 mM, EGTA 0,5 mM, Tris-HCl 10 mM pH 8  
 Tampón de lisis: 1 % de SDS, EDTA 10 mM, Tris-HCl 50 mM pH 8  
 Tampón de dilución: 0,01 % de SDS, 1,1 % Triton X-100, EDTA 1,2 mM, Tris-HCl 16,7 mM pH 8, NaCl 167 mM  
 Tampón bajo en sal: 0,1 % de SDS, 1 % de Triton X-100, EDTA 2 mM, NaCl 150 mM, Tris-HCl 20 mM pH 8  
 10 Tampón rico en sal: 0,1 % de SDS, 1 % de Triton X-100, EDTA 2 mM, NaCl 500 mM, Tris-HCl 20 mM pH 8  
 Tampón de lavado de cloruro de litio: LiCl 0,25 M, NP40 al 1 %, desoxicolato de Na al 1 %, EDTA 1 mM, Tris-HCl 10 mM pH 8  
 TE: Tris-HCl 10 mM pH8, EDTA 1 mM  
 Tampón de elución: 1 % de SDS, NaHCO<sub>3</sub> 100 mM

15 **Referencias**

- (1) Struhl K. *Histone acetylation and transcriptional regulatory mechanisms*. *Genes Dev.* 1 de marzo de 1998; 12(5):599-606.
- (2) Jeanmougin F, Wurtz JM, Le Douarin B, Chambon P, Losson R. *The bromodomain revisited*. *Trends Biochem Sci.* Mayo de 1997; 22(5):151-3.
- 20 (3) Tamkun JW, Deuring R, Scott MP, Kissinger M, Pattatucci AM, Kaufman TC, Kennison JA. *Brahma: a regulator of Drosophila homeotic genes structurally related to the yeast transcriptional activator SNF2/SWI2*. *Cell.* 7 de febrero de 1992; 68(3):561-72.
- (4) Wolters NM, MacKeigan JP. *From sequence to function: using RNAi to elucidate mechanisms of human disease*. *Cell Death Differ.* Mayo de 2008; 15(5):809-19.
- 25 (5) Miossec P, Korn T, Kuchroo VK. *Interleukin-17 and type 17 helper T cells*. *N Engl J Med.* 27 de agosto de 2009; 361(9):888-98.
- (6) Dardalhon V, Korn T, Kuchroo VK, Anderson AC. *Role of Th1 and Th17 cells in organ-specific autoimmunity*. *J Autoimmun.* Noviembre de 2008; 31(3):252-6.
- 30 (7) Kleinschek MA, Boniface K, Sadekova S, Grein J, Murphy EE, Turner SP, Raskin L, Desai B, Faubion WA, de Waal Malefyt R, Pierce RH, McClanahan T, Kastelein RA. *Circulating and gut-resident human Th17 cells express CD161 and promote intestinal inflammation*. *J Exp Med.* 16 de marzo de 2009; 206(3):525-34.

**REIVINDICACIONES**

1. Uso de un inhibidor de la proteína SP140 que contiene bromodominios, en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de enfermedades o afecciones autoinmunitarias e inflamatorias o cáncer, en el que el inhibidor se selecciona entre un ARNip, una ribozima o un oligonucleótido antisentido complementario al ARNm de SP140, o un anticuerpo que se une a la proteína SP140.  
5
2. Una formulación farmacéutica que comprende un inhibidor de la proteína SP140 que contiene bromodominios, en el que el inhibidor se selecciona entre un ARNip, una ribozima o un oligonucleótido antisentido complementario al ARNm de SP140, o un anticuerpo que se une a la proteína SP140, junto con al menos un portador farmacéuticamente aceptable para su uso en el tratamiento de enfermedades o afecciones autoinmunitarias e inflamatorias o cáncer.  
10

