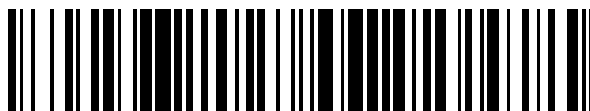


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 641 815**

51 Int. Cl.:

A61K 39/395	(2006.01)	C12N 5/00	(2006.01)
A61K 45/00	(2006.01)	C12N 15/00	(2006.01)
A61P 1/00	(2006.01)		
A61P 9/00	(2006.01)		
A61P 9/10	(2006.01)		
A61P 11/00	(2006.01)		
A61P 11/06	(2006.01)		
A61P 17/06	(2006.01)		
A61P 29/00	(2006.01)		
C07K 16/18	(2006.01)		

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **31.10.2005 PCT/JP2005/020009**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **04.05.2006 WO06046739**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.10.2005 E 05805446 (1)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.08.2017 EP 1806145**

54 Título: **Tratamiento para enfermedades inflamatorias**

30 Prioridad:

29.10.2004 JP 2004316708
15.07.2005 JP 2005206870

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

14.11.2017

73 Titular/es:

EISAI R&D MANAGEMENT CO., LTD. (100.0%)
6-10, KOISHIKAWA 4-CHOME, BUNKYO-KU
TOKYO 112-8088, JP

72 Inventor/es:

KUBOI, YOSHIKAZU;
IMAI, TOSHIO;
NISHIMURA, MIYUKI y
MIZUNO, KEIKO

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 641 815 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

Tratamiento para enfermedades inflamatorias

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a un agente terapéutico para su uso en el tratamiento de una enfermedad inflamatoria del intestino.

10 **Antecedentes técnicos**

Las quimiocinas son factores principales de migración celular en los organismos vivos y regulan la infiltración de linfocitos en tejidos mediante el aumento de la motilidad celular y la activación de moléculas de adhesión celular. Las quimiocinas se clasifican en cuatro subfamilias de CC, CXC, C y CXXXC basándose en los tipos de secuencia de los dos primeros restos de cisteína. Los miembros de las subfamilias de quimiocinas CC, CXC y C son proteínas secretoras que consisten en aproximadamente 70 aminoácidos, y aunque no tienen actividad como moléculas de adhesión por sí mismas, pueden inducir la adhesión celular. Una quimiocina secretada se une a un receptor de siete dominios transmembrana sobre la superficie de una célula diana y activa la integrina mediante la proteína G trimérica para inducir la adhesión o la migración celular.

20 Recientemente, se identificó un novedoso mecanismo simple de infiltración de linfocitos además del mecanismo conocido de migración celular. Este mecanismo está mediado por la fractalcina expresada en células endoteliales activadas y un receptor de siete dominios transmembrana, CX3CR1, expresado en monocitos, células NK y una parte de los linfocitos T en el flujo sanguíneo. La fractalcina es el único miembro de la subfamilia de quimiocinas CXXXC y tiene características distintas en la estructura y en las funciones de la misma que no se encuentran en otras quimiocinas. La fractalcina se expresa sobre una superficie celular como una proteína unida a membrana que tiene un dominio de quimiocina, un dominio de mucina, un dominio transmembrana y un dominio intracitoplasmático. La fractalcina unida a membrana por sí misma puede mediar la fuerte adhesión por unión a CX3CR1 incluso en presencia de un caudal de sangre fisiológico sin mediación de selectina o de integrina. Es decir, en una reacción de 25 una fase, el sistema de infiltración celular de fractalcina-CX3CR1 media una función similar a la del mecanismo de infiltración celular de múltiples fases mediante selectina o integrina. Además, la fractalcina secretada de fractalcina unida a membrana por desprendimiento se une a CX3CR1 e induce la activación de integrina y la migración celular como las quimiocinas conocidas.

35 Además, la expresión de fractalcina se induce cuando se tratan células del endotelio vascular con citocinas inflamatorias tales como TNF e IL-1. Por otro lado, CX3CR1 se expresa en monocitos, en la mayoría de las células NK y en una parte de los linfocitos T, pero no en neutrófilos. Por lo tanto, el sistema de infiltración celular de fractalcina-CX3CR1 parece ser un mecanismo muy eficaz para movilizar ciertos tipos de inmunocitos en células endoteliales de tejidos dañados o en los tejidos. Como la fractalcina se induce en células del endotelio vascular tras la inflamación, y CX3CR1 existe en muchos tipos de leucocitos como se describe anteriormente, se sugiere fuertemente que el sistema de infiltración celular de fractalcina-CX3CR1 está implicado en el desarrollo y la progresión de afecciones patológicas en enfermedades inflamatorias. De hecho, muchos se han hecho muchos informes sobre la implicación del sistema de infiltración celular de fractalcina-CX3CR1 en enfermedades inflamatorias, y dichos informes se han hecho sobre muchas enfermedades tales como artritis reumatoide 40 (documento que no es patente 1), enfermedades inflamatorias del intestino cuyos ejemplos típicos son colitis ulcerante y enfermedad de Crohn (documento que no es patente 2), psoriasis y dermatitis (documentos que no son patente 3 y 4), asma (documento que no es patente 5), arteriosclerosis (documento que no es patente 6), síndrome de dificultad respiratoria aguda (documento que no es patente 7). Además, puede esperarse que se proporcionen efectos de la prevención de la progresión de las afecciones patológicas y mejora de las afecciones por inhibición del sistema de infiltración celular de fractalcina-CX3CR1 en enfermedades inflamatorias basándose en los análisis que usan ratones CX3CR1 knockout (arteriosclerosis [documento que no es patente 8], daño tisular causado por 45 reperusión isquémica [documento que no es patente 9]), análisis de modelos animales patológicos de enfermedades inflamatorias usando anticuerpos monoclonales anti-fractalcina (artritis inducida por colágeno de tipo II de ratón, encefalomeningitis autoinmunitaria experimental (documento de patente 1), hepatopatía inducida por concanavalina A (documento de patente 1), análisis de modelos animales patológicos usando antisuero anti-CX3CR1 (nefritis semilunar de rata WKY [documento que no es patente 10], rechazo de aloinjerto cardiaco [documento no de patente 11]) o análisis de modelos animales patológicos de enfermedades inflamatorias usando mutante inhibido con fractalcina (nefritis por lupus MRL/lpr [abril de 2004, Japan College of Rheumatology]) y, por tanto, se espera la construcción de un novedoso sistema de tratamiento para enfermedades inflamatorias. Sin embargo, los detalles del mecanismo de estas acciones para mejorar las afecciones patológicas mostradas por la 60 inhibición de la interacción de fractalcina-CX3CR1 siguen siendo desconocidos en las presentes circunstancias.

En cuanto a la clasificación de los leucocitos, linfocitos, monocitos y granulocitos, se han clasificado en pequeños grupos basándose en muchos marcadores de superficie celular hasta ahora. Recientemente, se han clasificado 65 adicionalmente en grupos más pequeños de acuerdo con la distribución de los receptores de quimiocinas, y un grupo que se consideraba un único grupo se ha descubierto que es un conjunto de varios subgrupos. Se ha

informado a partir de análisis de ratones que CX3CR1 se expresa en monocitos, en células NK y en una parte de los linfocitos T como se describe anteriormente, y se está dilucidando que hay dos grupos de monocitos entre ellos, un grupo de ellos que expresa fuertemente CX3CR1, pero que no expresa CCR2 (CX3CR1^{high}CCR2-) y un grupo de ellos que expresa débilmente CX3CR1 y expresa fuertemente CCR2 (CX3CR1^{low}CCR2+). Los análisis de ratones CX3CR1 knockout y ratones CCR2 knockout han sugerido que los monocitos CX3CR1^{low}CCR2+ se inducen en sitios de inflamación tras la inflamación y contribuyen al daño tisular produciendo citocinas inflamatorias tales como TNF α y óxido de nitrógeno sintetasa inducible (iNOS) como una potente sintetasa de óxido de nitrógeno (NO) (documentos que no son patente 12 y 13). Sin embargo, las funciones y la importancia de los monocitos CX3CR1^{high}CCR2- tras la inflamación no se ha mencionado, y en su lugar se ha dicho que son necesarios para el suministro de macrófagos tisulares cuando no hay inflamación, y es indeseable inhibir las funciones de estas células.

Además, los monocitos en sangre periférica humana también se clasifican de forma precisa basándose en los marcadores de superficie celular (tales como CD16, CD62L) y la expresión de CX3CR1. Se informa que, en uno de los grupos, los monocitos CD16+CD62L-, aumentan en sangre periférica en enfermedades inflamatorias, y la implicación de los mismos en la provisión de las afecciones patológicas está fuertemente sugerida. Como se ha informado de que los monocitos CD16+CD62L- expresan de forma elevada CX3CR1, se prevé que los monocitos CD16+CD62L- tienen propiedades sustancialmente similares a las de los monocitos CX3CR1^{high}CCR2- de ratón mencionados anteriormente (documento que no es patente 14). Además, como ya se ha informado de que los monocitos CD16+CD62L- producen fuertemente TNF α e iNOS, se considera que están fuertemente asociados con la progresión de afecciones patológicas, junto con su aumento en la sangre periférica en enfermedades inflamatorias. Sin embargo, no se ha informado específicamente a cerca de si la producción de TNF α e iNOS por estas células se inhibe por la inhibición de las funciones de CX3CR1.

iNOS, que tiene la mayor capacidad de síntesis de NO, no se expresa constantemente a diferencia de NOS endotelial (eNOS) y NOS neural (nNOS), y se induce por factores estimuladores (por ejemplo, citocinas inflamatorias y/o por polisacáridos), se produce de forma transitoria en una gran cantidad y está implicada en reacciones biofiláticas tales como eliminación de bacterias, virus, hongos o parásitos. Sin embargo, como la producción excesiva de NO da lugar a daños tisulares, se considera que la producción excesiva de iNOS en lesiones puede ser un factor principal de la progresión de afecciones patológicas. Los ejemplos de enfermedades en las que está realmente implicado el NO en el desarrollo o en la progresión de las afecciones patológicas incluyen enfermedades inflamatorias (por ejemplo, inflamación reumática, artritis reumatoide, artrosis, enfermedad de Crohn, colitis ulcerante, psoriasis, arteriosclerosis, enfermedades autoinmunitarias, inflamación aguda), enfermedades de alergia (asma, dermatitis atópica), enfermedades isquémicas (por ejemplo, diversos trastornos cardiacos y trastornos cerebrales causados por infarto o por isquemia, trastorno de reperusión después de isquémica), choque (por ejemplo, choque endotóxico, choque hemorrágico, choque cardiogénico), hipotensión patológica (por ejemplo, hipotensión en tratamientos contra el cáncer usando citocinas, hipotensión causada por septicemia, choque hemorrágico o cirrosis), rechazo de trasplantes, trastornos del sistema nervioso (enfermedad de Alzheimer, epilepsia, migraña), tumores y diabetes insulino-dependientes.

Además, basándose en los análisis de inhibición de la actividad de iNOS en modelos patológicos o en ratones iNOS knockout, se ha informado de una mejora de las afecciones patológicas en la artritis reumatoide (documento que no es patente 15), artrosis (documento que no es patente 16), enfermedades inflamatorias del intestino cuyos ejemplos típicos son colitis ulcerante y enfermedad de Crohn (documentos que no son patente 17 y 18), hepatopatía inducida por concanavalina A (documento que no es patente 19), asma (documento que no es patente 20), lesión pulmonar aguda inducida por endotoxina (documento que no es patente 21), arteriosclerosis (documento que no es patente 22), enfermedades isquémicas (documentos que no son patente 23, 24 y 25) y rechazo de trasplantes (documento que no es patente 22).

De hecho, se ha informado de la mejora de las afecciones patológicas por la inhibición de la actividad de iNOS en muchos animales modelo patológicos o en ratones iNOS knockout como se describe anteriormente. Sin embargo, no se ha lanzado ningún fármaco prometedor que inhiba la actividad de iNOS.

Además, aunque la inhibición de la producción excesiva de NO por inhibidores de actividad enzimática de iNOS mejora la hipotensión habitualmente observada en choque séptico, la destrucción tisular tal como en vasoparálisis y trastornos orgánicos, se ha sugerido un riesgo de bloqueo de las funciones fisiológicas fundamentales de NO tal como la regulación de la presión sanguínea y del flujo de sangre (documento que no es patente 26). En particular, en el análisis de las funciones del músculo cardiaco en septicemia usando ratones iNOS knockout, se ha apuntado a diferencias en la función de iNOS dependiendo del tipo de células que lo producen. La iNOS expresada en células de músculo cardiaco es esencial para la reacción útil para acortar las células de músculo cardiaco por estímulos adrenérgicos en el caso de septicemia, mientras que la iNOS que se expresa en células inflamatorias infiltradas en las cercanías de las células del músculo cardiaco está implicada en una reacción perjudicial de daño a las células del músculo cardiaco (documento que no es patente 27).

Por lo tanto, se ha deseado proporcionar un fármaco basándose en una estrategia novedosa, es decir, la inhibición de la actividad de iNOS selectiva para la especie celular, por ejemplo, no la inhibición general de la reacción enzimática de iNOS, sino inhibición de la reacción enzimática de iNOS o inhibición de la producción de iNOS en

células inflamatorias.

- Documento que no es patente 1: Arthritis Rheum., 2002 Nov., 46(11): 2878-83
 Documento que no es patente 2: Am. J. Pathol., 2001 Mar., 158(3): 855-66
 5 Documento que no es patente 3: J. Allergy Clin. Immunol., 2004 May, 113 (5) : 940-8
 Documento que no es patente 4: J. Clin. Invest., 2001 May. 107(9): 1173-81
 Documento que no es patente 5: J. Allergy Clin. Immunol., 2003 Dic, 112 (6) : 1139-46
 Documento que no es patente 6: J. Clin. Invest.. 2003 Abr., 111(8): 1241-50
 Documento que no es patente 7: Clin. Exp. Immunol., 1999 Nov., 118 (2) : 298-303
 10 Documento que no es patente 8: Circulation, 2003 Feb. 25, 107(7): 1009-16
 Documento que no es patente 9: J. Neuroimmunol., 2002 Abr., 125(1-2): 59-65
 Documento de patente 1: patente japonesa abierta a inspección pública (Kokai) n.º 2002-345454
 Documento que no es patente 10: Kidney Int., 1999 Ago., 56(2): 612-20
 Documento que no es patente 11: J. Clin. Invest., 2001 Sep., 108 (5) : 679-88
 15 Documento que no es patente 12: Immunity, 2003 Jul., 19(1): 71-82
 Documento que no es patente 13: Immunity, 2003 Jul., 19(1): 59-70
 Documento que no es patente 14: J. Exp. Med., 2003 Jun. 16, 197(12): 1701-7
 Documento que no es patente 15: Eur. J. Pharmacol., 2002 Oct. 18, 453(1): 119-29
 Documento que no es patente 16: Arthritis Rheum., 1998 Jul., 41(7): 1275-86
 20 Documento que no es patente 17: J. Pharmacol. Exp. Ther., 2001 Sep., 298(3) : 1128-32
 Documento que no es patente 18: Eur. J. Pharmacol., 2001 Ene. 19, 412(1): 91-9
 Documento que no es patente 19: J. Clin. Invest., 2001 Feb., 107 (4) : 439-47
 Documento que no es patente 20: J. Pharmacol. Exp. Ther., 2003 Mar., 304 (3) : 1285-91
 Documento que no es patente 21: Anesth. Analg., 2003 Dic., 97(6): 1751-5
 25 Documento que no es patente 22: Eur. J. Pharmacol., 2000 Mar. 10, 391 (1-2) : 31-8
 Documento que no es patente 23: Br. J. Pharmacol., 1999 May, 127 (2) : 546-52
 Documento que no es patente 24: Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol., 2002 Jun., 282(6): H1996-2003
 Documento que no es patente 25: Nitric Oxide, 2004 May, 10(3): 170-7
 Documento que no es patente 26: Curr. Drug Targets Inflamm. Allergy, 2002 Mar., 1(1): 89-108
 30 Documento que no es patente 27: Circulation, 2003 Sep. 2, 108(9): 1107-12

Divulgación de la invención

Un objetivo de la presente invención es proporcionar un agente terapéutico para enfermedades inflamatorias, específicamente, enfermedades inflamatorias del intestino (en particular, colitis ulcerante, enfermedad de Crohn), basándose en un concepto novedoso.

Basándose en los hallazgos previos, los inventores de la presente invención pusieron atención al hecho de que no había informes sobre la inhibición de la producción de iNOS y mejora de las afecciones patológicas de ese modo por la inhibición de la función de CX3CR1, por tanto construyeron una hipótesis de que un agente terapéutico para una enfermedad inflamatoria basado en un concepto novedoso podría crearse dilucidando la función y realizaron diversas investigaciones.

Es decir, se realizó investigación usando anticuerpos que inhiben la interacción de fractalcina y CX3CR1 y la función de CX3CR1 en diversos modelos animales descritos en los ejemplos mencionados posteriormente, y como resultado, se descubrió por primera vez que inhibían la producción de iNOS y mejoraban las afecciones patológicas. Además, aunque se había informado de que los anticuerpos que inhiben la interacción de fractalcina y CX3CR1 y la función de CX3CR1 son eficaces para la hepatitis inducida por ConA, se descubrió por primera vez que inhibían la expresión del ARNm iNOS en el hígado en hepatitis inducida por ConA y la producción de iNOS en células inflamatorias. Basándose en estos hallazgos, demostraron que un anticuerpo que inhibe la interacción de fractalcina y CX3CR1 y la función de CX3CR1 o un compuesto que inhibe la interacción de fractalcina y CX3CR1 y la función de CX3CR1 (por tanto, también mencionado como "antagonista de CX3CR1") era útil para el tratamiento de enfermedades inflamatorias asociadas con el sistema de infiltración celular de fractalcina-CX3CR1 y causaba producción excesiva de NO por la actividad de iNOS o células inflamatorias (enfermedades inflamatorias del intestino [en particular, colitis ulcerante y enfermedad de Crohn] y, por tanto, conseguía la presente invención).

Es decir, la presente invención proporciona lo siguiente.

- (1) Un agente terapéutico que comprende un anticuerpo o un antagonista de CX3CR1 para su uso en el tratamiento de una enfermedad inflamatoria del intestino, donde dicho anticuerpo o dicho antagonista de CX3CR1 inhibe una interacción de fractalcina y CX3CR1.
- (2) El agente para su uso de acuerdo con (1), donde el anticuerpo es un anticuerpo anti-fractalcina.
- (3) El agente para su uso de acuerdo con (2), donde el anticuerpo anti-fractalcina es un anticuerpo monoclonal.
- (4) El agente para su uso de acuerdo con uno cualquiera de (1) a (3), donde la enfermedad inflamatoria del intestino es colitis ulcerante o enfermedad de Crohn.

Breve descripción de los dibujos

- 5 [Fig. 1] Muestra el efecto del anticuerpo anti-fractalcina de ratón (5H8-4) para mejorar la pérdida de peso corporal en un modelo de enfermedad inflamatoria del intestino de ratón transfundido con linfocitos T CD4 positivos y CD45RB fuertemente positivos.
- [Fig. 2] Muestra los valores de consistencia de las deposiciones en el intestino grueso y el efecto del anticuerpo anti-fractalcina de ratón (5H8-4) para mejorar la hipertrofia del intestino grueso en un modelo de enfermedad inflamatoria del intestino de ratón transfundido con linfocitos T CD4 positivos y CD45RB fuertemente positivos.
- 10 [Fig. 3] Muestra el efecto del anticuerpo anti-fractalcina de ratón (5H8-4) para mejorar los cambios morfológicos en el intestino grueso en un modelo de enfermedad inflamatoria del intestino de ratón transfundido con linfocitos T CD4 positivos y CD45RB fuertemente positivos (fotografías de la morfología del órgano).
- [Fig. 4] Muestra el efecto del anticuerpo anti-fractalcina de ratón (5H8-4) para mejorar los daños tisulares del intestino grueso en un modelo de enfermedad inflamatoria del intestino de ratón transfundido con linfocitos T CD4 positivos y CD45RB fuertemente positivos (fotomicrografías).
- 15 [Fig. 5] Muestra el efecto del anticuerpo anti-fractalcina de ratón (5H8-4) para mejorar las expresiones de los ARNm para diversos factores en un modelo de enfermedad inflamatoria del intestino de ratón transfundido con linfocitos T CD4 positivos y CD45RB fuertemente positivos.
- 20 [Fig. 6] Muestra el efecto del anticuerpo anti-fractalcina de ratón (5H8-4) para mejorar DAI en un modelo de enfermedad inflamatoria del intestino inducida por oxafolona en ratón.
- [Fig. 7] Muestra el efecto del anticuerpo anti-fractalcina de ratón (5H8-4) para mejorar la hipertrofia del intestino grueso y el acortamiento del intestino grueso en un modelo de enfermedad inflamatoria del intestino inducida por oxafolona en ratón.
- 25 [Fig. 8] Muestra el efecto del anticuerpo anti-fractalcina de ratón (5H8-4) para mejorar los cambios morfológicos en el intestino grueso en un modelo de enfermedad inflamatoria del intestino inducida por oxafolona en ratón (fotografía de la morfología del órgano).
- 30 [Fig. 9] Muestra el efecto del anticuerpo anti-fractalcina de ratón (5H8-4) para mejorar los daños tisulares del intestino grueso en un modelo de enfermedad inflamatoria del intestino inducida por oxafolona en ratón (fotomicrografías).
- 35 [Fig. 10] Muestra el efecto del anticuerpo anti-fractalcina de ratón (n.º 126) para mejorar la hipertrofia del intestino grueso y el acortamiento del intestino grueso en un modelo de enfermedad inflamatoria del intestino inducida por oxafolona en ratón.
- 40 [Fig. 11] Muestra el efecto del anticuerpo anti-fractalcina de ratón (5H8-4) para mejorar las expresiones de diversos factores en tejido hepático en hepatitis inducida por ConA.
- [Fig. 12] Muestra el efecto del anticuerpo anti-fractalcina de ratón (5H8-4) para mejorar los aumentos en iNOS y células inflamatorias CX3CR1 positivas en el parénquima hepático en hepatitis inducida por ConA (fotomicrografías).
- 45 [Fig. 13] Muestra los resultados de la tinción de doble fluorescencia de tejidos hepáticos en hepatitis inducida por ConA (fotomicrografías).
- [Fig. 14] Muestra las proporciones de células positivas al marcador entre células CX3CR1 positivas y células iNOS positivas en tejidos hepáticos en hepatitis inducida por ConA.
- 50 [Fig. 15] Muestra los resultados de citometría de flujo de células CX3CR1 positivas.
- [Fig. 16] Muestra los resultados de la tinción histológica de tejidos hepáticos en hepatitis inducida por ConA (microfotografías).
- 55 [Fig. 17] Muestra las expresiones de quimiocinas en hepatitis inducida por ConA y el efecto del anticuerpo anti-fractalcina (5H8-4) sobre las expresiones de quimiocinas.
- 60 [Fig. 18] Muestra el efecto del anticuerpo anti-fractalcina de ratón (5H8-4) para mejorar las expresiones de los ARNm para marcadores de leucocitos en un modelo de enfermedad inflamatoria del intestino de ratón transfundido con linfocitos T CD4 positivos y CD45RB fuertemente positivos. "Normal" indica un control negativo, "cIgG" indica el grupo de administración de anticuerpo de control y "@FKN" denota indica el grupo de administración de anticuerpo anti-fractalcina (lo mismo se aplicará a las Fig. 19 a 25).
- 65

[Fig. 19] Muestra el efecto del anticuerpo anti-fractalcina de ratón (5H8-4) para mejorar las expresiones de los ARNm para quimiocinas y receptores de quimiocinas en un modelo de enfermedad inflamatoria del intestino de ratón transfundido con linfocitos T CD4 positivos y CD45RB fuertemente positivos.

5 [Fig. 20] Muestra el efecto del anticuerpo anti-fractalcina de ratón (5H8-4) para mejorar las expresiones de los ARNm para quimiocinas y receptores de quimiocinas en un modelo de enfermedad inflamatoria del intestino de ratón transfundido con linfocitos T CD4 positivos y CD45RB fuertemente positivos.

10 [Fig. 21] Muestra el efecto del anticuerpo anti-fractalcina de ratón (5H8-4) para mejorar las expresiones de los ARNm para citocinas en un modelo de enfermedad inflamatoria del intestino de ratón transfundido con linfocitos T CD4 positivos y CD45RB fuertemente positivos.

15 [Fig. 22] Muestra el efecto del anticuerpo anti-fractalcina de ratón (5H8-4) para mejorar las expresiones de los ARNm para moléculas de neovascularización y proteasas de destrucción tisular en un modelo de enfermedad inflamatoria del intestino de ratón transfundido con linfocitos T CD4 positivos y CD45RB fuertemente positivos.

20 [Fig. 23] Muestra el efecto del anticuerpo anti-fractalcina de ratón (5H8-4) para mejorar las expresiones de los ARNm para moléculas que activan las células dendríticas y los linfocitos T en un modelo de enfermedad inflamatoria del intestino de ratón transfundido con linfocitos T CD4 positivos y CD45RB fuertemente positivos.

[Fig. 24] Muestra el efecto del anticuerpo anti-fractalcina de ratón (5H8-4) para mejorar las expresiones de los ARNm para citocinas, quimiocinas y receptores de quimiocinas 24 horas después de la inyección intestinal de oxazolona en un modelo de enfermedad inflamatoria del intestino inducida por oxazolona en ratón.

25 [Fig. 25] Muestra el efecto del anticuerpo anti-fractalcina de ratón (5H8-4) para mejorar las expresiones de los ARNm para marcadores de neutrófilos, citocinas, quimiocinas y receptores de quimiocinas tres días después de la inyección intestinal de oxazolona en un modelo de enfermedad inflamatoria del intestino inducida por oxazolona en ratón.

Mejor modo para realizar la invención

30 1. Depósito de microorganismos

El híbrido Ham @mFKN5H8-4 se depositó en el International Patent Organism Depository, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (Tsukuba Central 6, 1-1, Higashi 1-Chome, Tsukuba-shi, Ibaraki-ken, 305-8566, Japón) el 29 de septiembre de 2004 (N.º de acceso: FERM P-20236), y después el depósito se convirtió en un depósito internacional según las provisiones del tratado de Budapest (N.º de acceso: FERM BP-10372).

40 El híbrido Ham @mFKN#126.1.1 se depositó en el International Patent Organism Depository, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (Tsukuba Central 6, 1-1, Higashi 1-Chome, Tsukuba-shi, Ibaraki-ken, 305-8566, Japón) el 29 de septiembre de 2004 (N.º de acceso: FERM P-20235), y después el depósito se convirtió en un depósito internacional según las provisiones del tratado de Budapest (N.º de acceso: FERM BP-10371).

2. Anticuerpo que inhibe la interacción de fractalcina y CX3CR1

45 Los anticuerpos que inhiben la interacción de fractalcina y CX3CR1 pueden prepararse del siguiente modo.

Un mamífero (por ejemplo, ratón, hámster o conejo) puede inmunizarse con CX3CR1 o fractalcina en forma de un inmunógeno que causa respuestas inmunitarias en el mamífero o un fragmento proteico de la misma (por ejemplo, fragmento peptídico).

50 Se expresa un vector de expresión que incorpora el gen de CX3CR1 o fractalcina (por ejemplo, véase GenBank NM_001337 o NM_002996) en las células hospedadoras, por ejemplo, células bacterianas, de mamífero o de insecto, y puede purificarse CX3CR1 o fractalcina de un medio de cultivo o de células bacterianas o de otras células de acuerdo con un método convencional. Además, puede expresarse CX3CR1 o fractalcina como una proteína de fusión con, por ejemplo, GST o similares, y puede purificarse usando una columna con glutatión en el caso de una proteína de fusión con GST.

60 También puede sintetizarse un péptido de CX3CR1 o fractalcina basándose en la secuencia de aminoácidos de CX3CR1 o fractalcina por un método conocido (por ejemplo, síntesis química de F-moc o de T-boc) y puede potenciarse la inmunogenicidad del péptido sintetizado uniéndolo a un vehículo adecuado, por ejemplo, KLH.

Después de la inmunización con CX3CR1 o fractalcina purificada o un fragmento peptídico de la misma y un adyuvante, puede obtenerse un antisuero, y pueden aislarse los anticuerpos policlonales del antisuero si se desea. Además, para producir anticuerpos monoclonales, se recogen células productoras de anticuerpos (linfocitos) de un animal inmunizado y se fusionan con células de mieloma por un método convencional de fusión celular para inmortalizar las células y de ese modo obtener células de híbrido. Esta técnica es un método establecido en este

campo técnico, y puede implementarse de acuerdo con un manual adecuado (Harlow et al., *Antibodies: A Laboratory Manual*, 1998, Cold Spring Harbor Laboratory). Además, pueden prepararse anticuerpos monoclonales por otros métodos tales como el método de hibridoma de linfocitos B humanos para producir anticuerpos monoclonales humanos (Kozbar et al., *Immunol. Today*, 4: 72, 1983), el método de EBV-hibridoma (Cole et al., *Monoclonal Antibody in Cancer Therapy*, 1985, Allen R. Bliss, Inc., 77-96), y cribado de una biblioteca combinatoria de anticuerpos (Huse et al., *Science*, 246: 1275, 1989).

Además, como método alternativo, también es aceptable un método en que se inmuniza un mamífero con células de insecto *per se* en que se expresa CX3CR1, se preparan hibridomas a partir de linfocitos del mamífero y se realiza cribado de los anticuerpos producidos usando células de mamífero en que se expresa CX3CR1 (células que muestran baja inmunidad cruzada con las células de insecto y no se unen a los anticuerpos dirigidos a las proteínas derivadas de las células de insecto). Además, también pueden prepararse por el método descrito en la patente japonesa abierta a inspección pública n.º 2002-345454.

El cribado de anticuerpos que inhiben la interacción de fractalcina y CX3CR1 puede realizarse por el método de cribado descrito posteriormente.

3. Antagonista de CX3CR1

La presente invención se consiguió basándose en el hallazgo de que los anticuerpos que inhiben la interacción de la fractalcina y CX3CR1 son útiles para el tratamiento de la enfermedad inflamatoria del intestino asociada con el sistema de infiltración celular de fractalcina-CX3CR1 y causaban producción excesiva de NO por la actividad de iNOS o células inflamatorias. Por lo tanto, los compuestos que inhiben la interacción de fractalcina y CX3CR1 y la función de CX3CR1, los antagonistas de CX3CR1, también pueden usarse en la presente invención. Los antagonistas de CX3CR1 no están particularmente limitados siempre que se usen compuestos que tienen la acción mencionada anteriormente, y pueden ser compuestos conocidos o novedosos. Además, pueden ser compuestos obtenidos por el método de cribado descrito posteriormente.

En la presente memoria descriptiva, los "compuestos" incluyen productos de expresión de una genoteca, biblioteca de compuestos sintéticos de bajo peso molecular, ácidos nucleicos (oligo ADN, oligo ARN), biblioteca de péptidos sintéticos, sustancias liberadas de las bacterias, extractos celulares (microorganismos, células vegetales, células animales), sobrenadante de cultivo celular (microorganismos, células vegetales, células animales), polipéptidos purificados o parcialmente purificados, extractos derivados de organismos marinos, plantas, animales, el suelo y biblioteca de presentación de péptidos en fagos aleatorios. Los ejemplos específicos incluyen los compuestos descritos en las publicaciones de patente internacional WO03/018549, WO00/09511 y WO02/076990. Los compuestos conocidos pueden producirse por un método de producción conocido *per se*, o cuando son compuestos naturales, pueden obtenerse por un método de extracción conocido *per se* o un método de purificación conocido *per se*, o cuando están disponibles en el mercado, pueden adquirirse. Además, pueden obtenerse derivados de compuestos conocidos por modificación por medios químicos, físicos y/o bioquímicos.

4. Método de cribado para anticuerpos que inhiben la interacción de fractalcina y CX3CR1

Los anticuerpos o los antagonistas de CX3CR1 que inhiben la interacción de fractalcina y CX3CR1 pueden cribarse basándose en si las células CX3CR1 positivas migran a células que expresan fractalcina o fractalcina unida a membrana. Un método específico para el cribado basándose en si las células CX3CR1 positivas migran se describe a continuación. Sin embargo, la presente invención no está limitada a este método.

La migración a fractalcina puede medirse usando, por ejemplo, un inserto de cultivo Transwell (Coaster).

Las células que no expresan fractalcina, por ejemplo, células ECV304, se cultivan en un inserto de cultivo Transwell para formar una capa monocelular sobre la superficie del inserto de cultivo. La fractalcina se diluye con una solución de migración (por ejemplo, RPMI-1640:M199 = 1:1, BSA al 0,5%, HEPES 20 mM, pH 7,4) hasta una concentración apropiada, preferiblemente una concentración de 10 nM, y se añade a una placa de 24 pocillos. El inserto de cultivo Transwell en el que se cultivan las células ECV304 se adhiere al 24-Transwell, y se añade una cantidad apropiada, preferiblemente 10^6 , de monocitos de sangre periférica suspendidos en la solución de migración al inserto de cultivo Transwell. Las células se cultivan en condiciones apropiadas, preferiblemente, 37°C durante 4 horas, después las células que migran a la placa de pocillo a través de las células ECV304 se recogen e identifican basándose en los marcadores de superficie celular o los antígenos intracelular. Preferiblemente, se tiñen con fluorescencia usando anticuerpos marcados con fluorescencia dirigida a un marcador de superficie celular o antígeno intracelular, y después se cuantifican usando el FACScalibur.

Si la migración de los linfocitos citotóxicos, preferiblemente células que expresan perforina y granzima B o CX3CR1, más preferiblemente células que expresan CX3CR1, se inhibe cuando se añaden anticuerpos que se unen a CX3CR1 o fractalcina a la solución de migración, se determina que los anticuerpos inhiben la interacción de fractalcina y CX3CR1.

Además, expresando fractalcina unida a membrana en células ECV304 y midiendo los monocitos de sangre periférica que migran a otras quimiocinas tales como MIP-1 β , también puede determinarse si un anticuerpo inhibe la interacción de fractalcina y CX3CR1.

5 5. Inhibición de la producción de iNOS

En la presente memoria descriptiva, la expresión "inhibición de la producción de iNOS" o "se inhibe la producción de iNOS" significa que el nivel de expresión de ARNm para iNOS está suprimido, o está suprimida la cantidad de producción de proteína iNOS. La inhibición de la producción de iNOS puede medirse por cualquiera de PCR a tiempo real, transferencia de Western, ELISA (ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas en fase sólida) y medición de la actividad enzimática iNOS.

Por ejemplo, la PCR a tiempo real se realiza específicamente del siguiente modo. Se purifica el ARN total de los tejidos o las células de una manera convencional, y se prepara el ADNc usando una transcriptasa inversa y cebadores adecuados. A partir del ADNc preparado, cada molécula puede amplificarse específicamente usando cebadores específicos para cada molécula y una ADN polimerasa. Puede controlarse una curva de amplificación para cada molécula incorporando un colorante fluorescente adecuado en la molécula cuando se amplifica y usando un aparato específico (tal como el detector de secuencia PRISM 7700 (Applied Biosystems)). El nivel de expresión de ARNm de cada molécula en tejidos y en células puede medirse cuantitativamente corrigiendo cada molécula usando un gen de patrón interno (tal como gen de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa).

6. Uso de anticuerpo o de antagonista de CX3CR1 que inhibe la interacción de fractalcina y CX3CR1

La presente invención proporciona un agente terapéutico que comprende un anticuerpo o un antagonista de CX3CR1 para su uso en el tratamiento de una enfermedad inflamatoria del intestino, donde dicho anticuerpo o dicho antagonista de CX3CR1 inhibe la interacción de fractalcina y CX3CR1. En el agente terapéutico mencionado anteriormente, el anticuerpo mencionado anteriormente es preferiblemente un anticuerpo que se une a fractalcina. Cuando el agente terapéutico de la presente invención que contiene el anticuerpo se aplica a seres humanos, se prefieren las siguientes realizaciones.

Un anticuerpo monoclonal preparado usando un animal diferente de un ser humano, por ejemplo, un anticuerpo monoclonal de ratón preparado usando un ratón como animal a inmunizar, a menudo se reconoce como una proteína foránea y a menudo causa una respuesta inmunitaria contra un anticuerpo monoclonal, cuando se administra a un ser humano. Un medio para evitar este problema es un anticuerpo quimérico, es decir, un anticuerpo que consiste en una región de unión a antígeno derivada de un anticuerpo monoclonal de ratón y las otras regiones derivadas de un anticuerpo humano. Los anticuerpos que inhiben la interacción de fractalcina y CX3CR1 usados en la presente invención también incluyen anticuerpos quiméricos. Los ejemplos de anticuerpos quiméricos incluyen un anticuerpo quimérico que usa la región variable completa de un anticuerpo monoclonal de ratón como la región de unión a antígeno (Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81: 6851, 1985; Takeda et al., Nature, 314: 452, 1985) y un anticuerpo quimérico que usa una región flanqueante derivada de ser humano y una región hipervariable derivada de un anticuerpo monoclonal de ratón en combinación con la región de unión a antígeno (Teng et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80: 7308-12, 1983; Kozbar et al., Immunol. Today, 4: 7279, 1983). Sin embargo, la presente invención no está limitada a estos ejemplos.

Además, los anticuerpos que inhiben la interacción de fractalcina y CX3CR1 mencionados en la presente memoria descriptiva también incluyen un fragmento de un anticuerpo que se une específicamente a CX3CR1 o fractalcina, por ejemplo, fragmento Fab o (Fab')₂.

El agente terapéutico de la presente invención puede administrarse a pacientes que necesitan tratamiento de enfermedad inflamatoria del intestino, que está asociada con el sistema de infiltración celular de fractalcina-CX3CR1 y causada por producción excesiva de NO por la actividad de iNOS o células inflamatorias (en particular, colitis ulcerante, enfermedad de Crohn).

El agente terapéutico de la presente invención puede administrarse de una manera convencional tal como inyección (tal como inyecciones subcutáneas e intravenosas).

La forma del agente terapéutico se selecciona adecuadamente dependiendo del método de administración y puede ser una composición farmacéutica que usa vehículos farmacéuticamente aceptables en combinación. Los ejemplos de la composición farmacéutica adecuados para inyección incluyen solución acuosa esterilizada (cuando los ingredientes son hidrosolubles), dispersión o un polvo esterilizado usado para preparar inmediatamente una solución o dispersión de inyección esterilizada. Todas las composiciones farmacéuticas adecuadas para inyección deben esterilizarse y tienen una fluidez que posibilita la fácil operación de inyección. Estas composiciones deben ser estables en condiciones de producción y de almacenamiento y deben protegerse de las acciones de microorganismos contaminantes tales como bacterias y hongos. Los ejemplos de los vehículos incluyen agua, etanol, polioles (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol), disolventes o medios de dispersión que comprenden una mezcla apropiada de éstos. La fluidez adecuada puede mantenerse, por ejemplo, usando un

recubrimiento de lecitina para mantener un tamaño de grano requerido en el caso de dispersiones o usando un tensioactivo. La protección de las acciones de microorganismos puede implementarse usando diversos agentes antibacterianos y agentes antifúngicos tales como parabeno, clorobutanol, fenol, ácido ascórbico y timerosal. En muchos casos, la composición contiene preferiblemente un agente isotónico, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol y sorbitol, cloruro de sodio. La adsorción sostenida de la composición para inyección puede conseguirse mezclando un agente que retarda la adsorción tal como monoestearato de aluminio y gelatina en la composición.

Una solución para inyección puede prepararse mezclando una cantidad requerida del anticuerpo que inhibe la interacción de fractalcina y CX3CR1 y uno o una mezcla de los compuestos mencionados anteriormente en un disolvente adecuado si fuera necesario y después sometiendo la mezcla a filtración de esterilización. En general, una dispersión se prepara mezclando un compuesto activo en un medio esterilizado que contiene un medio de dispersión básico y otros componentes requeridos seleccionados de los mencionados anteriormente. Los métodos preferidos para preparar el polvo esterilizado usado para la preparación de una solución de inyección esterilizada son secado al vacío y liofilización, y los polvos que contienen el ingrediente activo y los componentes adicionales deseados sometidos a filtración de esterilización de antemano pueden obtenerse por estos métodos.

La dosis del agente terapéutico de la presente invención puede variar dependiendo del anticuerpo seleccionado, la finalidad de la administración, la edad, el género y susceptibilidad a fármacos del paciente, método de administración, historial de la enfermedad y puede cambiarse a discreción del médico. Sin embargo, el intervalo de dosis adecuado es, por ejemplo, de aproximadamente 0,01 a 30 mg, preferiblemente de aproximadamente 0,1 a 10 mg, por kilogramo de peso corporal del paciente. Teniendo en cuenta que la eficacia de las vías de administración varía, se espera que la dosis requerida cambie en un amplio intervalo. Por ejemplo, se espera que la administración oral requiera una dosis mayor que para la administración por inyección intravenosa. Dichos cambios en el nivel de dosis pueden ajustarse usando un procedimiento de optimización empírica convencional bien comprendido en este campo.

Además, puede prepararse una inmunotoxina que contiene un anticuerpo dirigido contra CX3CR1 y una sustancia citotóxica unida al anticuerpo.