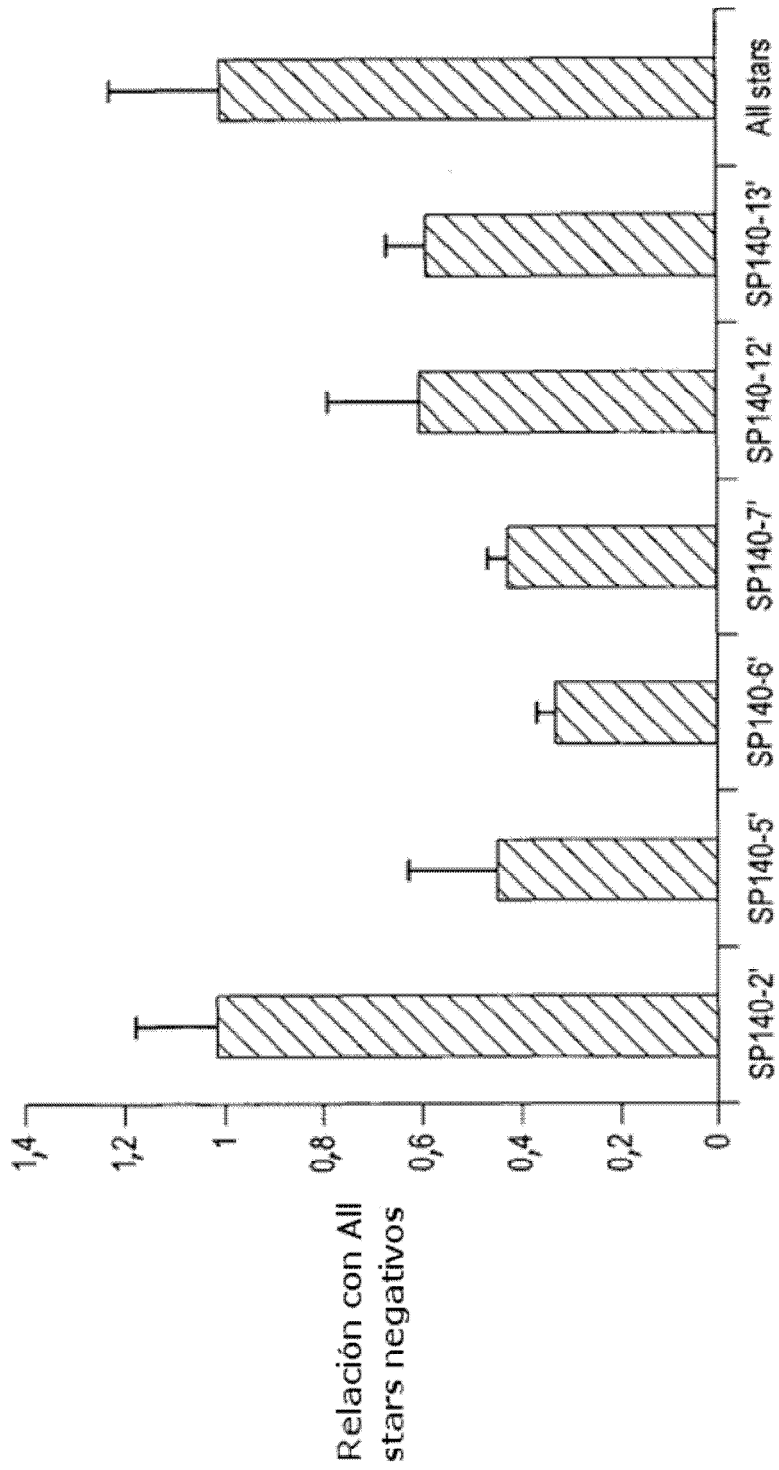


Fig. 1

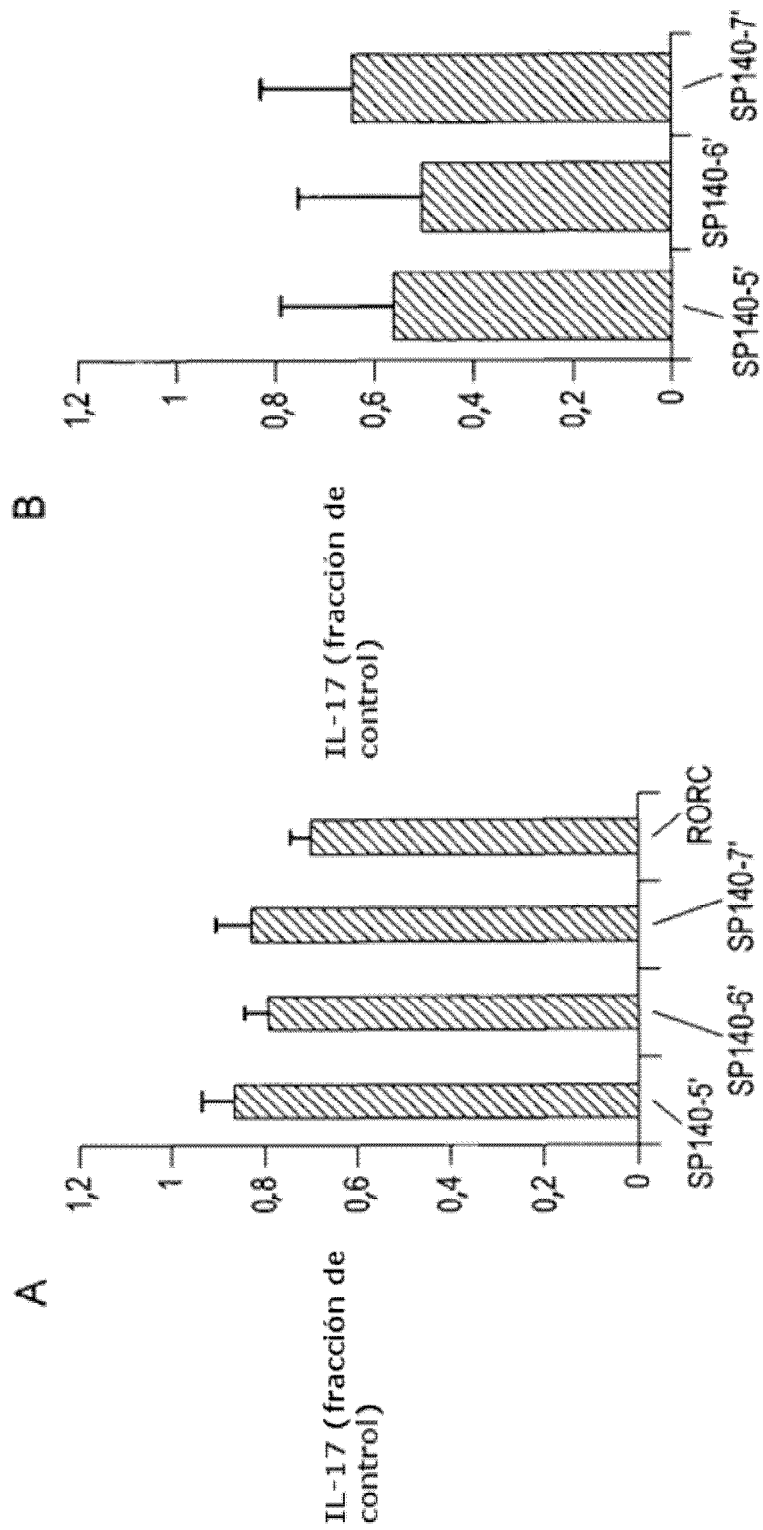


Fig. 2

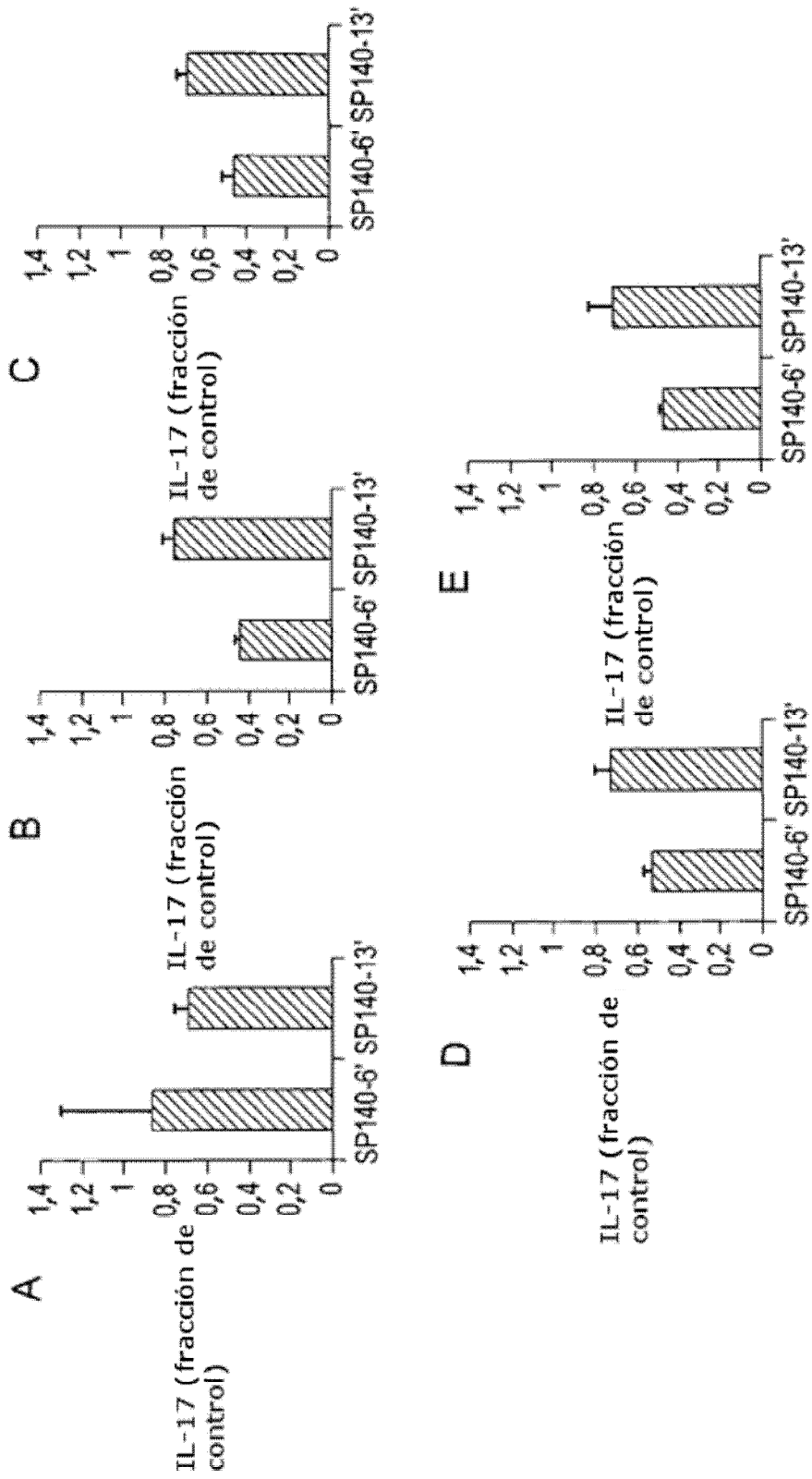


Fig. 3

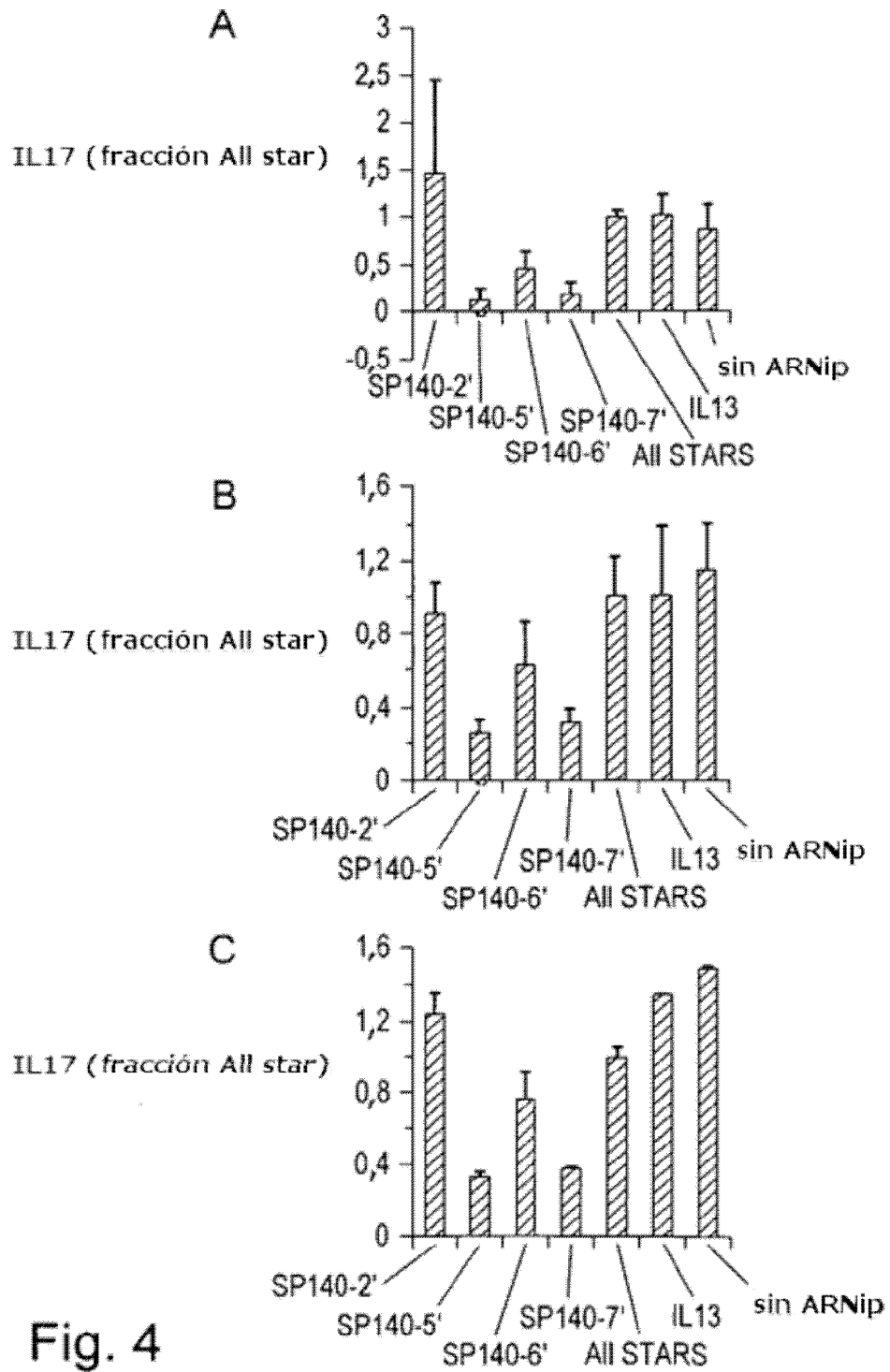