Los ejemplos de la sustancia tóxica incluyen saporina, ricina, exotoxina de *Pseudomonas*, toxina diftérica y agente quimioterapéuticos. El anticuerpo y la sustancia tóxica pueden unirse por un método convencional usado para la preparación de inmunotoxinas. Dicha inmunotoxina inhibe específicamente el crecimiento de células que expresan CX3CR1.

Cuando se aplica un agente terapéutico para enfermedades inflamatorias que contiene el antagonista de CX3CR1 a seres humanos, se prefieren las siguientes realizaciones. El antagonista de CX3CR1 puede formar una sal, y ejemplos de la misma incluyen sales con ácidos o bases farmacéuticamente aceptables. Por consiguiente, el antagonista de CX3CR1 o una sal del mismo puede usarse para el tratamiento de enfermedad inflamatoria del intestino asociada con el sistema de infiltración celular de fractalcina-CX3CR1 y causada por la producción excesiva de NO por la actividad de iNOS o células inflamatorias (en particular, colitis ulcerante y enfermedad de Crohn). Las sustancias obtenidas *per se* pueden usarse en solitario, o pueden también usarse como una composición farmacéutica mezclándolas con un vehículo farmacéuticamente aceptable. La proporción del ingrediente activo al vehículo en dicho caso puede cambiarse en el intervalo de un 1 a un 90% en peso. Además, el agente terapéutico puede administrarse mediante cualquiera de las vías de administración orales o parenterales (por ejemplo, inyección intravenosa, inyección intramuscular, administración subcutánea, administración rectal o administración percutánea).

Por lo tanto, se prepara una composición farmacéutica que contiene el antagonista de CX3CR1 o una sal del mismo en una forma de dosificación adecuada dependiendo de la vía de administración, y los ejemplos específicos de la forma de dosificación incluyen agentes orales tales como comprimido, cápsula, gránulo, polvo y jarabe, y agentes parenterales tales como inyección, infusión por goteo, liposoma y supositorio. Estas preparaciones pueden producirse de una manera convencional usando excipientes, diluyentes, aglutinantes, agentes humectantes, agentes disgregantes, tensioactivos, lubricantes, agentes de dispersión, tampones, conservantes, auxiliares de disolución, antisépticos, agentes aromatizantes, agentes calmantes y estabilizantes habitualmente usados. Los ejemplos de aditivos no tóxicos útiles mencionados anteriormente incluyen lactosa, fructosa, glucosa, almidón, gelatina, estearato de magnesio, metilcelulosa o sales de la misma, etanol, ácido cítrico, cloruro de sodio y fosfato de sodio.

La forma de administración y el intervalo de dosis requerido de la misma dependen de la selección de los compuestos obtenidos, la finalidad de la administración, la vía de administración, las propiedades de la preparación y las afecciones del paciente, así como la discreción del médico. Sin embargo, el intervalo de dosis adecuado es de aproximadamente 1,0 a 1500 µg, preferiblemente de aproximadamente 10 a 500 µg, por kg de peso corporal del paciente. Teniendo en cuenta que la eficacia de la vía de administración varía, se espera que la dosis requerida cambie en un amplio intervalo. Por ejemplo, se espera que la administración oral requiera una dosis mayor que para administración por inyección intravenosa. Dichos cambios en el nivel de dosis pueden ajustarse usando un procedimiento de optimización empírica convencional bien entendido en este campo.

En la presente memoria descriptiva, "tratamiento" en general significa obtener un efecto farmacológico y/o un efecto fisiológico deseado. El efecto puede ser profiláctico en vista de la prevención completa o parcial de una enfermedad y/o de un síntoma, o puede ser terapéutico en vista de una cura parcial o completa de una enfermedad y/o de un efecto adverso de la enfermedad. En la presente memoria descriptiva, "tratamiento" incluye tratamientos arbitrarios de enfermedades en mamíferos, en particular, seres humanos, por ejemplo, los siguientes tratamientos (a) a (c):

(a) Prevención de la aparición de una enfermedad o de un síntoma en un paciente que puede tener una predisposición de la enfermedad o del síntoma, pero aún no se ha diagnosticado como que la predisposición;

(b) Inhibición de un síntoma de una enfermedad, es decir, prevención de la progresión del síntoma;

(c) Mejora de un síntoma de la enfermedad, es decir, inducción de la regresión de la enfermedad o síntoma.

Como el anticuerpo o el antagonista de CX3CR1 que inhibe la interacción de fractalcina y CX3CR1 usado en la presente invención tiene una acción de inhibición de la producción de iNOS, también se proporciona un inhibidor de la producción de iNOS que contiene el antagonista de CX3CR1 como ingrediente activo. El inhibidor de la producción de iNOS puede prepararse como una composición como el agente terapéutico mencionado anteriormente, y puede administrarse a un paciente que necesita inhibición de la producción de iNOS de la misma manera que para el agente terapéutico mencionado anteriormente.

A partir de ahora en este documento, se explicará la presente invención en más detalle con referencia a los ejemplos. Las abreviaturas usadas en la siguiente descripción son de acuerdo con las usadas convencionalmente en este campo.

Ejemplo 1

Efecto de anticuerpo anti-fractalcina (5H8-4) en modelo de enfermedad inflamatoria del intestino de ratón transfundido con linfocitos T CD4 positivos y CD45RB fuertemente positivos (CD4+CD45RB^{high})

(1) Preparación de anticuerpo anti-fractalcina (5H8-4)

El anticuerpo anti-fractalcina (5H8-4) se preparó por el siguiente método (patente japonesa abierta a inspección pública n.º 2002-345454). Se usó fractalcina de ratón (R&D) como antígeno. El antígeno se mezcló con adyuvante TiterMax, se inmunizaron hámsteres armenios con la mezcla y se realizaron inmunizaciones de refuerzo después de ello con el antígeno en solitario. El título del anticuerpo en el suero se midió por ELISA. Se aislaron los linfocitos de los hámsteres armenios en que aumentó el título del anticuerpo, se mezclaron los linfocitos y las células de mieloma P3 a una relación de 5:1, y las células se fusionaron usando PEG (Boehringer). Los hibridomas se cultivaron en una placa de 96 pocillos durante una semana usando RPMI-1640/FCS al 10% /HAT/Origen HCF al 10% (ISGN). Después, se realizó ELISA para el sobrenadante de cultivo para identificar los pocillos positivos. Los hibridomas que producen anticuerpos anti-fractalcina de ratón se sometieron a dilución limitante dos veces para la clonación. Los anticuerpos monoclonales se purificaron usando una columna de proteína A del fluido ascítico preparado por inoculación de los hibridomas en ratones SCID a los que se administró adyuvante incompleto de Freund. La actividad de neutralización se determinó usando la inhibición de la migración de células que expresan CX3CR1 a fractalcina de ratón como un índice para obtener un anticuerpo neutralizante (5H8-4). El hibridoma que produce el anticuerpo neutralizante se denominó Ham @mFKN5H8-4.

(2) Método

En cuanto a la preparación de un modelo de enfermedad inflamatoria del intestino transfundido con linfocitos T CD4 positivos y CD45RB fuertemente positivos (CD4+CD45RB^{high}), se hizo referencia a Powrie et al., Int. Immunol., 5, 1461-1471, 1993. Se retiraron los bazo de ratones Balb/c hembra de 8 a 10 semanas de edad (Charles River Laboratories Japan, Inc.) y se trituraron los tejidos en un tamiz celular (PharMingen) que tiene un diámetro de poro de 100 µm para separar las células esplénicas. Las células esplénicas separadas, 5 ml de solución de cloruro de amonio (cloruro de amonio al 0,75%, tampón Tris 16 mM, pH 7,4) se añadieron por cada bazo y la mezcla se dejó a temperatura ambiente durante 15 minutos para lisar los eritrocitos. A la solución de células esplénicas, se le añadió PBS en un volumen de 2 veces y la mezcla se centrifugó a 1500 rpm durante 5 minutos, para recoger los precipitados. Los linfocitos T CD4 se purificaron de las células esplénicas separadas usando el kit de aislamiento de linfocitos T CD4 (Milteny). Para separar los linfocitos T CD4 positivos y CD45RB fuertemente positivos, los linfocitos T CD4 purificados se sometieron a doble tinción usando anticuerpo anti-CD4 marcado con ficoeritrina (PE) (eBioscience) y anticuerpo anti-CD45RB marcado con isotiocianato de fluoresceína (FITC) (eBioscience). Después de la doble tinción, clasificaron las células CD4 positivas y CD45RB fuertemente positivas usando FACSaria (Becton-Dickinson) para recoger las células objetivo. Las células recogidas se lavaron con PBS y después se suspendieron en PBS a una densidad celular de 2×10^6 células/ml. Las células CD4 positivas y CD45RB fuertemente positivas anteriores se transfundieron en las cavidades peritoneales de ratones SCID hembra de 8 a 10 semanas de edad (Clea Japan, Inc.) en un volumen de 200 µl cada uno, es decir, 4×10^5 células/ratón. A siete ratones SCID en cada grupo transfundidos con las células CD4 positivas y CD45RB fuertemente positivas se les dio

500 µg de un anticuerpo de control (IgG de hámster) o 500 µg del anticuerpo anti-fractalcina (5H8-4) (anticuerpo en PBS) una vez cada tres desde dos semanas después de la transfusión de las células. La administración se realizó desde la vena caudal. Además, como grupo de control negativo, se usaron cuatro ratones SCID transfundidos con linfocitos T CD4 de ratón (CD4 total) que se purificaron usando el kit de aislamiento de linfocitos T CD4 (Milteny) y no se separaron basándose en el nivel de expresión de CD45RB en una cantidad de $1,2 \times 10^6$ células/ratón. Dos semanas después de la administración de cada anticuerpo, se realizó la autopsia y se realizó la evaluación basándose en la pérdida de peso corporal, los valores de consistencia de las deposiciones en el intestino grueso, el desarrollo de hipertrofia en el intestino grueso, el análisis de expresión del ARNm de iNOS y la observación patológica. En cuanto a los valores de consistencia de las deposiciones, se usaron los valores de consistencia de las deposiciones usadas para el análisis de colitis inducida por sulfato de dextrano sódico (Cooper et al., Lab. Invest., 69, 238-249, 1993) mostrados en la tabla 1.

Tabla 1

Tabla 1 Valores de consistencia de deposiciones

	Consistencia de las deposiciones
Valor 0	Normal
Valor 1	Deposición suelta (la forma es sustancialmente normal)
Valor 2	Deposición suelta (la forma está mantenida)
Valor 3	Deposición suelta (la forma es anómala)
Valor 4	Diarrea, se adhieren las deposiciones alrededor del ano

Además, para hipertrofia del intestino grueso, se midió un sitio de aproximadamente 1,5 cm desde la regional anal usando un calibre de grosor de cuadrante (Peacock) después de retirar los contenidos intestinales. Además, el intestino grueso se sometió a observación morfológica y a observación histopatológica basada en tinción con hematoxilina y eosina de Mayer de secciones tisulares.

Además, se analizaron las expresiones de los ARNm para iNOS por PCR a tiempo real usando, como molde, ADNc obtenido purificando el ARN total (500 ng) del intestino grueso usando el RNeasy Mini Kit (QIAGEN) y transcribiéndolo de forma inversa usando la transcriptasa inversa AMV (TAKARA) y un hexámero aleatorio (TAKARA). La PCR a tiempo real se realizó para una mezcla de reacción preparada mezclando diversos cebadores con reactivos del kit de PCR QuantiTect SYBR Green (Qiagen) y uracil-ADN-glucosilasa (Invitrogen) usando el detector de secuencia ABI PRISM 7700 (Applied Biosystems). La PCR se realizó por reacciones a 50°C durante 2 minutos y a 95°C durante 15 minutos y 35 ciclos de reacciones a 95°C durante 15 segundos y a 60°C durante 1 minuto. Los conjuntos de cebadores usados son los siguientes.

Tabla 2

Cebador	Secuencia	SEQ ID NO:
miNOS codificante	5'-AGCTGAACCTTGAGCGAGGAG-3'	1
miNOS no codificante	5'- TGCCCCATAGGAAAAGACTG-3'	2
mfractalcina (FKN) codificante	5'- GGCAAGATGACCTCACGAAT-3'	3
mfractalcina (FKN) no codificante	5'- CTGTGTCGTCTCCAGGACAA-3'	4
mIFN-γ codificante	5'- GCTTTAACAGCAGGCCAGAC-3'	5
mIFN-γ no codificante	5'- GGAAGCACCAGGTGTCAAGT-3'	6
mTNFα codificante	5'- CCAGTGTGGGAAGCTGTCTT-3'	7
mTNFα no codificante	5'- AAGCAAAAGAGGAGGCAACA-3'	8
mIL-4 codificante	5'- GGCATTTTGAACGAGGTCAC-3'	9
mIL-4 no codificante	5'- AAATATGCGAAGCACCTTGG-3'	10
mPerforina codificante	5'- TGCAAGCAGAAGCACAAGTT-3'	11
mPerforina no codificante	5'- TGTGTGTTCACTGGGAAGGA-3'	12
mGranzimaB (GrB) codificante	5'- CCATCGTCCCTAGAGCTGAG-3'	13
mGranzimaB (GrB) no codificante	5'- GCTGGTCCCTGTGAATGGAT-3'	14
mFasL codificante	5'- CTGTGGCTACCGGTGGTATT-3'	15

mFasL no codificante	5'- GTTCTGCCAGTTCCTTCTGC-3'	16
mFas codificante	5'- GGAGACAGGATGACCCTGAA-3'	17
mFas no codificante	5'- TTCAGCAATTCTCGGGATGT-3'	18

(3) Resultados

La pérdida de peso corporal se suprimió en el grupo de administración con anticuerpo anti-fractalcina (5H8-4) en comparación con el grupo de administración de anticuerpo de control (Fig. 1). Además, los valores de consistencia de las deposiciones en el intestino grueso y la hipertrofia del intestino grueso se mejoraron en el grupo de administración de anticuerpo anti-fractalcina (5H8-4) en comparación con el grupo de administración del anticuerpo de control (Fig. 2). En cuanto a la observación morfológica de los sitios del intestino grueso, se observó hipertrofia en sitios del colon al recto en el grupo de administración de anticuerpo de control, y se observó mejora por la administración de los anticuerpos anti-fractalcina (5H8-4) (Fig. 3). En tinción de secciones tisulares, una cantidad muy grande de leucocitos (tales como linfocitos T, monocitos y macrófagos) se infiltraron en la capa mucosa del intestino grueso y se observó desaparición de las células calciformes que producen moco y daño e hiperplasia de los tejidos epiteliales del intestino grueso en el grupo de anticuerpo de control. En contraste, en el grupo de administración de anticuerpo anti-fractalcina (5H8-4) se inhibió la infiltración de leucocitos y las células epiteliales del intestino grueso estaban escasamente dañadas (Fig. 4). Además, en cuanto a la expresión del ARNm, la expresión del ARNm de iNOS aumentó en el grupo de administración de anticuerpo de control, pero la expresión se inhibió notablemente por los anticuerpos anti-fractalcina (5H8-4). Además, las expresiones de los ARNm para los factores citotóxicos tales como perforina, Fas y FasL y citocinas tales como IFN γ y TNF α también aumentaron en el grupo de administración de anticuerpo de control. En contraste, se observó la inhibición de estas expresiones en el grupo de administración de anticuerpo anti-fractalcina (5H8-4) (Fig. 5). Los resultados anteriores revelaron que la ruta de fractalcina CX3CR1 desempeñaba una función importante en el modelo de enfermedad inflamatoria del intestino transfundido con linfocitos T CD4 positivos y CD45RB fuertemente positivos (CD4+CD45RB^{high}). Se dedujo que la acción inhibía la producción excesiva de NO inhibiendo la producción de iNOS y mejoraba los daños tisulares. Es decir, se sugirió que la inhibición de la producción de iNOS basada en la inhibición de la interacción de fractalcina y CX3CR1 era un sistema de tratamiento útil para enfermedades inflamatorias del intestino.

Ejemplo 2

Efecto del anticuerpo anti-fractalcina (5H8-4) en modelo de enfermedad inflamatoria del intestino inducida por oxazolona en ratón

(1) Método

En cuanto al modelo de enfermedad inflamatoria del intestino inducida por oxazolona en ratón, se hizo referencia a Iijima et al., J. Exp. Med., 199, 471-482, 2004. Se guardaron los abdómenes de ratones Balb/c macho de 8 a 10 semanas de edad (Charles River Laboratories Japan, Inc.) en una casilla de aproximadamente 2 cm. A cada ratón, se le aplicaron 150 μ l de solución de etanol al 100% que contenía 4-etoximetilen-2-fenil-2-oxazolin-5-ona al 3% (a partir de ahora en este documento mencionada como oxazolona, Sigma). Los animales se mantuvieron en ayunas en el cuarto día después de la sensibilización con oxazolona, y en el quinto día, se les administró una inyección intestinal de 100 μ l cada una de etanol al 50%/solución salina fisiológica que contenía oxazolona al 0,5% en un sitio aproximadamente 3 cm desde el ano con anestesia por éter dietílico. Como grupo de control negativo, a cinco ratones Balb/c normales se les administró una inyección intestinal de 100 μ l cada una de etanol al 50%/solución salina fisiológica. A siete ratones en cada grupo a los que se les había administrado la inyección intestinal de oxazolona, se les administró 500 μ g de un anticuerpo de control (IgG de hámster) o 500 μ g del anticuerpo anti-fractalcina (5H8-4) (anticuerpo en PBS). El anticuerpo anti-fractalcina (5H8-4) se administró en el quinto día después de la sensibilización (inmediatamente antes de la inyección intestinal de oxazolona). El anticuerpo se administró desde la vena caudal. La evaluación se realizó para los puntos de evaluación de índice de actividad de enfermedad (a partir ahora en este documento mencionado como DAI, la consistencia de las deposiciones, el contenido de sangre y la ganancia y pérdida de peso corporal se representaron por valores, y se calcularon los valores de DAI), acortamiento del intestino grueso, hipertrofia del intestino grueso y observación patológica. En cuanto a DAI, se usó el DAI usado para la evaluación de colitis inducida por sulfato de dextrano sódico (Cooper et al., Lab. Invest., 69, 238-249, 1993) mostrado en la tabla 3.

Tabla 3

Tabla 3: DAI

	Pérdida de peso corporal	Consistencia en las deposiciones	Sangre en las deposiciones
Valor 0	0%	Normal	Normal
Valor 1	0-5%	Deposición sólida (la forma es sustancialmente normal)	Rastros de sangre en las deposiciones
Valor 2	5-10%	Deposición suelta (se mantiene la forma)	Sangre en las deposiciones (aproximadamente en la mitad de las deposiciones)
Valor 3	10-15%	Deposición suelta (la forma es anómala)	Sangre en las deposiciones (en la mayoría de la deposición)
Valor 4	> 20%	Diarrea, las deposiciones se adhieren alrededor del ano	Hemorragia

5

Además, como se observó diarrea y deposiciones sueltas desde el segundo día después de la inyección intestinal de oxazolona, se vigiló el DAI a lo largo del tiempo. El intestino grueso se sometió a observación morfológica y a observación histopatológica basada en tinción con hematoxilina y eosina de Mayer de secciones tisulares.

10

(2) Resultados

En comparación con el grupo de administración de anticuerpo de control, el grupo de administración de anticuerpo anti-fractalcina (5H8-4) mostró un DAI mejorado desde el segundo día después de la inyección intestinal de oxazolona (Fig. 6). Además, la hipertrofia y el acortamiento del intestino grueso también se mejoraron en el grupo de administración de anticuerpo anti-fractalcina (5H8-4) en comparación con el grupo de administración de anticuerpo de control (Fig. 7). En la observación morfológica de los sitios del intestino grueso, se observó hipertrofia en sitios desde el colon hasta el recto en el grupo de administración de anticuerpo de control, pero se observó mejora por la administración de los anticuerpos anti-fractalcina (5H8-4) (Fig. 8). En la tinción de secciones tisulares, se observó una cantidad muy grande de leucocitos (linfocitos T, monocitos y macrófagos) infiltrados en la capa mucosa del intestino grueso y desaparición de las células calciformes que producen moco y daño e hipertrofia en los tejidos epiteliales del intestino grueso en el grupo de anticuerpo de control. En contraste, en el grupo de administración de anticuerpo anti-fractalcina (5H8-4), se inhibió la infiltración de leucocitos y las células epiteliales del intestino grueso estaban escasamente dañadas (Fig. 9). Se esperaba a partir de los resultados anteriores que el sistema de infiltración celular de fractalcina-CX3CR1 desempeñara una función importante también en el modelo de colitis inducida por oxazolona, y se sugirió que el sistema de infiltración celular de fractalcina-CX3CR1 fuera un sistema de tratamiento útil para enfermedades inflamatorias del intestino.