Fig. 4

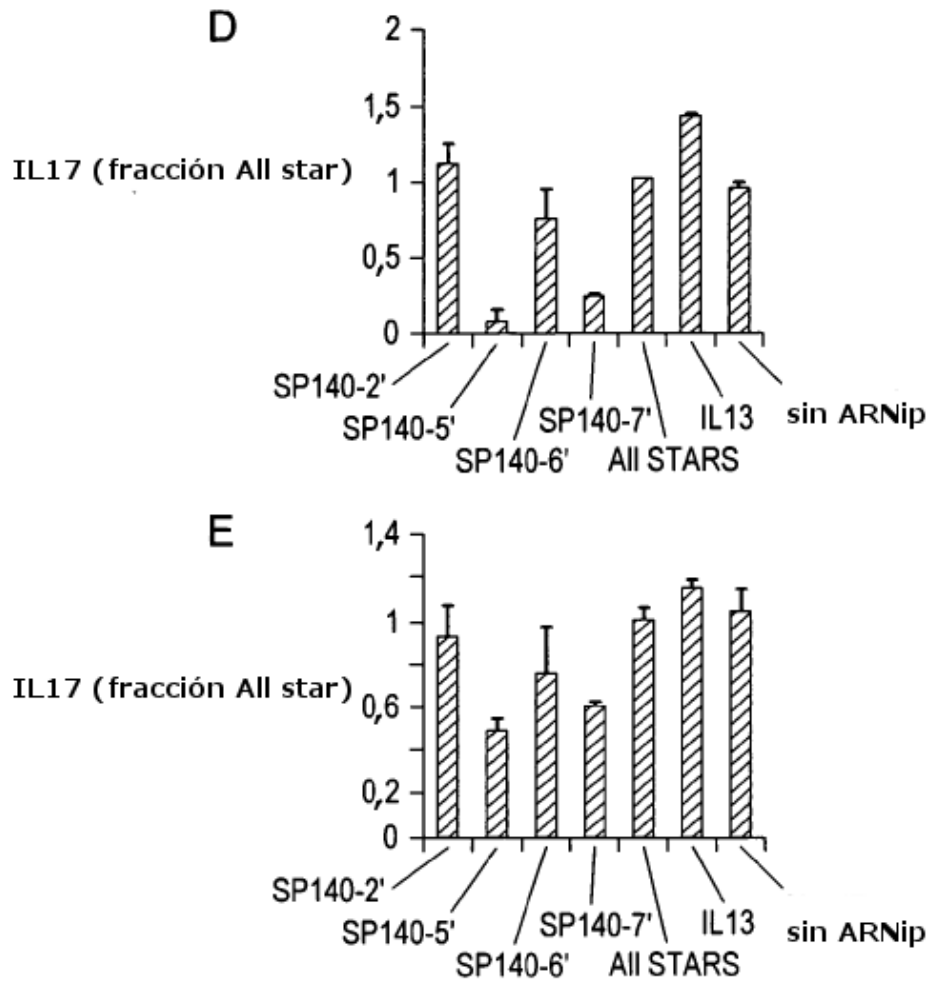


Fig. 4 (Cont.)



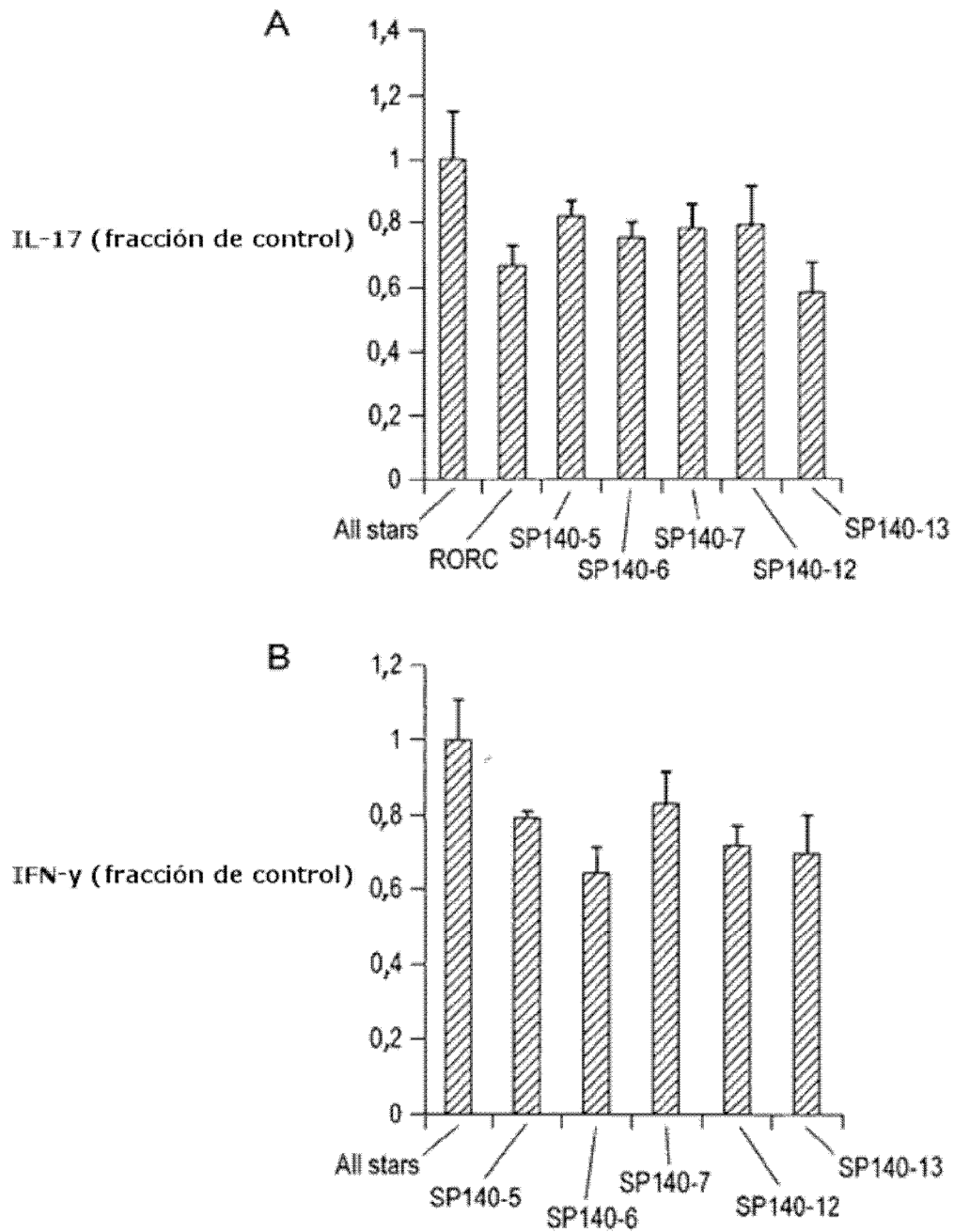


Fig. 5

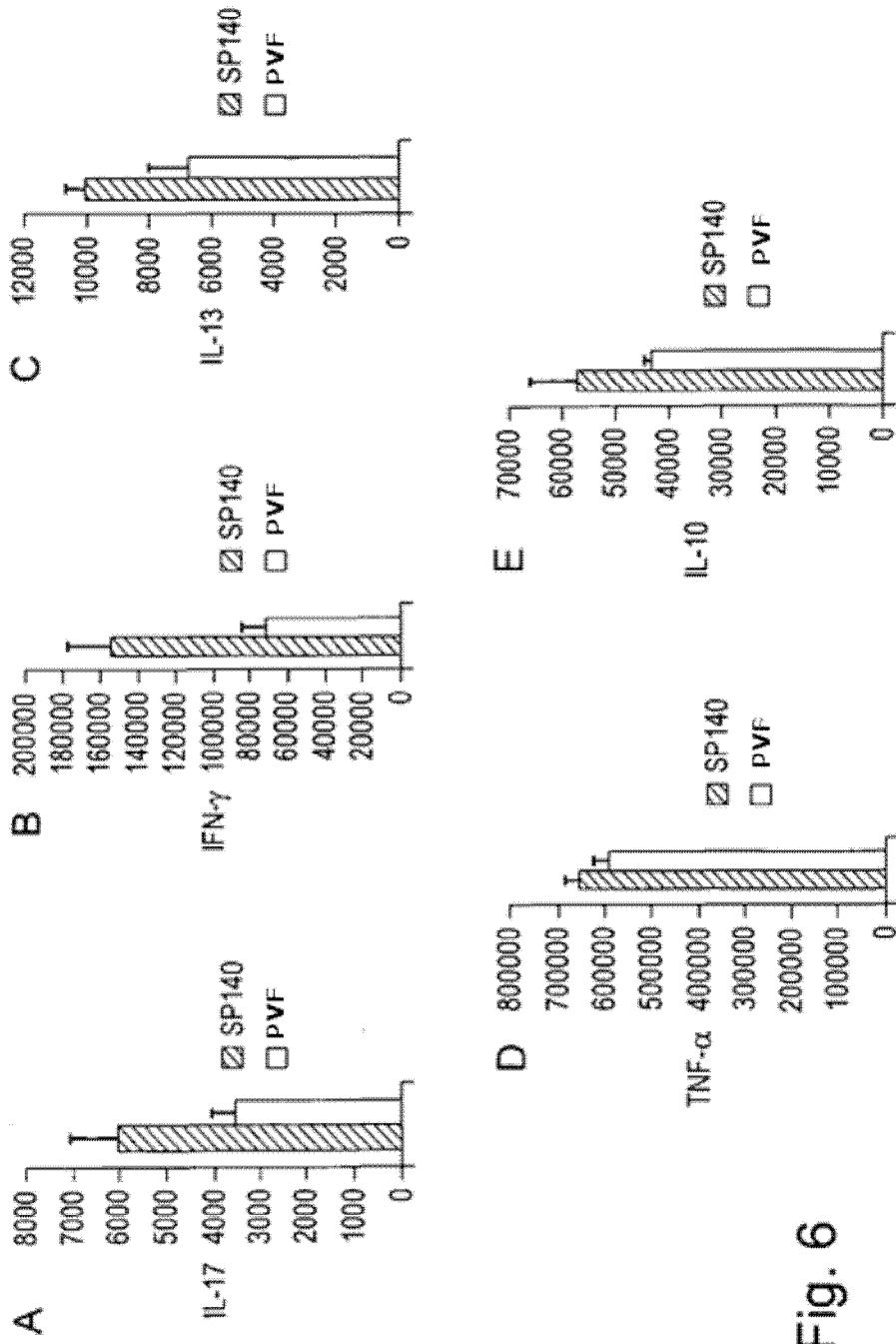