20

25

Ejemplo 3

30

Efecto del anticuerpo anti-fractalcina (n.º 126) en modelo de enfermedad inflamatoria del intestino inducida por oxazolona en ratón

(1) Preparación de anticuerpo anti-fractalcina (n.º 126)

35

Se mezcló fractalcina de ratón (Genzyme) y adyuvante Titer Max™ Gold, y después se usaron para inmunizar hámsteres armenios dos o más veces, y se realizó adicionalmente la inmunización final con la fractalcina de ratón en solitario. El título del anticuerpo en el suero se midió por ELISA usando fractalcina en fase sólida, y se aislaron los linfocitos de los hámsteres armenios en que aumentó el título de anticuerpo. Los linfocitos y las células de mieloma P3 se mezclaron a una relación de 5:1, y se realizó la fusión celular usando PEG (Rosh). Los hibridomas se cultivaron en una placa durante una semana usando RPMI-1640/FCS al 10% /HAT/Origen HCF al 10% (ISGN). Después, el sobrenadante de cultivo se ensayó por ELISA usando fractalcina en fase sólida para identificar los pocillos positivos. Los hibridomas que producen los anticuerpos anti-fractalcina se clonaron realizando dilución limitante dos veces. Usando una columna de proteína A, se purificaron los anticuerpos monoclonales del fluido ascítico preparado por inoculación del hibridoma en ratones SCID y atímicos a los que se había administrado pristina. La actividad de neutralización de los anticuerpos obtenidos se determinó usando inhibición de la migración de células que expresan CX3CR1 a fractalcina de ratón como un índice, y se obtuvo el anticuerpo n.º 126 que tenía actividad de neutralización. El hibridoma que produce el anticuerpo neutralizante se denominó Ham @mFKN#126.1.1.

45

50

(2) Método

Se realizó una investigación de la misma manera que la usada en el ejemplo 2. Los puntos de evaluación fueron acortamiento e hipertrofia del intestino grueso. A siete ratones en cada grupo a los que se les había administrado la

inyección intestinal de oxazolona, se les administró 500 µg de un anticuerpo de control (IgG de hámster) o 500 µg del anticuerpo anti-fractalcina (n.º 126) (anticuerpo en PBS).

(3) Resultados

Como el anticuerpo anti-fractalcina 5H8-4, el anticuerpo anti-fractalcina n.º 126 mejoró el acortamiento y la hipertrofia del intestino grueso en comparación con el anticuerpo de control (Fig. 10). Estos resultados sugieren fuertemente que la inhibición del sistema de infiltración celular de fractalcina-CX3CR1 era útil para el tratamiento de la enfermedad inflamatoria del intestino ya que dos tipos diferentes de anticuerpos anti-fractalcina mostraban efectos en el modelo de colitis inducida por oxazolona.

Ejemplo 4 (Referencia)

Expresión de iNOS en hepatitis inducida por ConA y efecto del anticuerpo anti-fractalcina (5H8-4) en la producción de iNOS

(1) Método

A cuatro ratones C57BL/6 en cada grupo, se les administró por vía intravenosa 500 µg de un anticuerpo de control (IgG de hámster) o 500 µg del anticuerpo anti-fractalcina (5H8-4) (anticuerpos en PBS), e inmediatamente después se les administró por vía intravenosa 12 mg/kg de concanavalina A (ConA, Sigma Aldrich). Se retiró el hígado dos horas después y se extrajo el ARN. Como grupo de control negativo, se proporcionaron cuatro ratones C57BL/6 a los que se les había administrado por vía intravenosa PBS (tampón fosfato). Se midió la expresión de ARNm para iNOS recogiendo el ARN, sintetizando el ADNc y midiéndolo por PCR a tiempo real de la misma manera que la usada en el ejemplo 1. Además, 12 horas después de la administración intravenosa del anticuerpo de control o del anticuerpo anti-fractalcina y ConA, o PBS para el grupo de control negativo, se retiró el hígado y se prepararon secciones tisulares congeladas. Se realizó tinción inmunohistológica con los anticuerpos anti-iNOS y los anticuerpos anti-CX3CR1 y se contaron las células iNOS y CX3CR1 positivas.

(2) Resultados

La expresión del ARNm para iNOS aumentada por la administración de ConA disminuyó notablemente por la administración del anticuerpo anti-fractalcina. Además, las expresiones de los ARNm para los factores citotóxicos tales como granzima B y Fas y citocinas tales como IFN γ , TNF α e IL-4 aumentaron por la administración de ConA, y estas expresiones disminuyeron por la administración del anticuerpo anti-fractalcina (5H8-4) (Fig. 11). Además, los resultados de la tinción inmunohistológica mostraron que las células inflamatorias iNOS positivas aumentaban por la administración de ConA y disminuían notablemente por la administración del anticuerpo anti-fractalcina (Fig. 12). Además, las células inflamatorias CX3CR1 positivas también aumentaron por la administración de ConA y disminuyeron notablemente por la administración del anticuerpo anti-fractalcina (5H8-4) (Fig. 12). Los resultados anteriores revelaron que, inhibiendo la interacción de fractalcina y CX3CR1, se inhibía la expresión del ARNm para iNOS en el hígado de hepatitis inducida por ConA, y se inhibía la producción de iNOS en células inflamatorias y, por tanto, se sugirió que el daño tisular en el hígado se mejoraba por la inhibición de la producción excesiva de NO por las células inflamatorias.

Ejemplo 5 (Referencia)

Análisis de células que expresan CX3CR1 e iNOS en hepatitis inducida por ConA

Los resultados de la tinción inmunohistológica se analizaron en detalle. La mayoría de las células CX3CR1 positivas eran pequeñas y redondas, y tenían un núcleo con forma de herradura y una pequeña cantidad de citoplasma. Existían adyacentes a la vena porta, la vena central y la sinusoides, y una parte de ellas se observaron también en las periferias de regiones necróticas. La mayoría de las células iNOS positivas estaban en gran medida agrandadas y tenían un núcleo con forma de herradura y una gran cantidad de citoplasma. Existían adyacentes a la sinusoides y también se observaron en regiones necróticas además de sus periferias, pero no en las cercanías de la vena porta o de la vena central. Como se observaron diferencias entre las células CX3CR1 positivas y las células iNOS positivas en su morfología y localización como se describe anteriormente, se analizaron en detalle las características de las células CX3CR1 positivas y de las células iNOS positivas.

(1) Método

De la misma manera que la usada en el ejemplo 4, se prepararon secciones tisulares congeladas usando el hígado obtenido 12 horas después de la administración intravenosa de ConA (tejido hepático con hepatitis inducida por ConA). Se realizó tinción de doble fluorescencia con el anticuerpo anti-CX3CR1 o con el anticuerpo anti-iNOS (BD Bioscience) y el anticuerpo anti-BM8 (BMA), el anticuerpo anti-CD11b (eBioscience) o el anticuerpo anti-MCP-1 (Gengyme Techne), y se midieron las tasas de BM8, CD11b y MCP-1 positivas en las células CX3CR1 positivas y en las células iNOS positivas.

El anticuerpo CX3CR1 mencionado anteriormente se preparó en conejos usando un péptido C-terminal CX3CR1 de ratón (CSILSSFTHYTSEGDGSLLL (SEQ ID NO: 31)) como antígeno. Específicamente, se obtuvieron del siguiente modo. Un péptido sintético de la SEQ ID NO: 31 se unió a KLH y se usó para inmunizar conejos (JW) en una cantidad de 250 µg/conejo de una vez con un adyuvante. Como adyuvante, se usó el adyuvante completo de Freund solamente para la inmunización inicial y se usó el adyuvante incompleto de Freund para las otras inmunizaciones restantes. La inmunización se realizó cinco veces en total. Se confirmó el aumento en el título del anticuerpo por ELISA usando un péptido en fase sólida, y se recogió el suero. Se realizó purificación por afinidad usando el péptido que tiene la secuencia mencionada anteriormente unido a tiopropil Sephrose 4B (Amersham Bioscience) para obtener el anticuerpo anti-CX3CR1 del suero recogido.

Además, las células CX3CR1 positivas en la sangre periférica (PBL) y las células de médula ósea de ratones C57BL/6 macho de 9 semanas de edad se cultivaron con M-CSF (50 ng/ml) durante cinco días, y se analizaron las células CX3CR1 positivas entre los macrófagos (BMMφ) diferenciados de las células de médula ósea por citometría de flujo (FACS) para F4/80 específico de macrófagos y monocitos y Ly6C, un marcador de superficie de células del sistema de la médula ósea inmaduras, usando anticuerpo anti-F4/80 (CALTAG) y anticuerpo anti-Ly6C (BMA). Además, se realizó la tinción tisular de los tejidos hepáticos con hepatitis inducida por ConA con el anticuerpo anti-Ly6C y la tinción tisular de los tejidos hepáticos con hepatitis inducida por ConA infiltrados con macrófagos marcados con fluorescencia con el anticuerpo anti-MCP-1.

(2) Resultados

Se muestran imágenes de tinción representativas en la Fig. 13. En la figura, las letras a la izquierda y en la parte superior de las fotografías representan los marcadores reconocidos por los anticuerpos usados en la tinción de fluorescencia. La longitud de la barra es de 20 µm. Los resultados de la medición para la tasa positiva de cada marcador se muestran en la Fig. 14. En la figura, BM8+ indica BM8 positiva, CD11b+ indica CD11b positiva y MCP1+ indica MCP-1 positiva.

Las células CX3CR1 positivas comprendían $68,9 \pm 2,7\%$ ($n = 3$) de células CD11b positivas pequeñas y redondas y $53,4 \pm 2,0\%$ ($n = 3$) de células BM8 positivas grandes y agrandadas. Por otro lado, las células iNOS positivas comprendían $81,6 \pm 1,8\%$ ($n = 3$) de células BM8 positivas grandes y agrandadas y $12,6 \pm 3,0\%$ ($n = 3$) de células CD11b positivas. Por lo tanto, se reveló que las células CX3CR1 positivas no eran necesariamente células iNOS positivas, y una parte de ellas se expresaba en otro grupo de células. Se ha informado recientemente de que CCR2 está implicado en la infiltración de células productoras de iNOS en un modelo de ratón de infección bacteriana (documento que no es patente 13). Por consiguiente, se analizó la expresión de MCP-1, un ligando de CCR2. Las células MCP-1 positivas son pequeñas y redondas como las células CX3CR1 positivas. MCP-1 se expresó en $72,5 \pm 3,7\%$ ($n = 3$) de las células CX3CR1 positivas y la mayoría de las células MCP-1 positivas eran CX3CR1 positivas. Por lo tanto, se reveló que las células CX3CR1 positivas eran células principales entre las células que expresan MCP-1 en hepatitis inducida por ConA. Además, como se esperaba a partir de las diferencias morfológicas entre las células MCP-1 positivas y las células iNOS positivas, MCP-1 se expresaba en solamente un $14,6 \pm 2,2\%$ ($n = 3$) de las células iNOS positivas, y estaban escasamente solapadas entre sí. Por lo tanto, se descubrió que la mayoría de las células iNOS positivas no eran células CX3CR1/MCP-1 positivas. De forma interesante, las células iNOS positivas y las células MCP-1 positivas existían adyacentes entre sí a una alta frecuencia en los vasos sinusoides y en lesiones necróticas en el hígado.

Los resultados del análisis de las células CX3CR1 positivas basado en FACS se muestran en la Fig. 15. Los resultados de la tinción tisular se muestran en la Fig. 16.

Como resultado del análisis de las células CX3CR1 positivas por FACS usando sangre periférica (PBL), CX3CR1 se expresaba en los monocitos F4/80 positivos y el nivel de expresión era elevado en los monocitos maduros Ly6C y bajo en los monocitos inmaduros Ly6C+. Como resultado de la tinción tisular del hígado obtenido 12 horas después de la administración de ConA con Ly6C, que es un marcador de superficie de células del sistema de la médula ósea inmaduras, se sugirió que las células iNOS positivas y F4/80 positivas eran Ly6C positivas, y derivaban de monocitos inmaduros. Posteriormente, se cultivaron células de médula ósea de ratones C57BL/6 macho de 9 semanas de edad con M-CSF (50 ng/ml) durante cinco días para obtener macrófagos (BMMφ) diferenciados de células de médula ósea. Los macrófagos de BMMφ adheridos se recogieron con EDTA 1mM/PBS y se analizaron por FACS. Como resultado, eran CX3CR1hi F4/80+ Ly6C-/low como los monocitos maduros de sangre periférica. Entonces, los macrófagos BMMφ se marcaron con fluorescencia usando CFSE 10 µM, se inyectaron por vía intravenosa $2,5 \times 10^6$ células/250 µl a los ratones, se inyectó por vía intravenosa adicionalmente ConA (15 mg/kg) diez minutos después y se recogió el hígado 12 horas después para el examen de la infiltración. La infiltración de BMMφ al hígado aumentó notablemente por la administración de ConA. Además, las células marcadas con fluorescencia infiltradas producían MCP-1 a causa de la administración de ConA. No se expresaba iNOS en las células marcadas con fluorescencia y obtenidas del hospedador.

Los resultados anteriores sugirieron que los monocitos maduros CX3CR1 positivos infiltrados en los sitios de inflamación tras la inflamación expresan MCP-1 e inducen infiltración de monocitos inmaduros que producen iNOS

en los sitios de inflamación, y de ese modo causan afecciones patológicas.

Ejemplo 6 (Referencia)

5 Expresiones de quimiocinas en hepatitis inducida por ConA y efecto del anticuerpo anti-fractalcina (5H8-4) sobre las expresiones de quimiocinas

(1) Método

10 Se midieron las expresiones de los ARNm para quimiocinas por PCR a tiempo real de la misma manera que la usada en el ejemplo 1 usando ADNc derivado del hígado dos horas después de la administración intravenosa de ConA preparada en el ejemplo 4. Los conjuntos de cebadores usados fueron los siguientes. Se usó el gen de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (G3PDH) como gen de control.

15 Tabla 4

Tabla 4		
Cebador	Secuencia	SEQ ID NO:
mMCP-1 codificante	5'-AGGTCCCTGTCATGCTTCTG-3'	19
mMCP-1 no codificante	5'- TCATTGGGATCATCTTGCTG-3'	20
mKC codificante	5'- CTTGAAGGTGTTGCCCTCAG-3'	21
mKC no codificante	5'- TGGGGACACCTTTTAGCATC-3'	22
mMIP-2 codificante	5'- TCCAGAGCTTGAGTGTGACG-3'	23
mMIP-2 no codificante	5'- GCCTTGCCCTTTGTTTCAGTATC-3'	24
mIP-10 codificante	5'- TGAATCCGGAATCTAAGACCA-3'	25
mIP-10 no codificante	5'- GAGGCTCTCTGCTGTCCATC-3'	26
mMIP-1 α codificante	5'- ACCATGACACTCTGCAACCA-3'	27
mMIP-1 α no codificante	5'- GATGAATTGGCGTGAATCT-3'	28
mMIP-1 β codificante	5'- CCCACTTCCTGCTGTTTCTC-3'	29
mMIP-1 β no codificante	5'- CTCACTGGGGTTAGCACAGA-3'	30

(2) Resultados

20 Los resultados se muestran en la Fig. 17. En la figura, "normal" indica un control negativo, "control" indica un grupo de administración de anticuerpo de control y "anti-FKN" indica un grupo de administración de anti-fractalcina.

25 Dos horas después de la administración de ConA, las expresiones de los ARNm para MCP-1, KC, MIP-2, IP-10, MIP-1 α y MIP-1 β aumentaron en el hígado. Las expresiones de los ARNm para estas quimiocinas disminuyeron por la administración del anticuerpo anti-fractalcina. Estos resultados sugirieron que la producción de muchos tipos de quimiocinas se inhibía por la inhibición de la interacción de fractalcina y CX3CR1 y, por tanto, la amplificación de la ruta de infiltración de células inflamatorias y la activación como reacciones de la inducción de inflamación inicial se vuelve ampliamente no funcional.

30

Ejemplo 7

35 Expresiones de los ARNm para marcadores de superficie celular, citocinas, quimiocinas, moléculas de activación celular y moléculas citotóxicas y efecto del anticuerpo anti-fractalcina (5H8-4) sobre las expresiones de los ARNm para marcadores de superficie celular, citocinas, quimiocinas, moléculas de activación celular y moléculas citotóxicas en modelo de enfermedad inflamatoria del intestino de ratón transfundido con linfocitos T CD4 positivos y CD45RB fuertemente positivos (CD4⁺CD45RB^{high})

(1) Método

40 Se midieron las expresiones de los ARNm para marcadores de leucocitos, citocinas, quimiocinas y moléculas implicadas en la activación celular y en la destrucción tisular en más detalle por PCR TaqMan de la misma manera que la usada en el ejemplo 1 usando ADNc derivado del intestino grueso preparado en el ejemplo 1.

45 Los conjuntos de cebadores usados fueron los siguientes.

Tabla 5-1

ES 2 641 815 T3

Tabla 5

Cebadores	Secuencia	SEQ ID NO:
CD4 codificante	5'- GGGCTGTGGCAGTGTCTACT -3'	32
CD4 no codificante	5'- CTGGTTCACCCCTCTGGATA -3'	33
F4/80 codificante	5'- TGCCTCCCTGACTTTCAAAT -3'	34
F4/80 no codificante	5'- TGGCATTGCTGTATCTGCTC -3'	35
T-bet codificante	5'- GGGAAGCTAAAGCTCACCAA -3'	36
T-bet no codificante	5'- CCTCTGGCTCTCCATCATTG -3'	37
CD11c codificante	5'- CTTATCGTGGGCAGCTCAGT -3'	38
CD11c no codificante	5'- CCATTTGCTTCCCTCCAACAT -3'	39
M-CSF receptor codificante	5'- CGACTTCTTCAAGTACTCCTTC -3'	40
M-CSF receptor no codificante	5'- CTACGTCCCGGTGGATGC -3'	41
Ly-6G codificante	5'- GATGGATTTTGC GTTGTCTCT -3'	42
Ly-6G no codificante	5'- GTCCAGAGTAGTGGGGCAGA -3'	43
IL-1 β codificante	5'- GCTGAAAGCTCTCCACCTCA -3'	44
IL-1 β no codificante	5'- AGGCCACAGGTATTTTGTCTG -3'	45
IL-6 codificante	5'- CAAAGCCAGAGTCCTTCAGAG -3'	46
IL-6 no codificante	5'- GCCACTCCTTCTGTGACTCC -3'	47
IL-12 α codificante	5'- GCCAGGTGTCTTAGCCAGTC -3'	48
IL-12 α no codificante	5'- TCTTCAATGTGCTGGTTTGG -3'	49
IL-12 β codificante	5'- ATCCAGCGCAAGAAAGAAAA -3'	50
IL-12 β no codificante	5'- AATAGCGATCCTGAGCTTGC -3'	51
IL-23 α codificante	5'- CAACAGCCAGTTCTGCTTGC -3'	52
IL-23 α no codificante	5'- GATCCTCTGGCTGGAGGAG -3'	53
IL-17 codificante	5'- TCCAGAAGGCCCTCAGACTA -3'	54
IL-17 no codificante	5'- TGAGCTTCCCAGATCACAGA -3'	55
RANKL codificante	5'- CATTGACACCTCACCATC -3'	56
RANKL no codificante	5'- TCCGTTGCTTAACGTCATGT -3'	57

Tabla 5-2

5

Tabla 5 (continuación)

Cebador	Secuencia	SEQ ID NO:
KC codificante	5'- CTTGAAGGTGTTGCCCTCAG -3'	58
KC no codificante	5'- TGGGGACACCTTTTAGCATC -3'	59
MIP-2 codificante	5'- TCCAGAGCTTGAGTGTGACG -3'	60
MIP-2 no codificante	5'- GCCTTGCCCTTTGTTTCAGTATC -3'	61
MCP-1 codificante	5'- AGGTCCCTGTCATGCTTCTG -3'	62
MCP-1 no codificante	5'- TCATTGGGATCATCTTGCTG -3'	63
MCP-3 codificante	5'- CTGCTTTCAGCATCCAAGTG -3'	64
MCP-3 no codificante	5'- CCCAGGGACACCGACTACT -3'	65
CXCR2 codificante	5'- GCTCACAAACAGCGTCGTAG -3'	66
CXCR2 no codificante	5'- AGGGCATGCCAGAGCTATAA -3'	67
CCR2 codificante	5'- CTTTGCAACTGCCTCTTTCC -3'	68
CCR2 no codificante	5'- TTCCCAGGAAGAGGTTGAGA -3'	69
MIP-1 α codificante	5'- ACCATGACACTCTGCAACCA -3'	70
MIP-1 α no codificante	5'- GATGAATTGGCGTGGAATCT -3'	71

ES 2 641 815 T3

MIP-1 β codificante	5'- CCCACTTCCTGCTGTTTCTC -3'	72
MIP-1 β no codificante	5'- CTCACTGGGGTTAGCACAGA -3'	73
CCR5 codificante	5'- GCCAGAGGAGGTGAGACATC -3'	74
CCR5 no codificante	5'- GCCAGAGGAGGTGAGACATC -3'	75
TARC codificante	5'- TGCTTCTGGGGACTTTTCTG -3'	76
TARC no codificante	5'- CATCCCTGGAACACTCCACT -3'	77
MDC codificante	5'- TTCTTGCTGTGGCAATTCAG -3'	78
MDC no codificante	5'- GCAGGATTTTGAGGTCCAGA -3'	79
CCR4 codificante	5'- TGTCCCTCAGGATCACTTTCAGA -3'	80
CCR4 no codificante	5'- AGCAGGAGAAGCCAATGAGA -3'	81
IP-10 codificante	5'- TGAATCCGGAATCTAAGACCA -3'	82
IP-10 no codificante	5'- GAGGCTCTCTGCTGTCCATC -3'	83

Tabla 5-3

Tabla 5 (continuación)		
Cebador	Secuencia	SEQ ID NO:
I-TAC codificante	5'- CAAGCAAGCTCGCCTCATA -3'	84
I-TAC no codificante	5'- GCATGTTCCAAGACAGCAGA -3'	85
CXCR3 codificante	5'- GTTCTGCTGGTCTCCAGAGG -3'	86
CXCR3 no codificante	5'- TGCCACCACCACTACCACTA -3'	87
CD40 codificante	5'- GTCGGCTTCTTCTCCAATCA -3'	88
CD40 no codificante	5'- GCATCCGGGACTTTAAACC -3'	89
CD40L codificante	5'- TGGATCTGTGCTTTTTGCTG -3'	90
CD40L no codificante	5'- CCTTCTCCTTTGTTGCATCTC -3'	91
CD80 codificante	5'- GCTGAACAGACCGTCTTCCT -3'	92
CD80 no codificante	5'- GTTTGCAGAGCCAGGGTAGT -3'	93
CD86 codificante	5'- TTCAGCAAAACCAAATGCAG -3'	94
CD86 no codificante	5'- TGCACTTCTTATTTTCAGGCAA -3'	95
Clase II codificante	5'- TCTACACCTGCGTGGTTCAG -3'	96
Clase II no codificante	5'- GCCAACACAGAAGATGATGAAG -3'	97
TLR2 codificante	5'- TAGGGGCTTCACTTCTCTGC -3'	98
TLR2 no codificante	5'- CCAAAGAGCTCGTAGCATCC -3'	99
bFGF codificante	5'- CCAACCGGTACCTTGCTATG -3'	100
bFGF no codificante	5'- GTGCCACATACCAACTGGAG -3'	101
VEGF Receptor 2 codificante	5'- CCAAGCTCAGCACACAGAAA -3'	102
VEGF Receptor 2 no codificante	5'- TCAGAATCACGCTGAGCATT -3'	103
MMP-2 codificante	5'- CCCCTGATGTCCAGCAAGTA -3'	104
MMP-2 no codificante	5'- TGCGATGAGCTTAGGGAAAC -3'	105
MMP-9 codificante	5'- AGACGACATAGACGGCATCC -3'	106
MMP-9 no codificante	5'- GTGGTTCAGTTGTGGTGGTG -3'	107
MMP-14 codificante	5'- CTGGGAAGGAATCCCTGAAT -3'	108
MMP-14 no codificante	5'- CTGGGAAGGAATCCCTGAAT -3'	109

5

(2) Resultados

En el grupo de administración de anticuerpo de control, aumentaban las expresiones de los ARNm para diversos marcadores de leucocitos tales como CD4, T-bet, F4/80, receptor de M-CSF (M-CSF R), Ly-6G y CD11c (Fig. 18). Estos resultados sugirieron una posibilidad de que los numerosos leucocitos infiltrados en el grupo de administración

10

de anticuerpo de control observados en la tinción de secciones tisulares del ejemplo 1 podrían estar constituidos por muchos tipos de leucocitos tales como linfocitos T CD4+ (en particular, linfocitos T CD4+ de tipo Th1), monocitos/macrófagos, neutrófilos y células dendríticas. Además, como los aumentos en las expresiones de los ARNm para quimiocinas-receptores de quimiocinas tales como KC, MIP-2, CXCR2, MCP-1, MCP-3, CCR2, MIP-1 α , MIP-1 β , CCR5, IP-10, I-TAC, CXCR3, TARC, MDC y CCR4 se observaron en el grupo de administración de anticuerpo de control, se dedujo que los leucocitos infiltrados se infiltraban a través de estos mecanismos de quimiocina-receptor de quimiocina (Fig. 19 y 20). Además, también se observaron aumentos notables en las expresiones de los ARNm para una serie de citocinas inflamatorias tales como as IL-1 β , IL-6, IL-12 α , IL-12 β , IL-23 α , IL-17 y RANKL, proteasas MMP-2, MMP-9 y MMP-14 implicadas en la destrucción tisular y además de bFGF y el receptor 2 de VEGF implicado en neovascularización en sitios de inflamación en el grupo de administración de anticuerpo de control (Fig. 21 y 22).

Además, como se observaron aumentos en las expresiones de CD40 y TLR2, receptores de activación de células dendríticas, CD40L, una molécula que se expresa en linfocitos T activados y activa las células dendríticas, moléculas del grupo de moléculas de co-señalización de activación de linfocitos T tales como CD80 y CD86, cuya expresión se potencia por la activación de células dendríticas y MHC de clase II, se sugirió una posibilidad de que las células presentadoras de antígeno tales como linfocitos T y células dendríticas se activaban en sitios de lesión, y los sistemas de inmunidad adquirida específicos de antígeno podrían estar funcionando (Fig. 23). Las expresiones de los ARNm para la serie de marcadores de leucocitos, quimiocinas-receptores de quimiocinas, citocinas, moléculas de destrucción tisular, moléculas relacionadas con neovascularización y moléculas de activación de linfocitos T/células dendríticas se inhibían notablemente por la administración de los anticuerpos anti-fractalcina (Fig. 18 a 23). Los resultados anteriores sugirieron una posibilidad de que mediante la inhibición de la interacción de fractalcina y CX3CR1, se inhibiera la producción de citocinas y quimiocinas inflamatorias, por tanto, la amplificación de la ruta de infiltración de células inflamatorias y activación quedaba ampliamente no funcional, y se prevenía la progresión de afecciones patológicas en enfermedad inflamatoria del intestino.

Ejemplo 8

Expresiones de los ARNm para marcadores de superficie celular, citocinas, quimiocinas, moléculas de activación celular y moléculas citotóxicas y efecto del anticuerpo anti-fractalcina (5H8-4) sobre las expresiones de los ARNm para marcadores de superficie celular, citocinas, quimiocinas, moléculas de activación celular y moléculas citotóxicas en modelo de enfermedad inflamatoria del intestino inducida por oxazolona en ratón

(1) Método

Se preparó un modelo de enfermedad inflamatoria del intestino de la misma manera que la usada en el ejemplo 2. El anticuerpo de control y el anticuerpo anti-fractalcina (5H8-4) administraron de acuerdo con el método del ejemplo 2. La autopsia se realizó 24 horas y tres días después de la inyección intestinal de oxazolona, se retiró el intestino grueso y después se extrajo el ARN de los tejidos del intestino grueso de la misma manera que la usada en el ejemplo 1. Al grupo de control negativo se le administró una inyección intestinal de etanol al 50%/solución salina fisiológica. Se midieron las expresiones de los ARNm para citocinas y quimiocinas por PCR TaqMan de la misma manera que la usada en el ejemplo 1 extrayendo el ARN y después sintetizando ADNc. Los conjuntos de cebadores usados son los siguientes.

Tabla 6

Tabla 6

Cebador	Secuencia	SEQ ID NO:
IL-1 β codificante	5'- GCTGAAAGCTCTCCACCTCA -3'	110
IL-1 β no codificante	5'- AGGCCACAGGTATTTTGTCTG -3'	111
IL-6 codificante	5'- CAAAGCCAGAGTCCTTCAGAG -3'	112
IL-6 no codificante	5'- GCCACTCCTTCTGTGACTCC -3'	113
Ly-6G codificante	5'- GATGGATTTTGC GTTGCTCT -3'	114
Ly-6G no codificante	5'- GTCCAGAGTAGTGGGGCAGA -3'	115
KC codificante	5'- CTTGAAGGTGTTGCCCTCAG -3'	116
KC no codificante	5'- TGGGGACACCTTTTAGCATC -3'	117
MIP-2 codificante	5'- TCCAGAGCTTGAGTGTGACG -3'	118
MIP-2 no codificante	5'- GCCTTGCCTTTGTTCAGTATC -3'	119
MCP-1 codificante	5'- GGTCCCTGTCATGCTTCTG -3'	120
MCP-1 no codificante	5'- TCATTGGGATCATCTTGCTG -3'	121

MIP-1 α codificante	5'- ACCATGACACTCTGCAACCA -3'	122
MIP-1 α no codificante	5'- GATGAATTGGCGTGGAATCT -3'	123
MIP-1 β codificante	5'- CCCACTTCCTGCTGTTTCTC -3'	124
MIP-1 β no codificante	5'- CTCACTGGGGTTAGCACAGA -3'	125
MCP-3 codificante	5'- CTGCTTTCAGCATCCAAGTG -3'	126
MCP-3 no codificante	5'- CCCAGGGACACCGACTACT -3'	127
CXCR2 codificante	5'- GCTCACAAACAGCGTCGTAG -3'	128
CXCR2 no codificante	5'- AGGGCATGCCAGAGCTATAA -3'	129

(2) Resultados

5 Veinticuatro horas después de la inyección intestinal de oxazolona, se observaron aumentos en las expresiones de los ARNm para citocinas inflamatorias tales como IL-1 β e IL-6, quimiocinas tales como KC, MIP-2, MCP-1, MCP-3, MIP-1 α y MIP-1 β y el receptor de quimiocinas CXCR2 en el grupo de administración de anticuerpo de control, y estos aumentos de expresión se inhibieron notablemente por la administración del anticuerpo anti-fractalcina (Fig. 24). Tres días después de la inyección intestinal de oxazolona, se observó un aumento en la expresión del ARNm para Ly-6G, un marcador de neutrófilos, además de aumentos en las expresiones del ARNm para IL-1 β , IL-6, KC, 10 MIP-2, MCP-1, MCP-3 y CXCR2, y este aumento en la expresión se inhibía notablemente por la administración del anticuerpo anti-fractalcina (Fig. 25). Estos resultados sugirieron que el efecto que mejora la afección patológica del anticuerpo anti-fractalcina en el modelo de enfermedad inflamatoria del intestino inducida por oxazolona se mostraba parcialmente por inhibición de la producción de las citocinas inflamatorias y quimiocinas tales como IL-1 β e IL-6 o la inhibición de la infiltración de neutrófilos.

15 Aplicabilidad industrial

Se proporciona un agente terapéutico para su uso en el tratamiento de una enfermedad inflamatoria del intestino basado en una novedosa estrategia, es decir, inhibición selectiva de la producción excesiva de NO por inhibición de 20 la actividad de iNOS en células inflamatorias.

Lista de secuencias

25 <110> Eisai Co., Ltd.

<120> TRATAMIENTO PARA ENFERMEDADES INFLAMATORIAS

<130> 0529WO1C5110

30 <150> JP 2005-206870

<151> 15-07-2005

<150> JP 2004-316708

<151> 29-10-2004

35 <160> 129

<210> 1

<211> 20

40 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> cebador

45 <400> 1

agctgaactt gagcgaggag 20

<210> 2

50 <211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

ES 2 641 815 T3

<223> cebador
 <400> 2
 5 tgcccatag gaaaagactg 20
 <210> 3
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 10 <220>
 <223> cebador
 <400> 3
 15 ggcaagatga cctcacgaat 20
 <210> 4
 <211> 20
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador
 25 <400> 4
 ctgtgtcgtc tccaggacaa 20
 <210> 5
 <211> 20
 <212> ADN
 30 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador
 35 <400> 5
 gctttaacag caggccagac 20
 <210> 6
 <211> 20
 <212> ADN
 40 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador
 45 <400> 6
 ggaagcacca ggtgtcaagt 20
 <210> 7
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 50 <220>
 <223> cebador
 <400> 7
 60 ccagtggtgg aagctgtctt 20
 <210> 8
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 65 <220>

<223> cebador
 <400> 8
 5 aagcaaaaga ggaggcaaca 20
 <210> 9
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 10 <220>
 <223> cebador
 <400> 9
 15 ggcatTTga acgaggtcac 20
 <210> 10
 <211> 20
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador
 25 <400> 10
 aaatatgcga agcacctgg 20
 <210> 11
 <211> 20
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador
 35 <400> 11
 tgcaagcaga agcacaagtt 20
 <210> 12
 40 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 45 <223> cebador
 <400> 12
 tGTgtgtca ctggaagga 20
 <210> 13
 50 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 55 <220>
 <223> cebador
 <400> 13
 60 ccatcgtccc tagagctgag 20
 <210> 14
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 65 <220>

<223> cebador
 <400> 14
 gctggcctt gtgaatgat 20
 5
 <210> 15
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 10
 <220>
 <223> cebador
 <400> 15
 15 ctgggttac cgggtgat 20
 <210> 16
 <211> 20
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador
 25 <400> 16
 gttctgccag ttcctctgc 20
 <210> 17
 <211> 20
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador
 35 <400> 17
 ggagacagga tgaccctgaa 20
 <210> 18
 40 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 45 <223> cebador
 <400> 18
 ttcagcaatt ctcgggatg 20
 50 <210> 19
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 55 <220>
 <223> cebador
 <400> 19
 60 aggtccctgt catgcttctg 20
 <210> 20
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 65 <220>

ES 2 641 815 T3

<223> cebador
 <400> 20
 5 tcattgggat catcttgctg 20
 <210> 21
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 10 <220>
 <223> cebador
 <400> 21
 15 ctgaagggtg ttgccctcag 20
 <210> 22
 <211> 20
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador
 25 <400> 22
 tggggacacc ttttagcatc 20
 <210> 23
 <211> 20
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador
 35 <400> 23
 tccagagctt gagtggacg 20
 <210> 24
 40 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 45 <223> cebador
 <400> 24
 gccttgcctt tggtcagat c 21
 50 <210> 25
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 55 <220>
 <223> cebador
 <400> 25
 60 tgaatccgga atctaagacc a 21
 <210> 26
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 65 <220>

ES 2 641 815 T3

<223> cebador

<400> 26
 5 gaggctctct gctgtccatc 20

<210> 27
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> cebador

<400> 27
 15 accatgacac tctgcaacca 20

<210> 28
 <211> 20
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> cebador

<400> 28
 25 gatgaattgg cgtggaatct 20

<210> 29
 <211> 20
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> cebador

35 <400> 29
 ccacttctct gctgtttctc 20

<210> 30
 40 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 45 <223> cebador

<400> 30
 ctactgggg ttagcacaga 20

<210> 31
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Oryctolagus cuniculus

55 <400> 31
 Cys Ser Ile Leu Ser Ser Phe Thr His Tyr Thr Ser Glu Gly Asp Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Leu Leu
 20

<210> 32
 <211> 20
 60 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> cebador
 <400> 32
 5 gggctgtggc agtgtctact 20
 <210> 33
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 10 <220>
 <223> cebador
 <400> 33
 15 ctgggtcacc cctctggata 20
 <210> 34
 <211> 20
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador
 25 <400> 34
 tgcctccctg actttcaaat 20
 <210> 35
 <211> 20
 <212> ADN
 30 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador
 35 <400> 35
 tggcattgct gtatctgctc 20
 <210> 36
 <211> 20
 <212> ADN
 40 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador
 45 <400> 36
 gggaagctaa agctcaccaa 20
 <210> 37
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 50 <220>
 <223> cebador
 <400> 37
 60 cctctggctc tccatcattc 20
 <210> 38
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 65 <220>

ES 2 641 815 T3

<223> cebador
 <400> 38
 5 cttatcgtgg gcagctcagt 20
 <210> 39
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 10 <220>
 <223> cebador
 <400> 39
 15 ccatttgctt cctccaacat 20
 <210> 40
 <211> 23
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador
 25 <400> 40
 cgacttcttc aagtgactcctc 23
 <210> 41
 <211> 18
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador
 35 <400> 41
 ctacgtcccg gtggatgc 18
 <210> 42
 40 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 45 <223> cebador
 <400> 42
 gatggatfff gcgttgctct 20
 50 <210> 43
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 55 <220>
 <223> cebador
 <400> 43
 60 gtccagagta gtggggcaga 20
 <210> 44
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 65 <220>

ES 2 641 815 T3

<223> cebador
 <400> 44
 5 gctgaaagct ctccacctca 20
 <210> 45
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 10 <220>
 <223> cebador
 <400> 45
 15 aggccacagg tatttgtcg 20
 <210> 46
 <211> 21
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador
 25 <400> 46
 caaagccaga gtccttcaga g 21
 <210> 47
 <211> 20
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador
 35 <400> 47
 gccactcctt ctgtgactcc 20
 <210> 48
 40 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 45 <223> cebador
 <400> 48
 gccagggtgc ttagccagtc 20
 <210> 49
 50 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 55 <220>
 <223> cebador
 <400> 49
 60 tcttcaatgt gctggttgg 20
 <210> 50
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 65 <220>

ES 2 641 815 T3

<223> cebador
 <400> 50
 atccagcgca agaaagaaa 20
 5
 <210> 51
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 10
 <220>
 <223> cebador
 <400> 51
 aatagcgatc ctgagcttgc 20
 15
 <210> 52
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 20
 <220>
 <223> cebador
 <400> 52
 caacagccag ttctgcttgc 20
 25
 <210> 53
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 30
 <220>
 <223> cebador
 <400> 53
 gatcctctgg ctggaggag 19
 35
 <210> 54
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 40
 <220>
 <223> cebador
 <400> 54
 tccagaaggc cctcagacta 20
 45
 <210> 55
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 50
 <220>
 <223> cebador
 <400> 55
 tgagcttccc agatcacaga 20
 55
 <210> 56
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 60
 <220>
 65

<223> cebador
 <400> 56
 catttgaca cctcacatc 20
 5
 <210> 57
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 10
 <220>
 <223> cebador
 <400> 57
 15 tccgttgctt aacgcatgt 20
 <210> 58
 <211> 20
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador
 25 <400> 58
 ctggaagggtg ttgccctcag 20
 <210> 59
 <211> 20
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador
 35 <400> 59
 tggggacacc ttttagcatc 20
 <210> 60
 <211> 20
 40 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador
 45 <400> 60
 tccagagctt gagtggacg 20
 <210> 61
 <211> 21
 50 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador
 55 <400> 61
 gccttgccctt tggtcagtat c 21
 60 <210> 62
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 65 <220>

ES 2 641 815 T3

<223> cebador
 <400> 62
 5 aggtccctgt catgcttctg 20
 <210> 63
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 10 <220>
 <223> cebador
 <400> 63
 15 tcattgggat catcttgctg 20
 <210> 64
 <211> 20
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador
 25 <400> 64
 ctgcttcag catccaagtg 20
 <210> 65
 <211> 19
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador
 35 <400> 65
 cccagggaca ccgactact 19
 <210> 66
 40 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 45 <223> cebador
 <400> 66
 gctcacaac agcgtcgtag 20
 <210> 67
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 55 <220>
 <223> cebador
 <400> 67
 60 agggcatgcc agagctataa 20
 <210> 68
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 65 <220>

ES 2 641 815 T3

<223> cebador
 <400> 68
 5 cttgcaact gcctcttcc 20
 <210> 69
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 10 <220>
 <223> cebador
 <400> 69
 15 ttcccaggaa gaggttgaga 20
 <210> 70
 <211> 20
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador
 25 <400> 70
 accatgacac tctgcaacca 20
 <210> 71
 <211> 20
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador
 35 <400> 71
 gatgaattgg cgtggaatct 20
 <210> 72
 40 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 45 <223> cebador
 <400> 72
 cccacttct gctgttctc 20
 <210> 73
 50 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 55 <220>
 <223> cebador
 <400> 73
 60 ctccactgggg ttagcacaga 20
 <210> 74
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 65 <220>

<223> cebador
 <400> 74
 gccagaggag gtgagacatc 20
 5
 <210> 75
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 10
 <220>
 <223> cebador
 <400> 75
 gccagaggag gtgagacatc 20
 15
 <210> 76
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 20
 <220>
 <223> cebador
 <400> 76
 tgcttctggg gactttctg 20
 25
 <210> 77
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 30
 <220>
 <223> cebador
 <400> 77
 catccctgga acactccact 20
 35
 <210> 78
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 40
 <220>
 <223> cebador
 <400> 78
 ttcttgctgt ggcaattcag 20
 45
 <210> 79
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 50
 <220>
 <223> cebador
 <400> 79
 gcaggatttt gaggtccaga 20
 60
 <210> 80
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 65
 <220>