Fig. 6

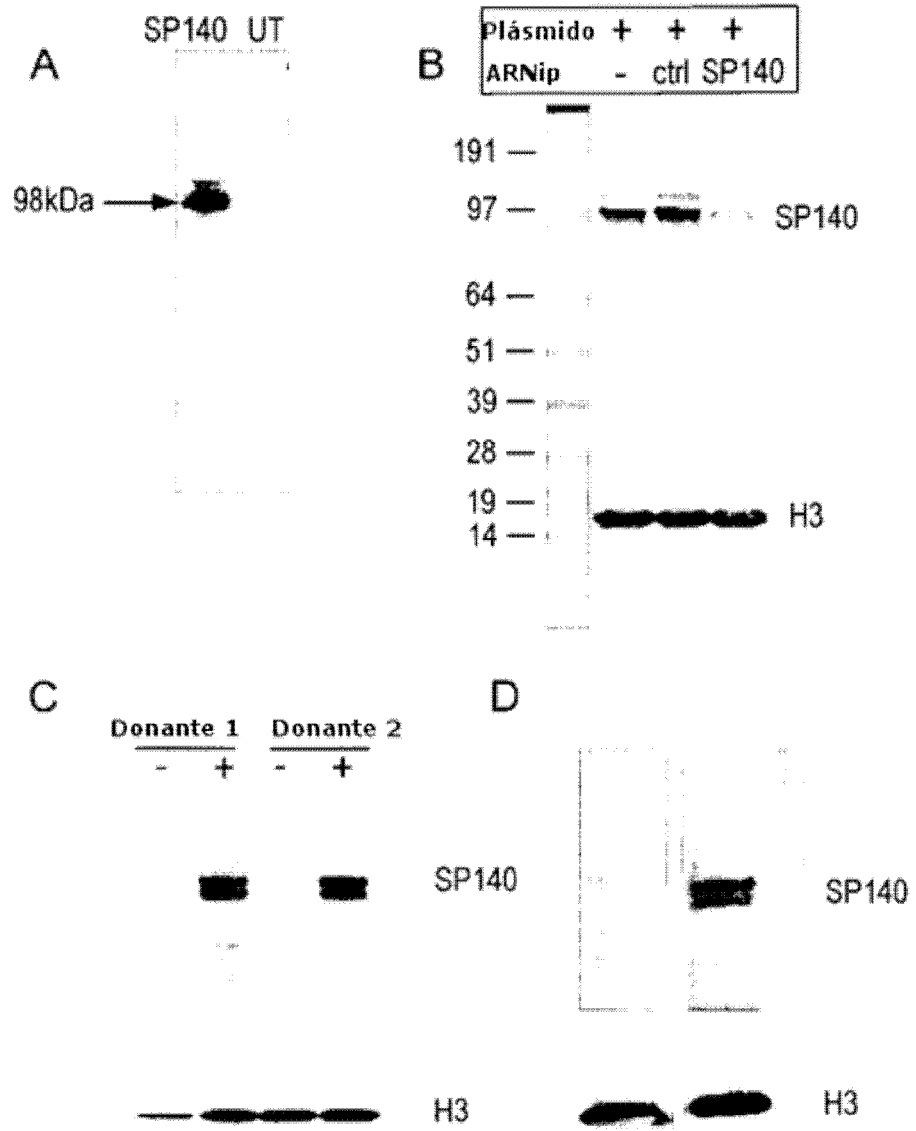


Fig. 7

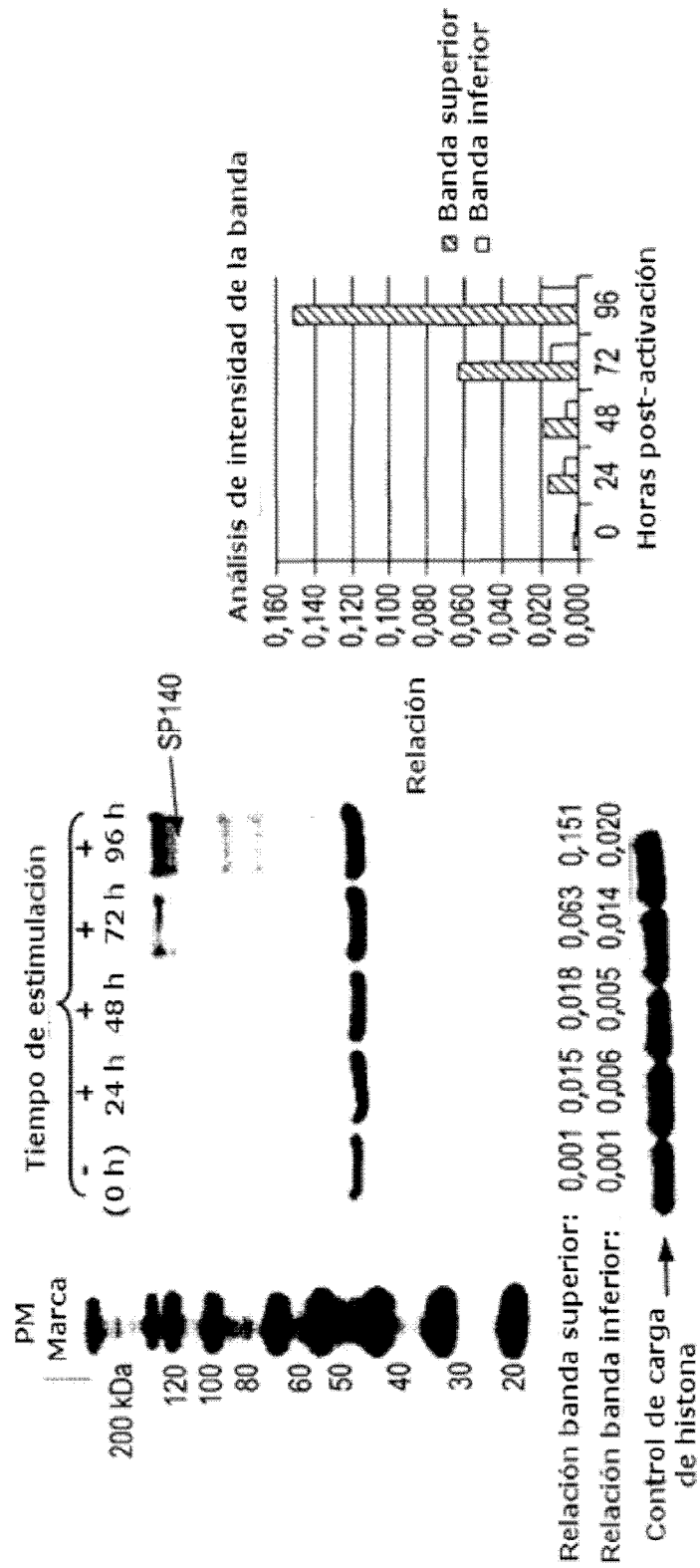