<223> cebador
 <400> 80
 5 tgcctcagg atcacttca ga 22
 <210> 81
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 10 <220>
 <223> cebador
 <400> 81
 15 agcaggagaa gccaatgaga 20
 <210> 82
 <211> 21
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador
 25 <400> 82
 tgaatccgga atctaagacc a 21
 <210> 83
 <211> 20
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador
 35 <400> 83
 gaggctctct gctgtccatc 20
 <210> 84
 40 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 45 <223> cebador
 <400> 84
 caagcaagct cgctcata 19
 50 <210> 85
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 55 <220>
 <223> cebador
 <400> 85
 60 gcatgtcca agacagcaga 20
 <210> 86
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 65 <220>

ES 2 641 815 T3

<223> cebador
 <400> 86
 5 gttctgctgg tctccagagg 20
 <210> 87
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 10 <220>
 <223> cebador
 <400> 87
 15 tgccaccacc actaccacta 20
 <210> 88
 <211> 20
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador
 25 <400> 88
 gtcggcttct tctccaatca 20
 <210> 89
 <211> 19
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador
 35 <400> 89
 gcatccggga ctftaaacc 19
 <210> 90
 40 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 45 <223> cebador
 <400> 90
 tggatctgtg cttttgctg 20
 50 <210> 91
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 55 <220>
 <223> cebador
 <400> 91
 60 ccttctcctt tgttgcact c 21
 <210> 92
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 65 <220>

ES 2 641 815 T3

```

<223> cebador

<400> 92
5 gctgaacaga ccgtcttct      20

<210> 93
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
10

<220>
<223> cebador

<400> 93
15 gttgcagag ccaggtagt      20

<210> 94
<211> 20
<212> ADN
20 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> cebador

25 <400> 94
ttcagcaaaa ccaaatgcag      20

<210> 95
<211> 22
30 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cebador
35

<400> 95
tgcaactctt attcaggca aa      22

<210> 96
40 <211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
45 <223> cebador

<400> 96
tctacacctg cgtggttcag      20

50 <210> 97
<211> 22
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

55 <220>
<223> cebador

<400> 97
60 gccaacacag aagatgatga ag      22

<210> 98
<211> 20
<212> ADN
65 <213> Secuencia artificial

<220>

```

<223> cebador
 <400> 98
 taggggcttc acttctctgc 20
 5
 <210> 99
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 10
 <220>
 <223> cebador
 <400> 99
 ccaaagagct cgtagcatcc 20
 15
 <210> 100
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 20
 <220>
 <223> cebador
 <400> 100
 ccaaccgcta ccttgctatg 20
 25
 <210> 101
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 30
 <220>
 <223> cebador
 <400> 101
 gtgccacata ccaactggag 20
 35
 <210> 102
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 40
 <220>
 <223> cebador
 <400> 102
 ccaagctcag cacacagaaa 20
 45
 <210> 103
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 50
 <220>
 <223> cebador
 <400> 103
 tcagaatcac gctgagcatt 20
 60
 <210> 104
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 65
 <220>

<223> cebador
 <400> 104
 5 cccctgatgt ccagcaagta 20
 <210> 105
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 10 <220>
 <223> cebador
 <400> 105
 15 tgcgatgagc ttaggaaac 20
 <210> 106
 <211> 20
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador
 25 <400> 106
 agacgacata gacggcatcc 20
 <210> 107
 <211> 20
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador
 35 <400> 107
 gtggttcagt tgtgtggtg 20
 <210> 108
 40 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 45 <223> cebador
 <400> 108
 ctggaagga atccctgaat 20
 <210> 109
 50 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 55 <220>
 <223> cebador
 <400> 109
 60 ctggaagga atccctgaat 20
 <210> 110
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 65 <220>

<223> cebador
 <400> 110
 5 gctgaaagct ctccacctca 20
 <210> 111
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 10 <220>
 <223> cebador
 <400> 111
 15 aggccacagg tattttgtcg 20
 <210> 112
 <211> 21
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador
 25 <400> 112
 caaagccaga gtccttcaga g 21
 <210> 113
 <211> 20
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador
 35 <400> 113
 gccactcctt ctgtgactcc 20
 <210> 114
 40 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 45 <223> cebador
 <400> 114
 gatggatfff gcggtgctct 20
 50 <210> 115
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 55 <220>
 <223> cebador
 <400> 115
 60 gtccagagta gtggggcaga 20
 <210> 116
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 65 <220>

ES 2 641 815 T3

<223> cebador
 <400> 116
 5 cttgaagggtg ttgccctcag 20
 <210> 117
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 10
 <220>
 <223> cebador
 <400> 117
 15 tggggacacc ttttagcatc 20
 <210> 118
 <211> 20
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador
 25 <400> 118
 tccagagctt gagtggacg 20
 <210> 119
 <211> 20
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador
 35 <400> 119
 gccttgcctt tgttcagtat c 21
 <210> 120
 40 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 45 <223> cebador
 <400> 120
 ggtccctgtc atgcttctg 19
 50 <210> 121
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 55 <220>
 <223> cebador
 <400> 121
 60 tcattgggat catcttgctg 20
 <210> 122
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 65 <220>

ES 2 641 815 T3

<223> cebador
<400> 122
5 accatgacac tctgcaacca 20
<210> 123
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
10 <220>
<223> cebador
<400> 123
15 gatgaattgg cgtggaatct 20
<210> 124
<211> 20
<212> ADN
20 <213> Secuencia artificial
<220>
<223> cebador
25 <400> 124
cccacttct gctgttctc 20
<210> 125
<211> 20
30 <212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> cebador
35 <400> 125
ctcactgggg ttagcacaga 20
<210> 126
40 <211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
45 <223> cebador
<400> 126
ctgcttctag catccaagtg 20
<210> 127
50 <211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
55 <220>
<223> cebador
<400> 127
60 cccagggaca ccgactact 19
<210> 128
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
65 <220>

ES 2 641 815 T3

<223> cebador
<400> 128
5 gctcacaac agcgtcgtag 20
<210> 129
<211> 20
<212> ADN
10 <213> Secuencia artificial
<220>
<223> cebador
<400> 129
15 agggcatgcc agagctataa 20

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un agente terapéutico que comprende un anticuerpo o un antagonista de CX3CR1 para su uso en el tratamiento de una enfermedad inflamatoria del intestino, en el que dicho anticuerpo o dicho antagonista de CX3CR1 inhibe una interacción de fractalcina y CX3CR1.
2. El agente para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el anticuerpo es un anticuerpo anti-fractalcina.
- 10 3. El agente para su uso de acuerdo con la reivindicación 2, en el que el anticuerpo anti-fractalcina es un anticuerpo monoclonal.
4. El agente para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la enfermedad inflamatoria del intestino es colitis ulcerante o enfermedad de Crohn.

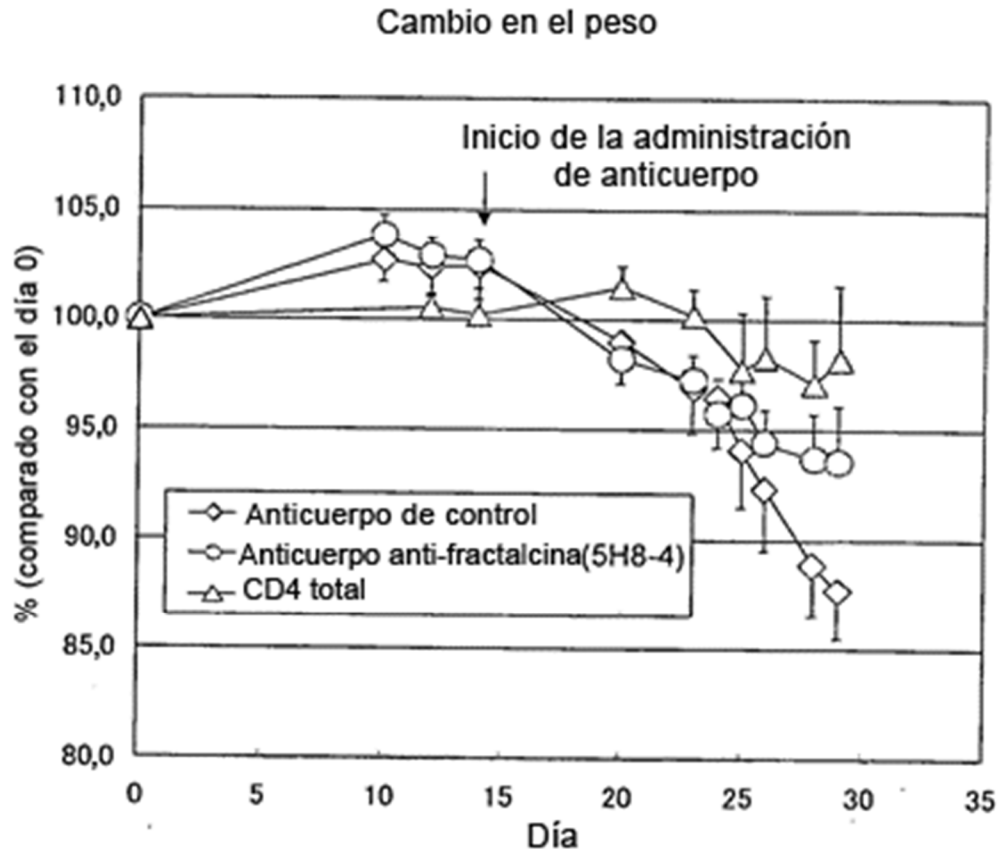


Fig. 1

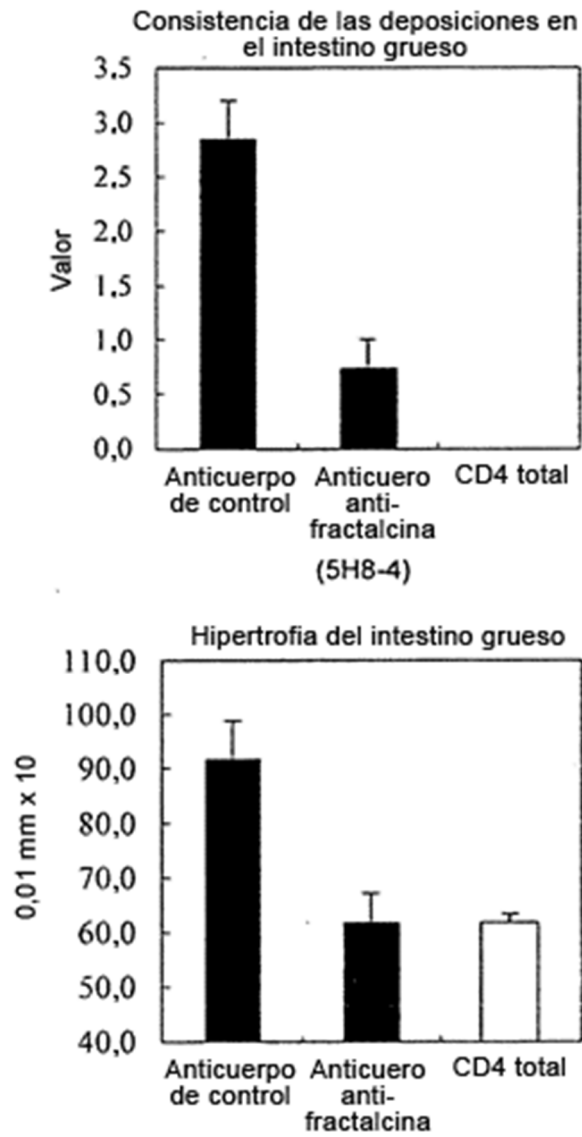
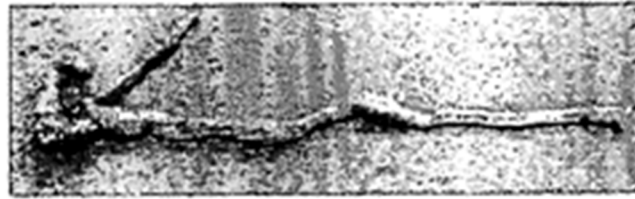
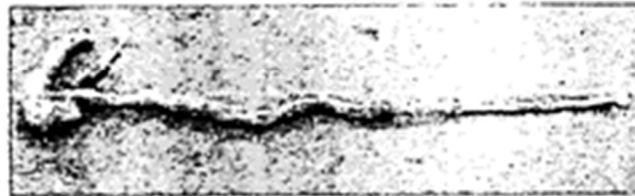


Fig. 2

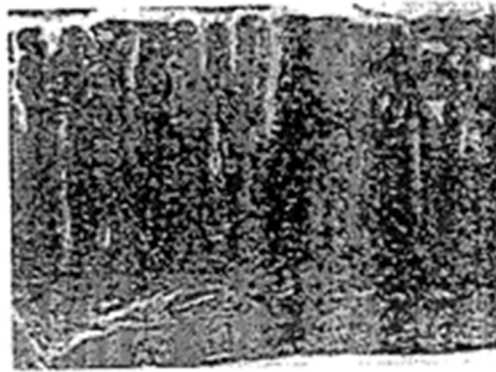


Anticuerpo de control



Anticuerpo anti-fractalina (5H8-4)

Fig. 3



Anticuerpo de control



Anticuerpo anti-fractalcina (5H8-4) x10

Fig. 4

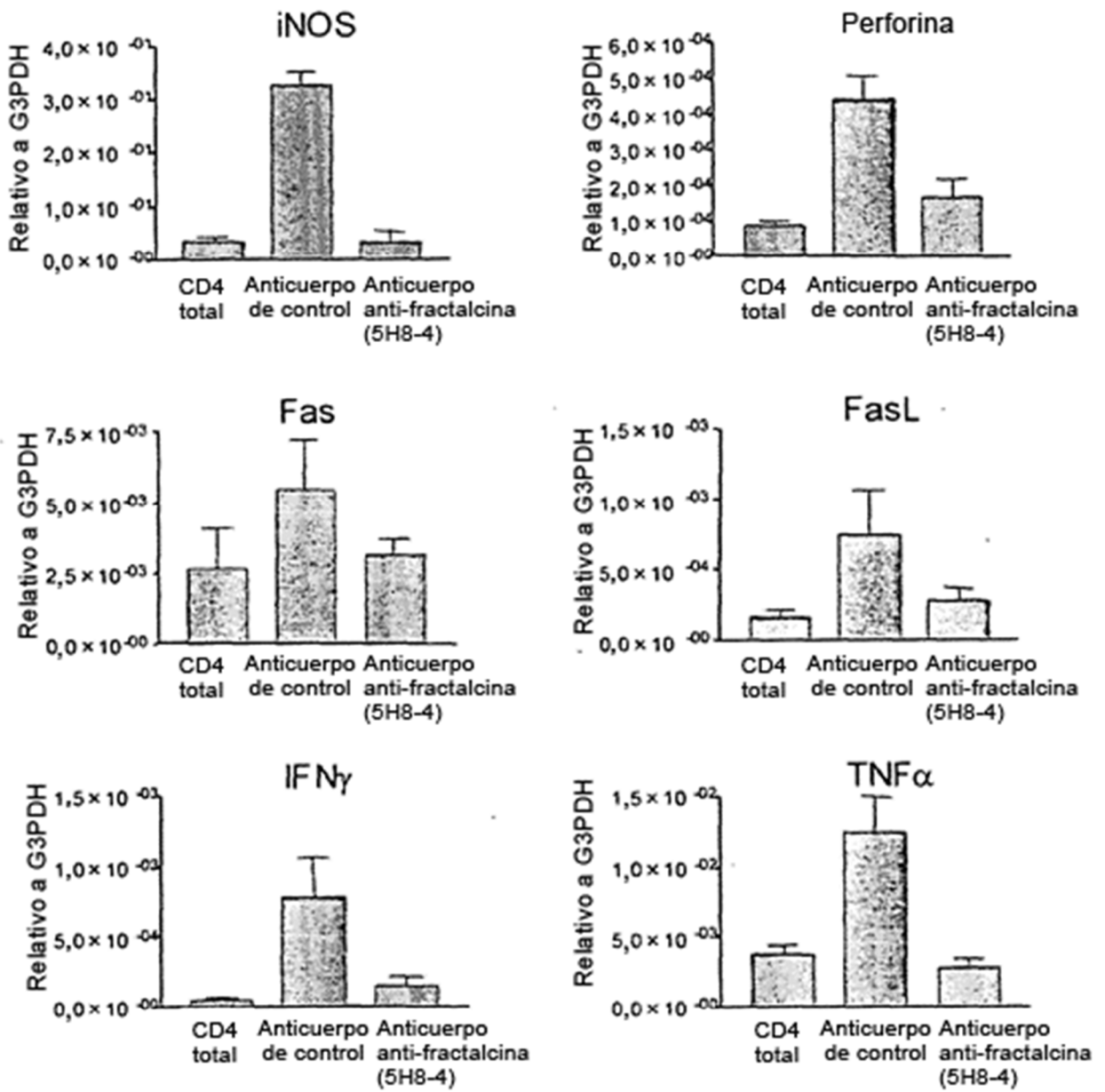


Fig. 5

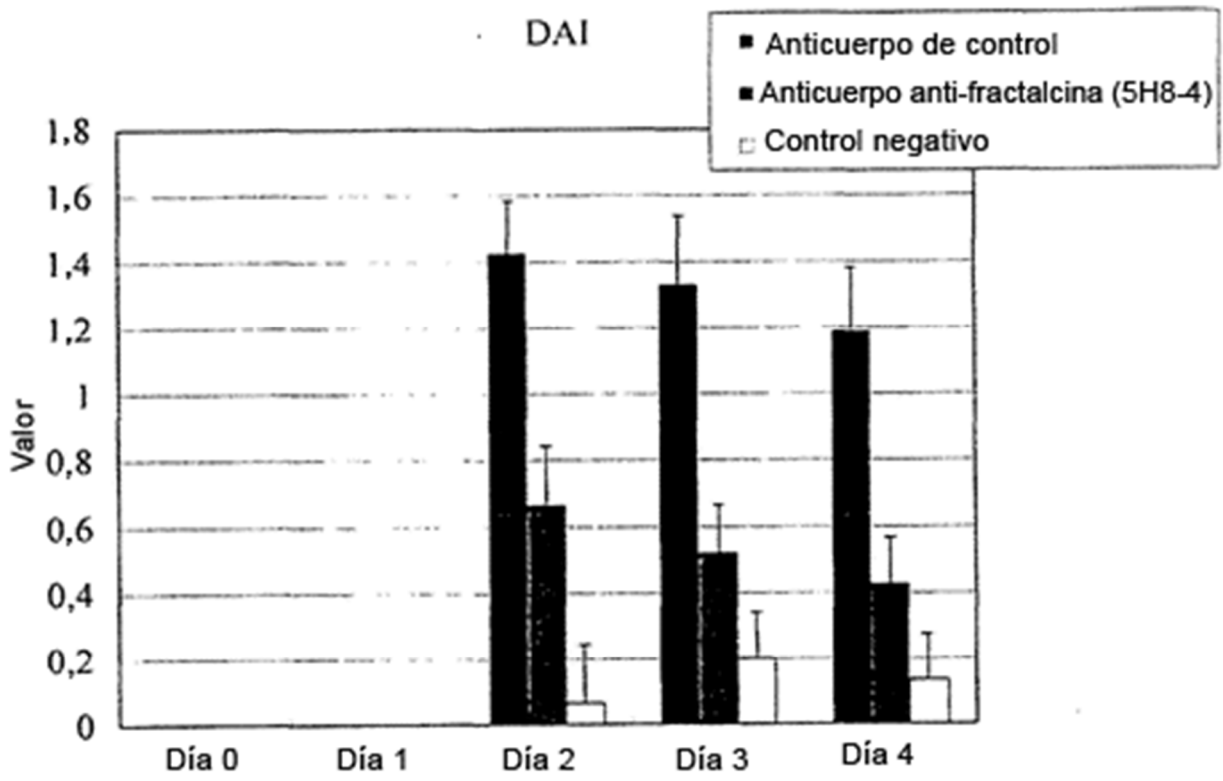


Fig. 6

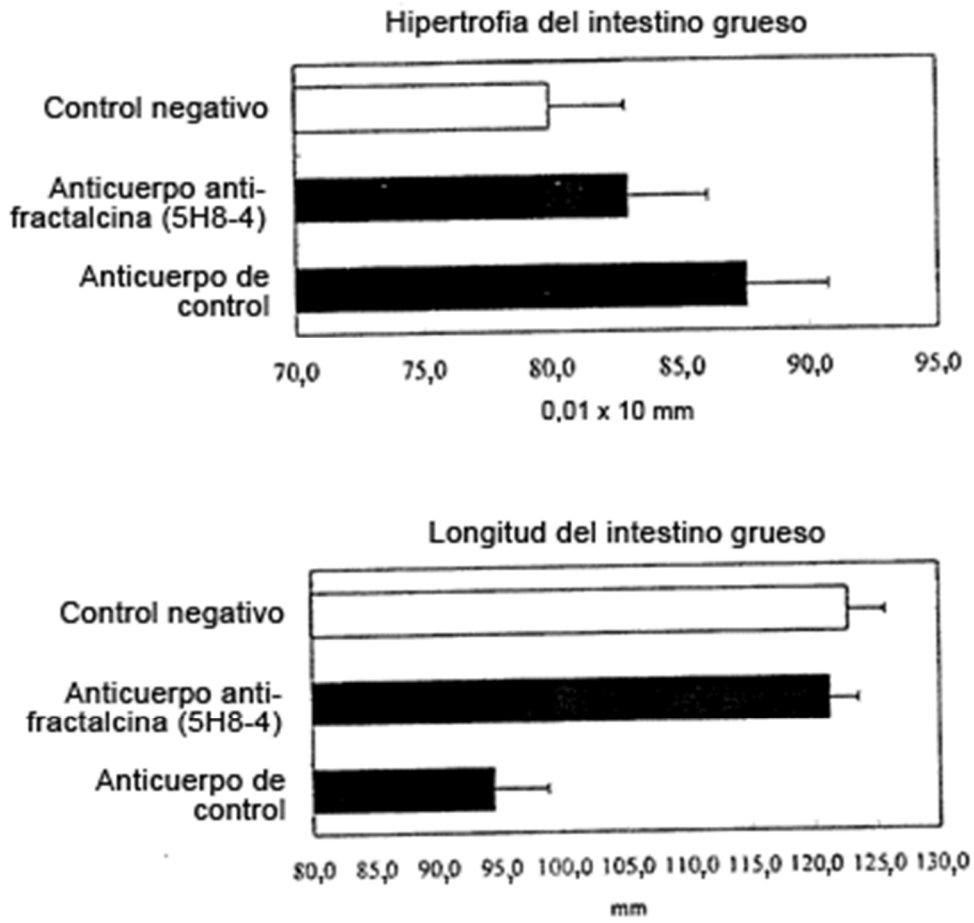
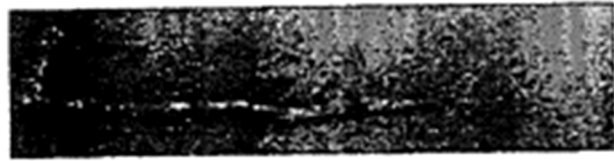


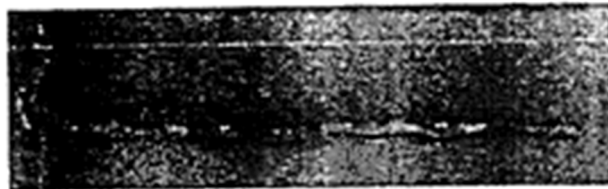
Fig. 7



Anticuerpo de control



Anticuerpo anti-fractalcina (5H8-4)



Control negativo

Fig. 8

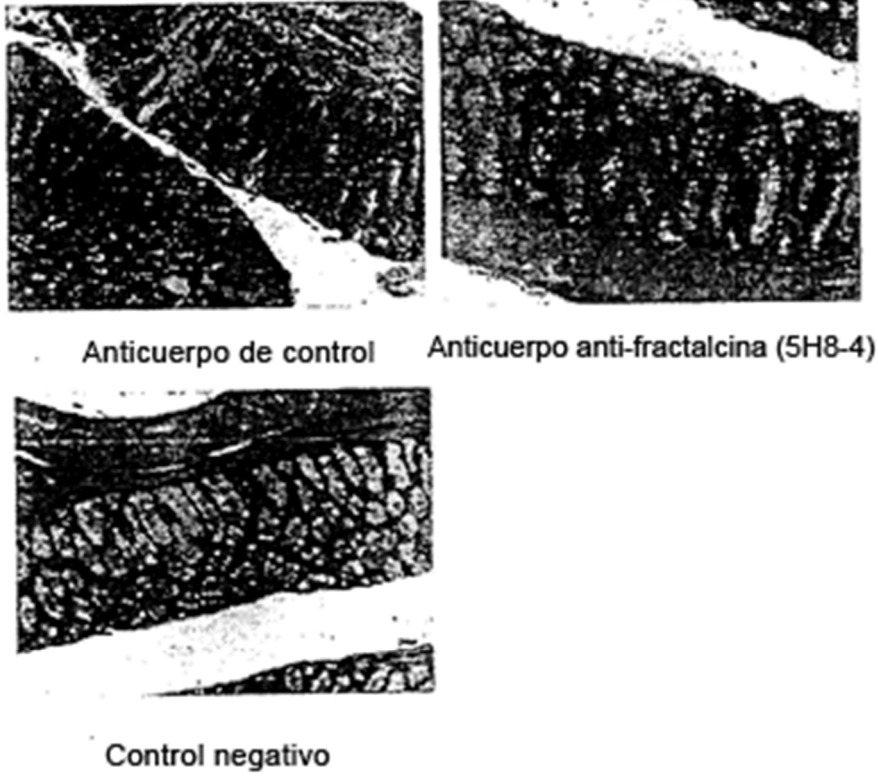


Fig. 9

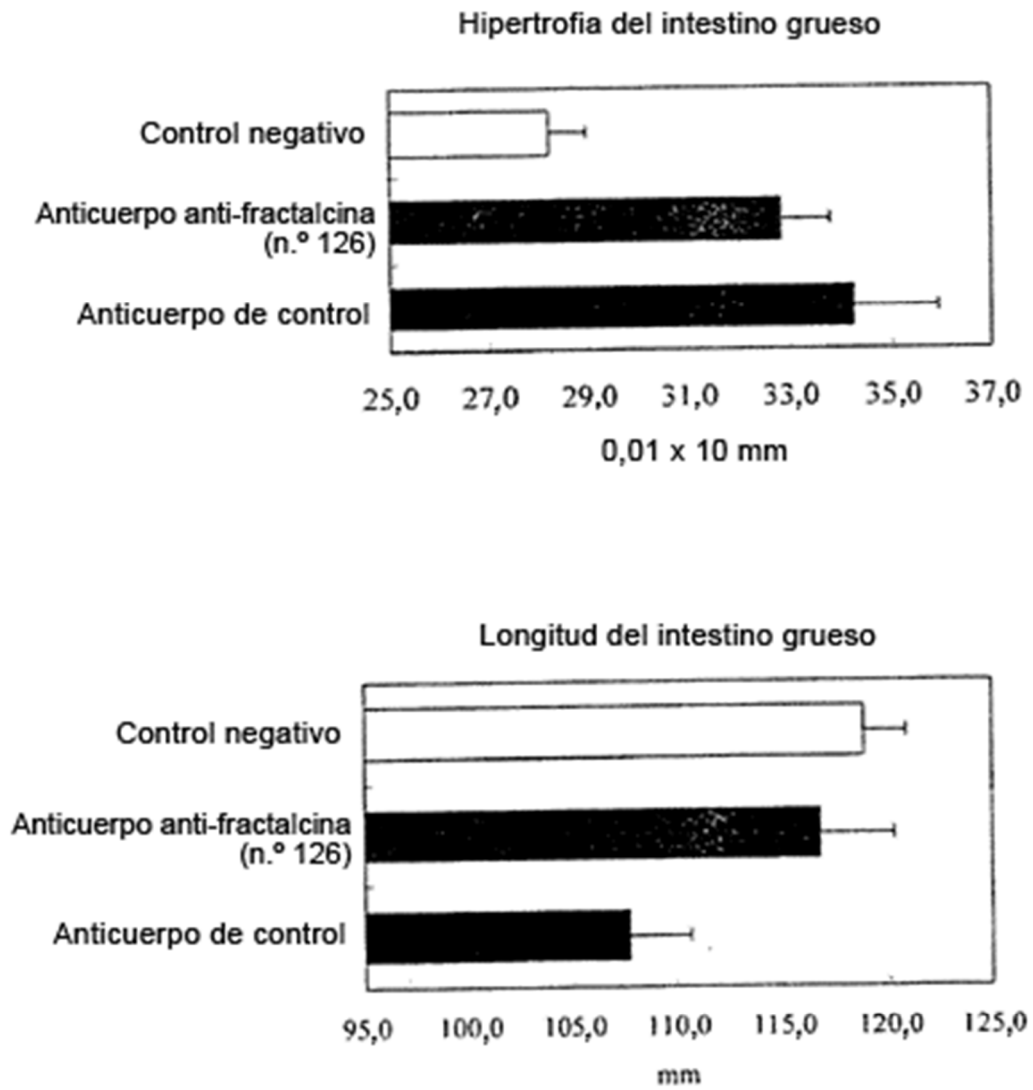


Fig. 10

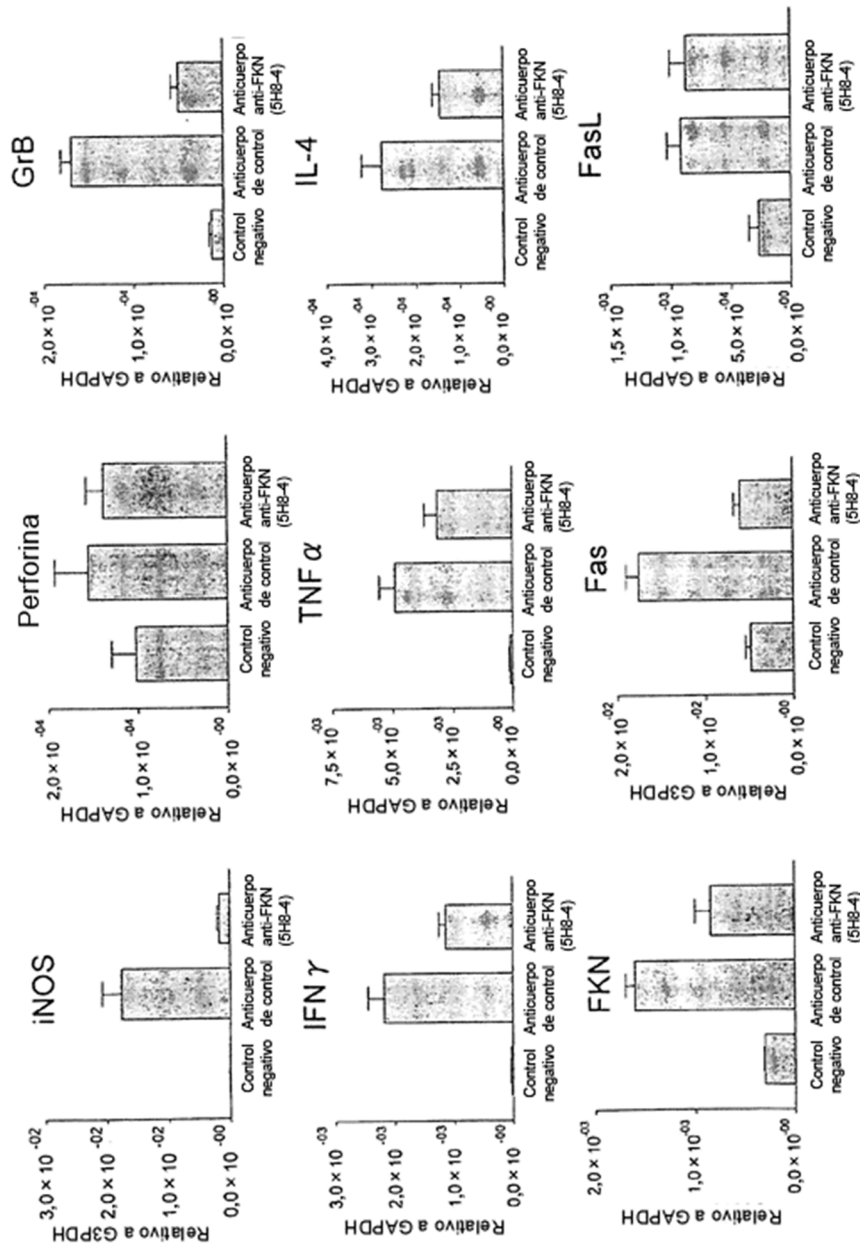


Fig. 11

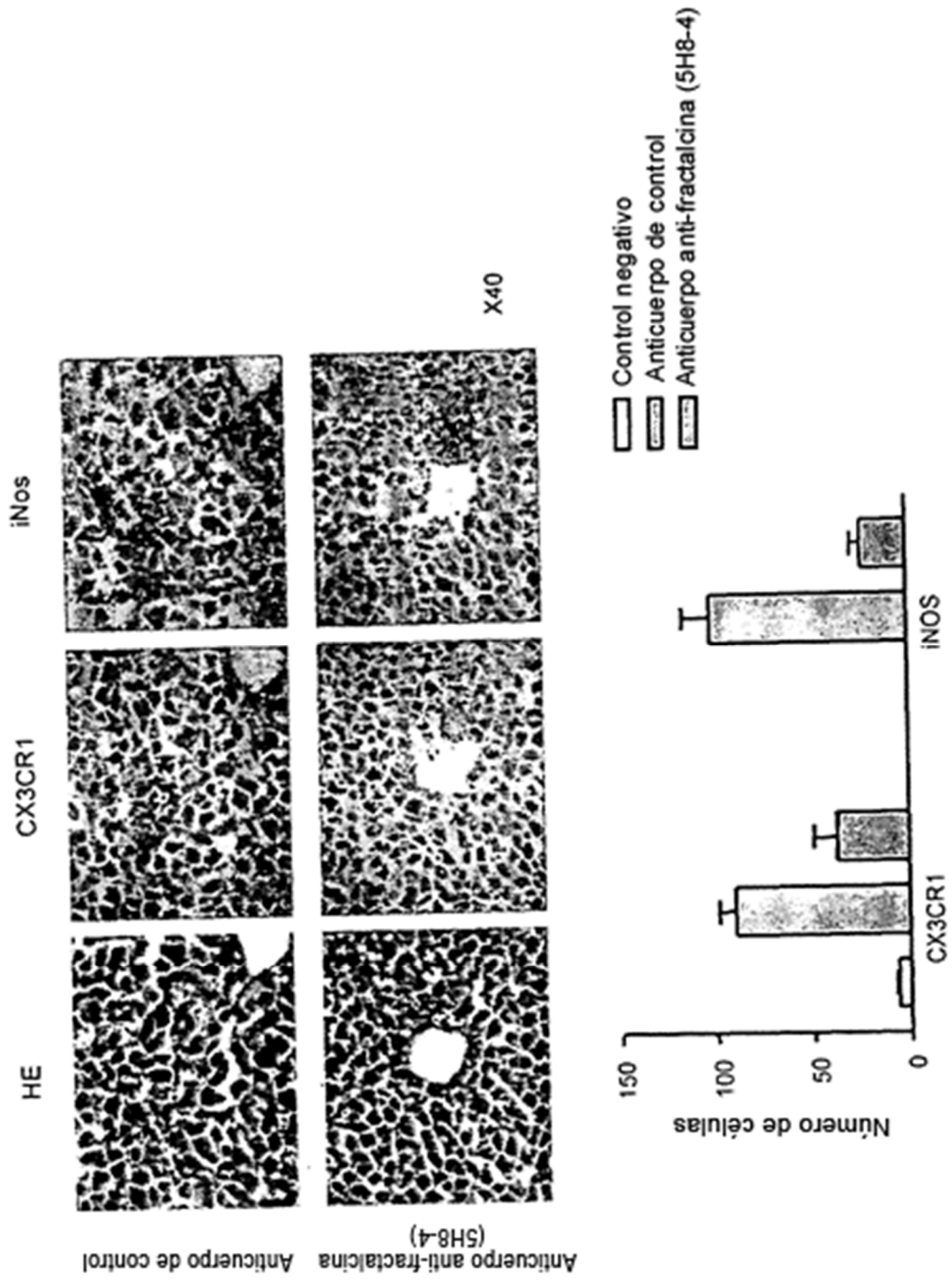


Fig. 12

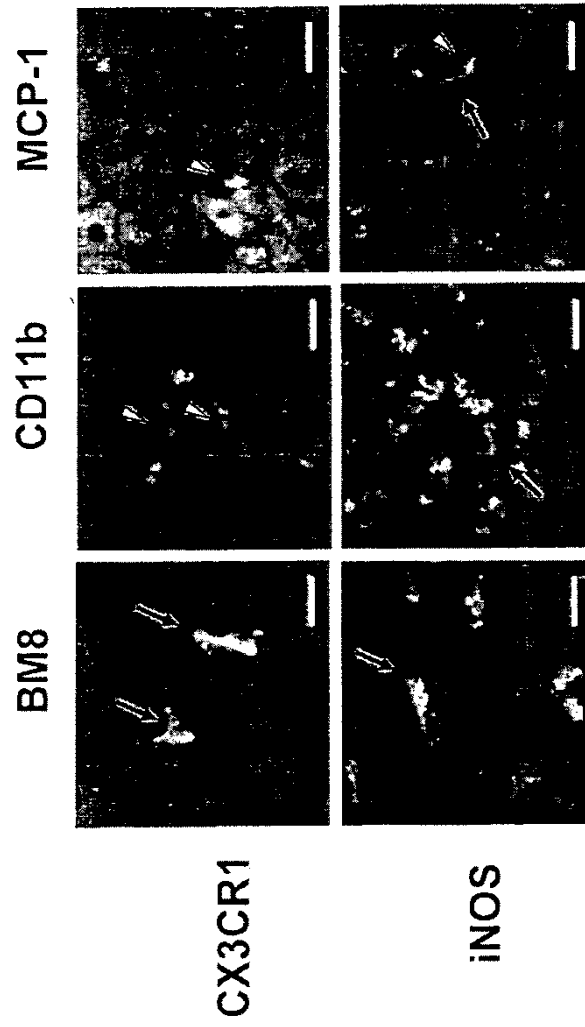
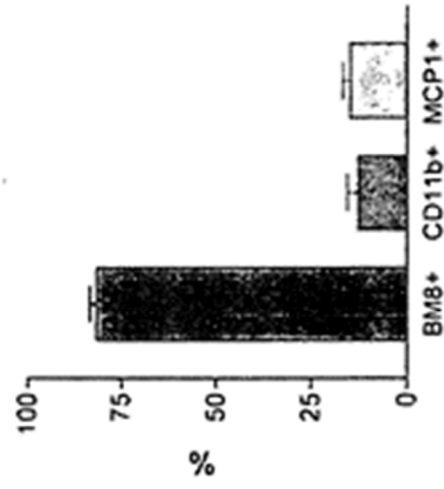
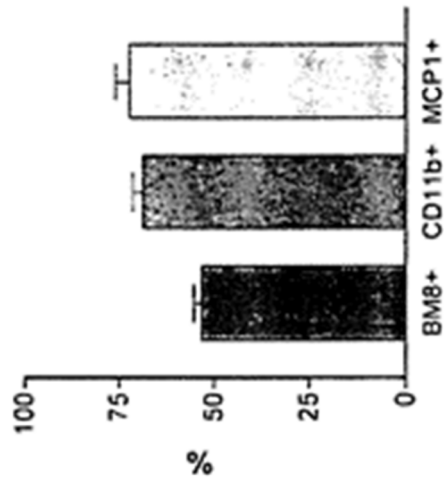