Fig. 8

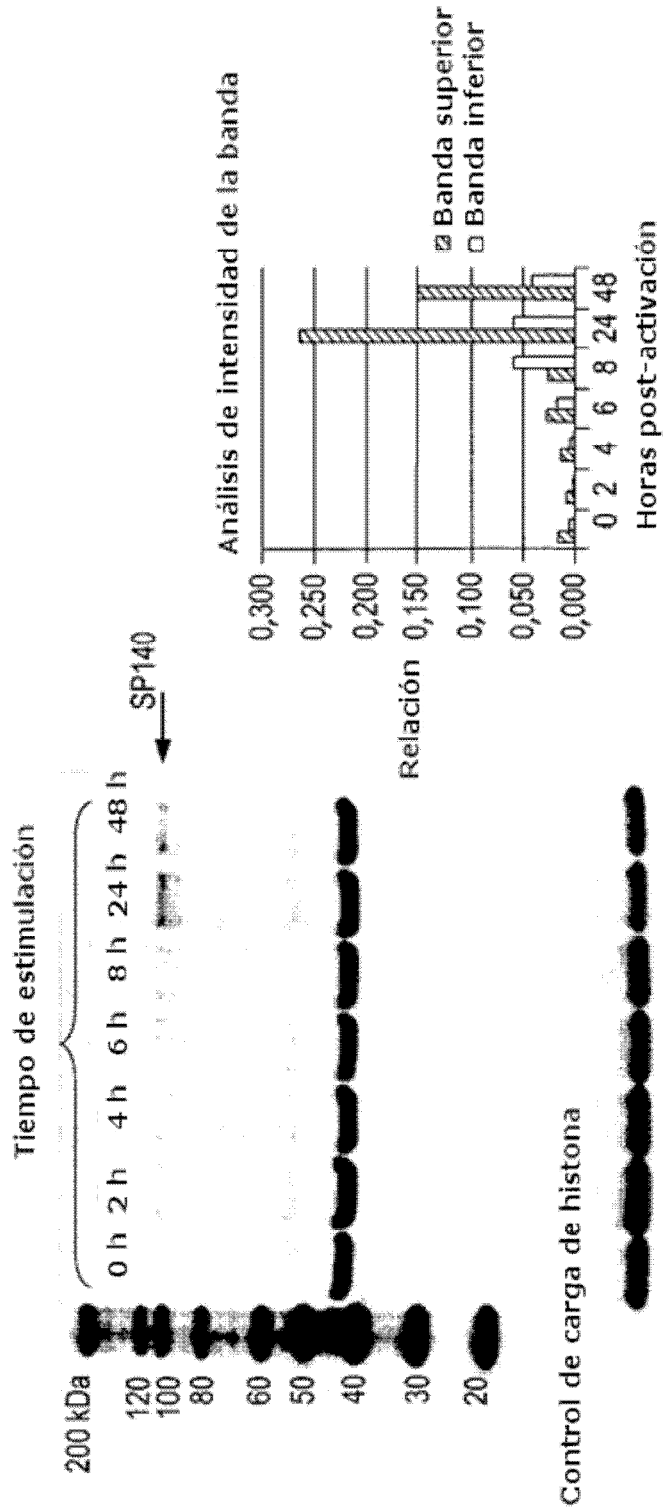


Fig. 9

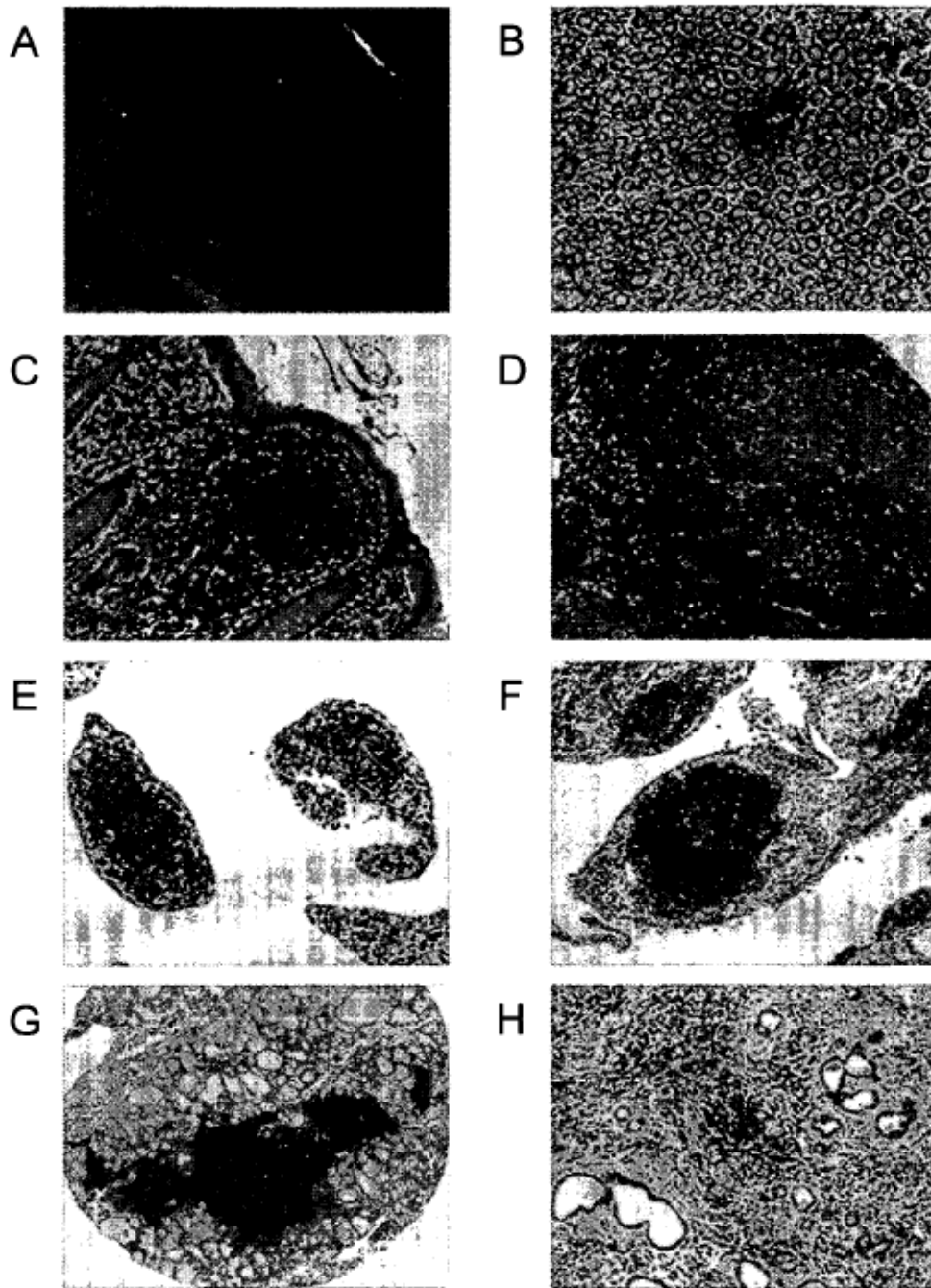


Fig. 10

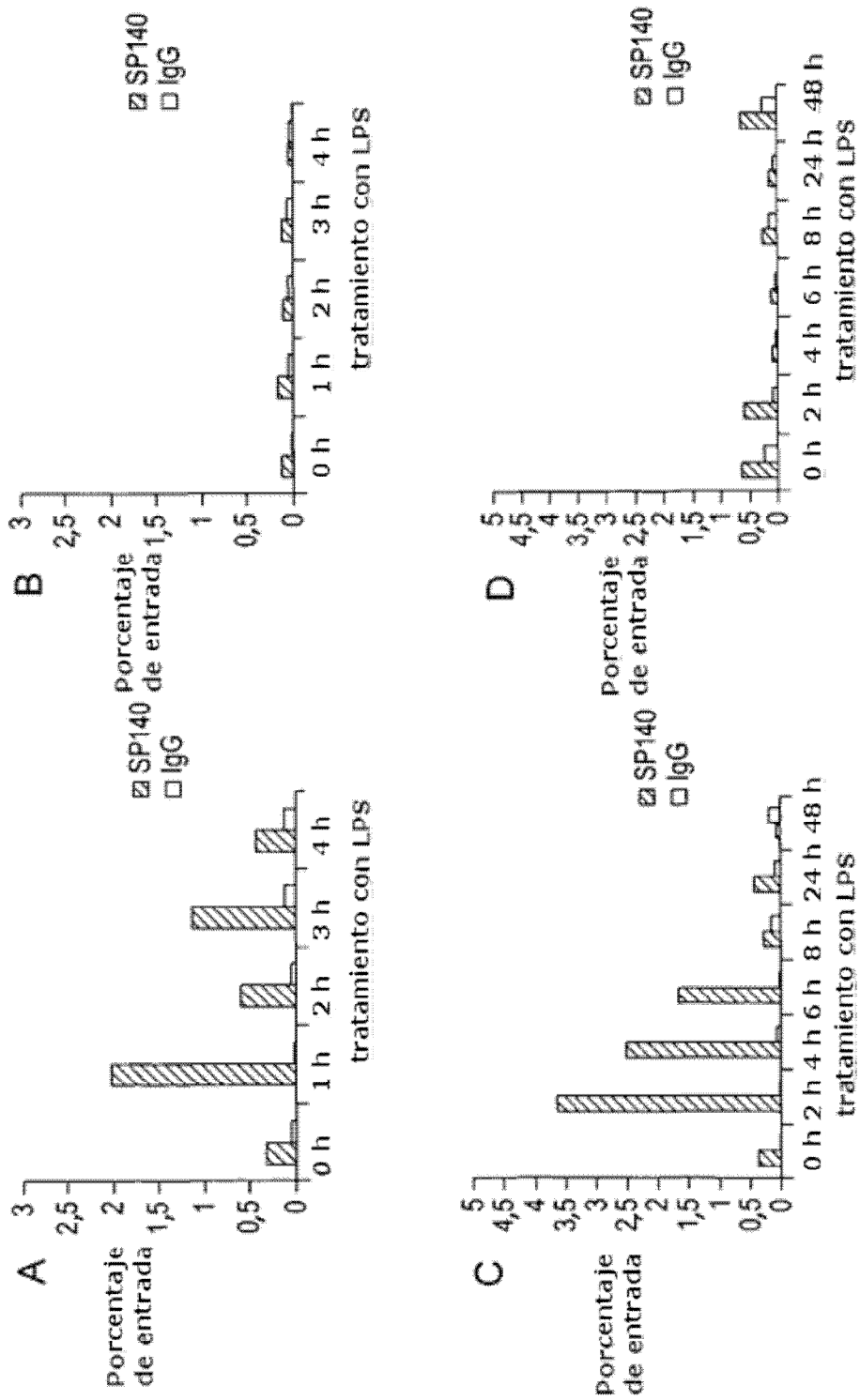


Fig. 11