Fig. 13



Proporciones de células positivas a marcadores entre las células iNOS+



Proporciones de células positivas a marcadores entre las células CX3CR1+

Fig. 14

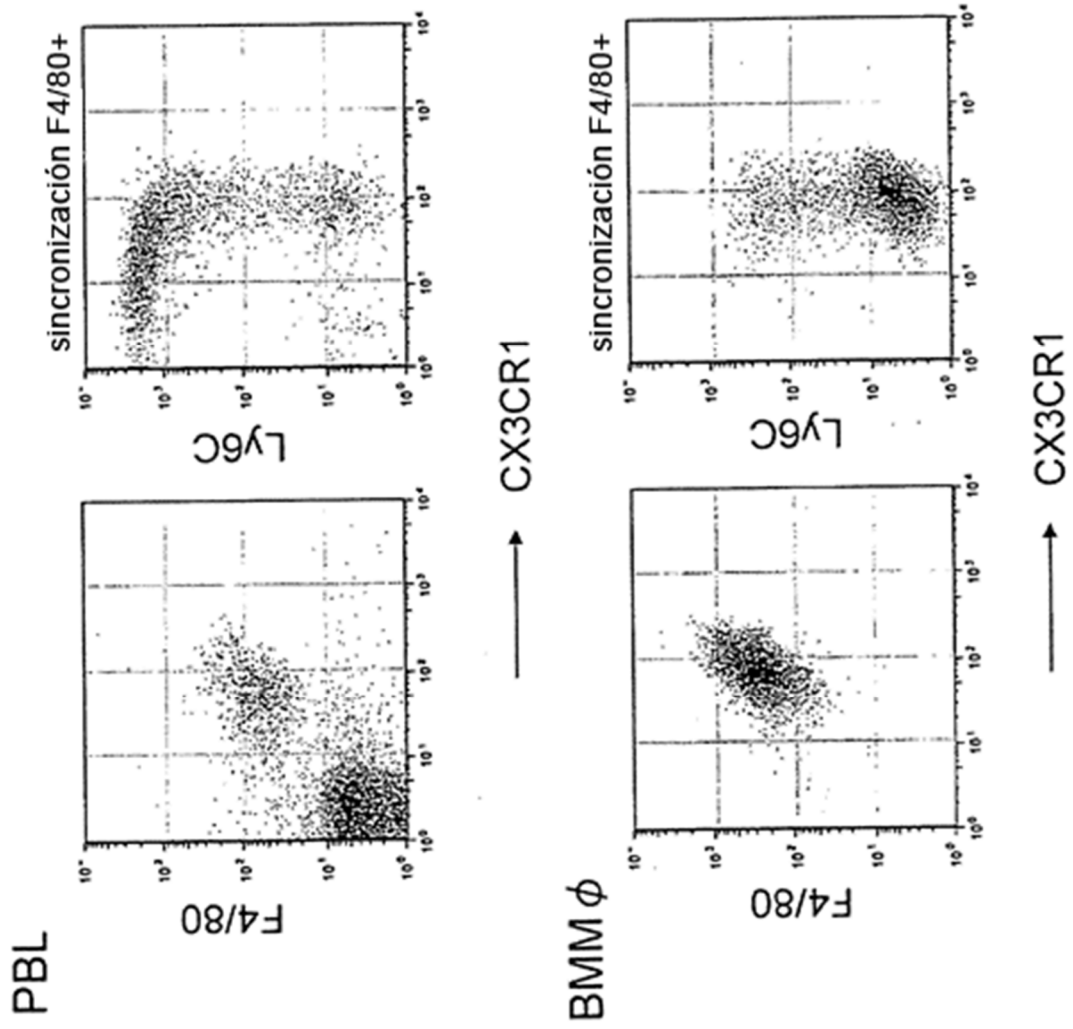


Fig. 15

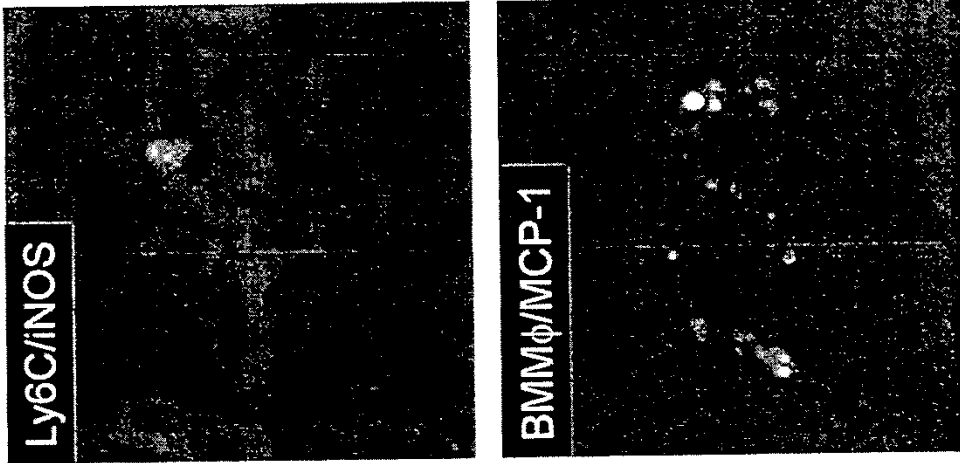


Fig. 16

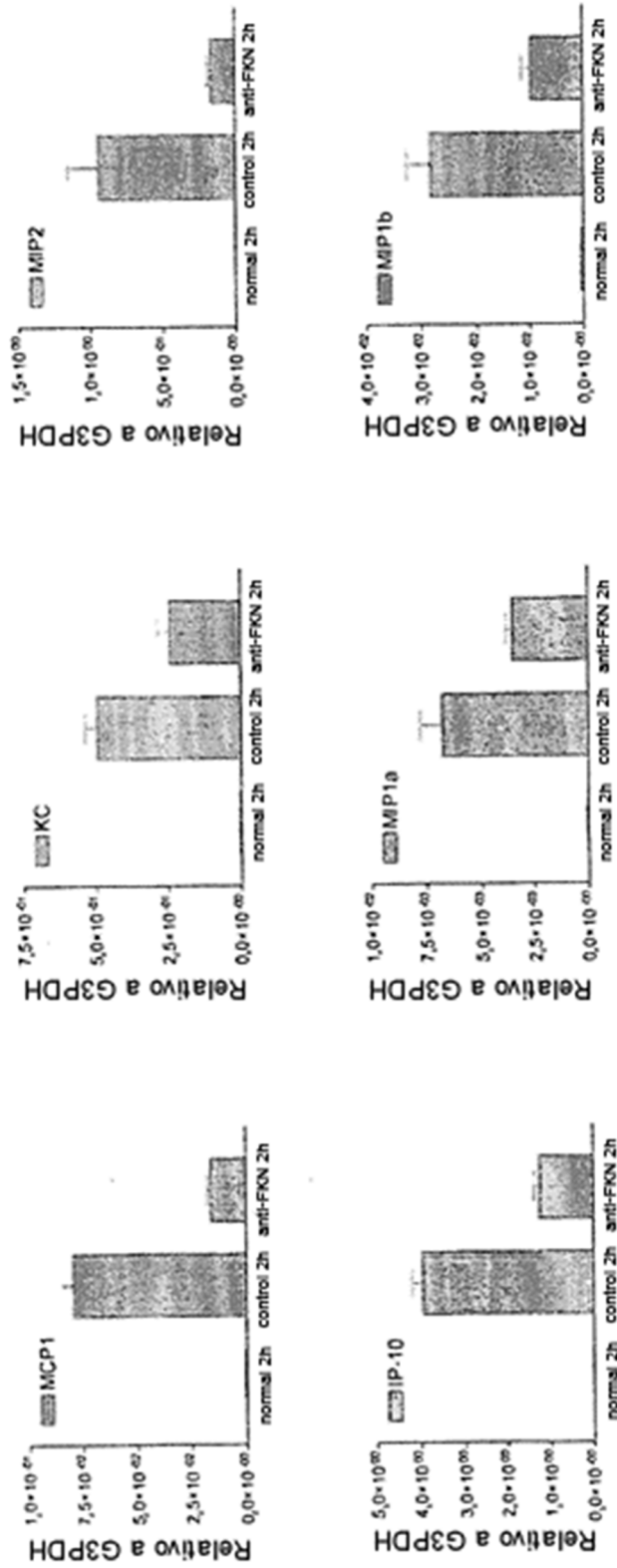


Fig. 17

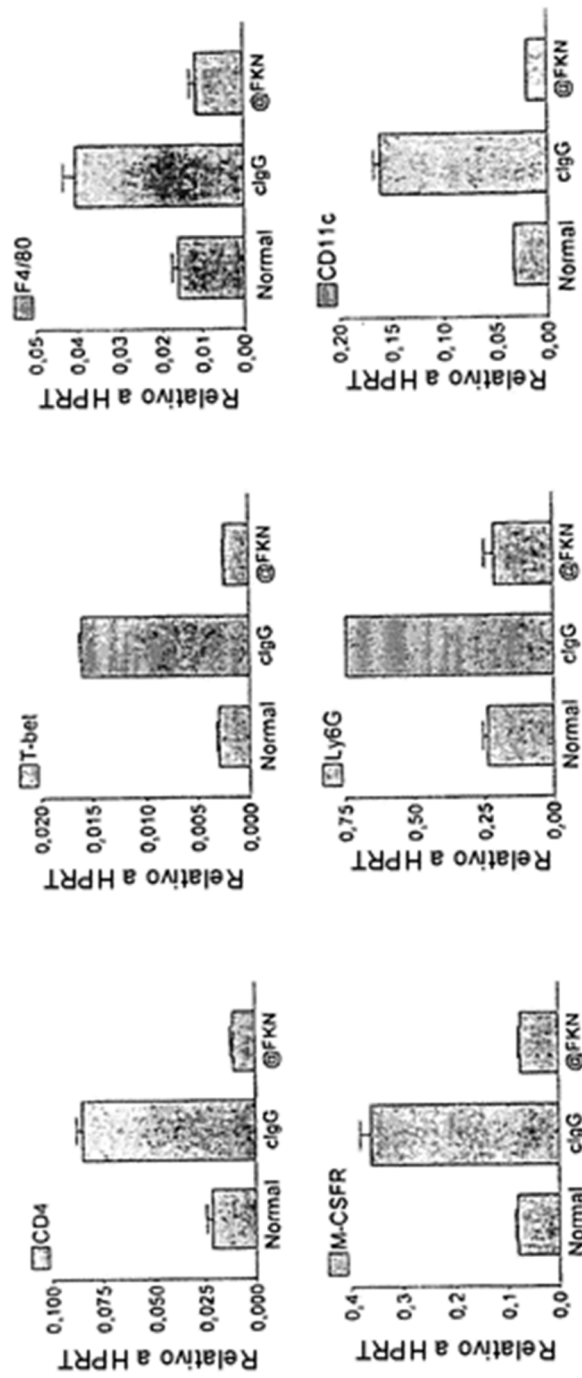


Fig. 18

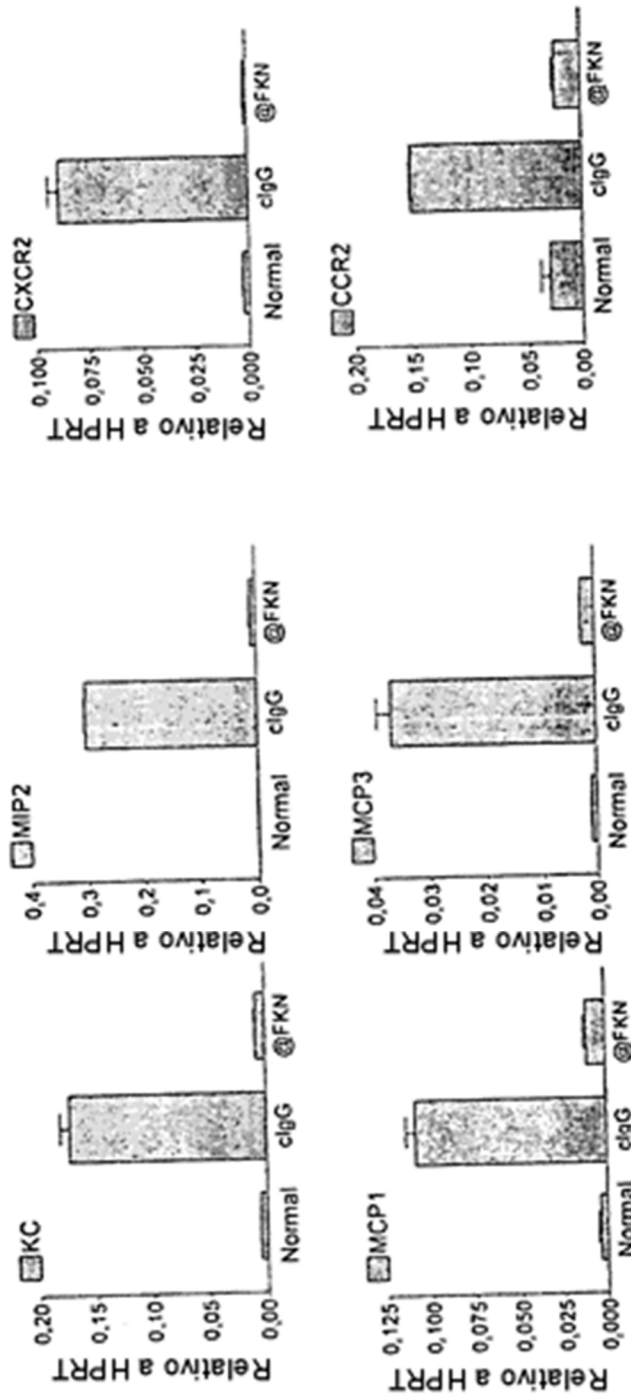


Fig. 19

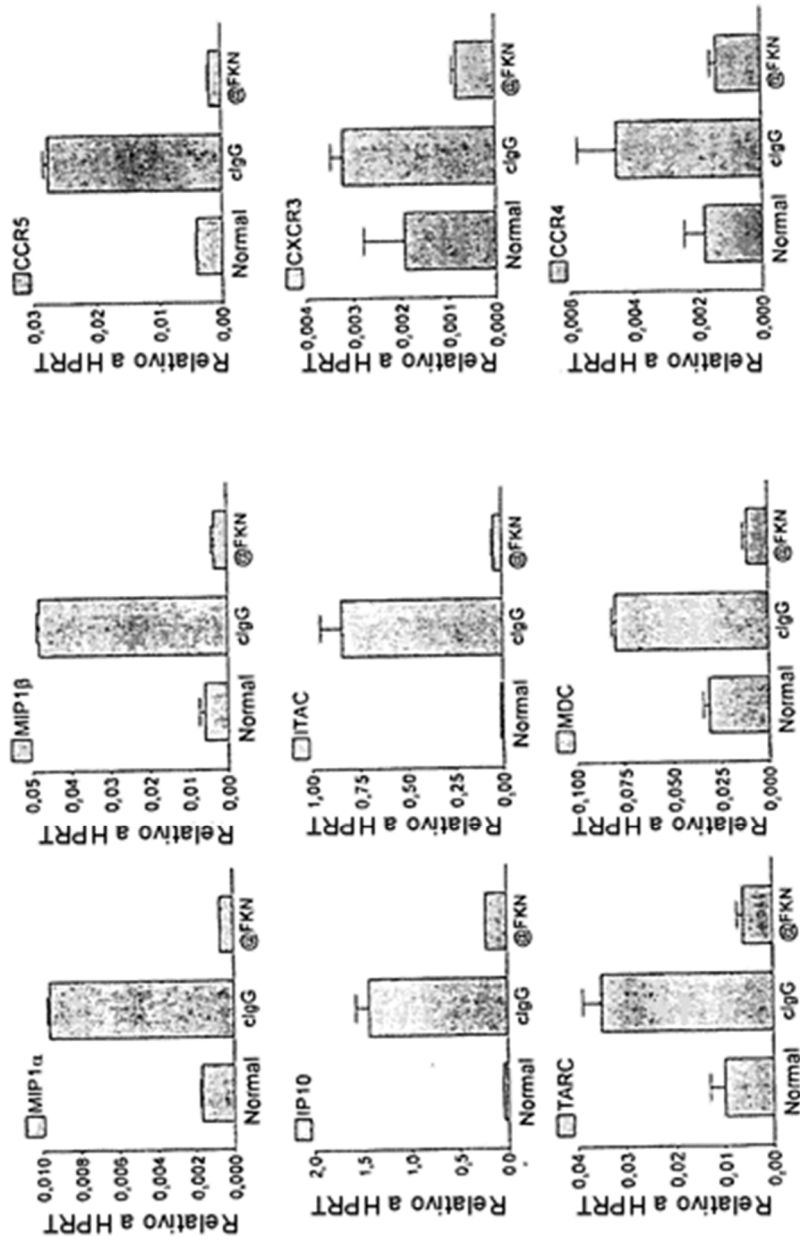


Fig. 20

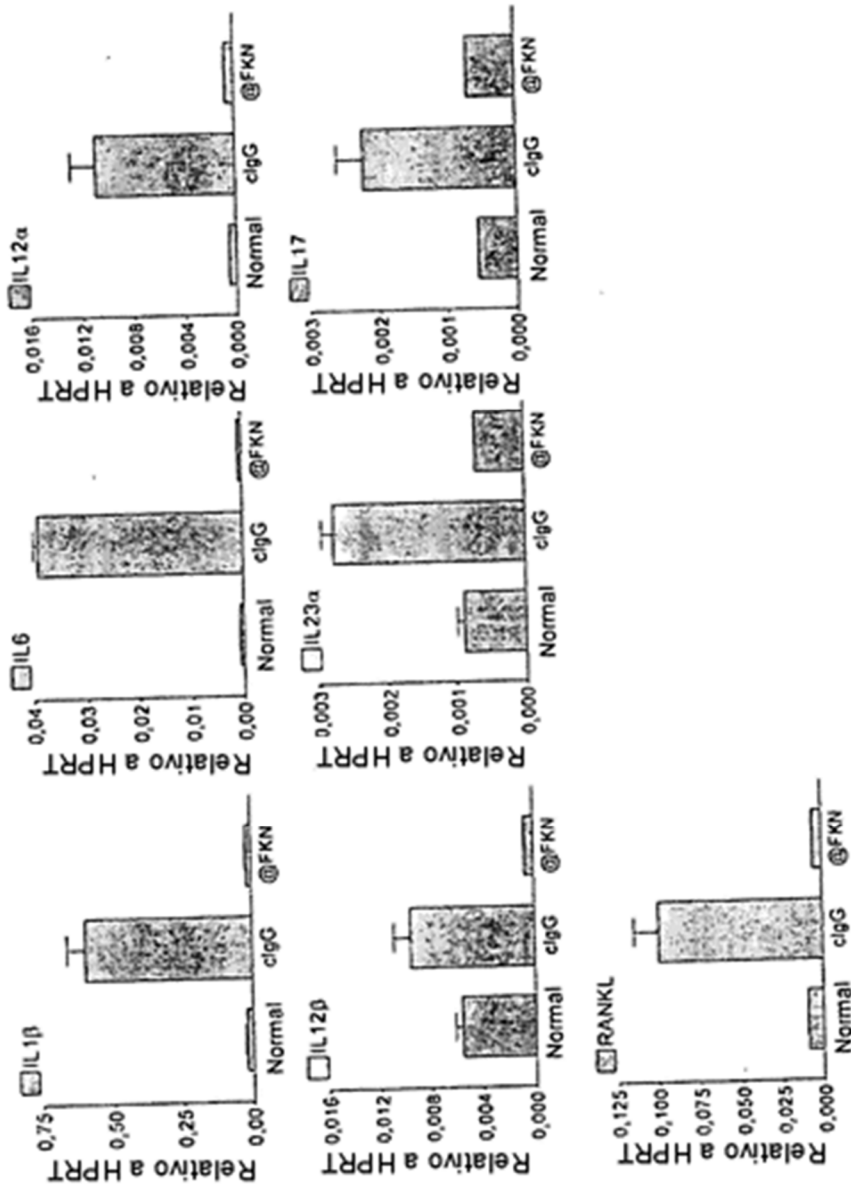


Fig. 21

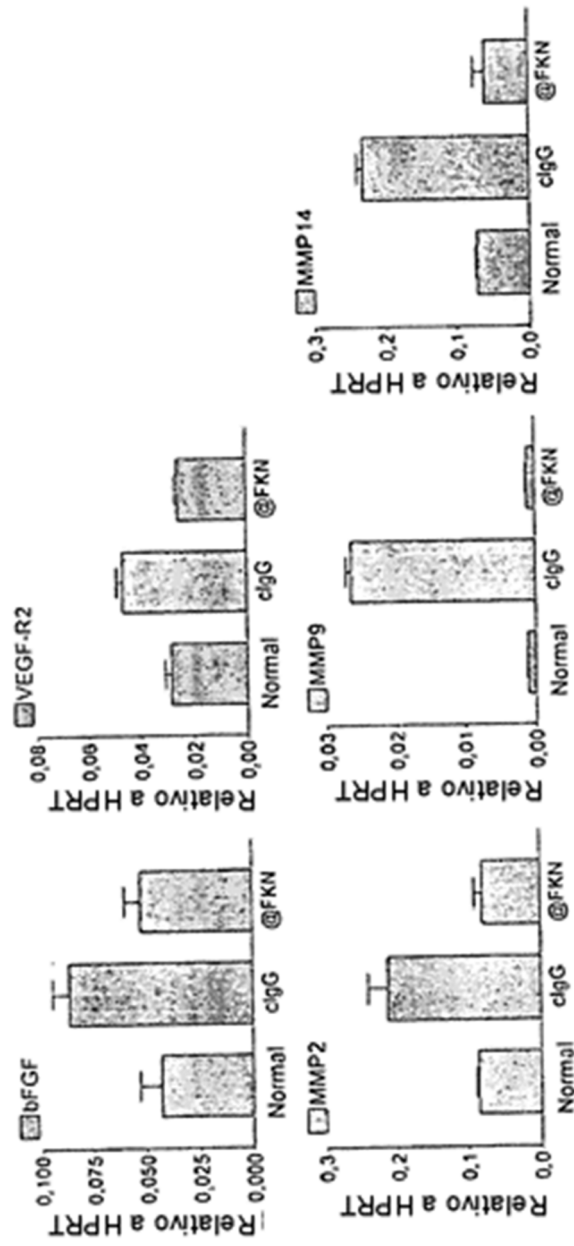


Fig. 22

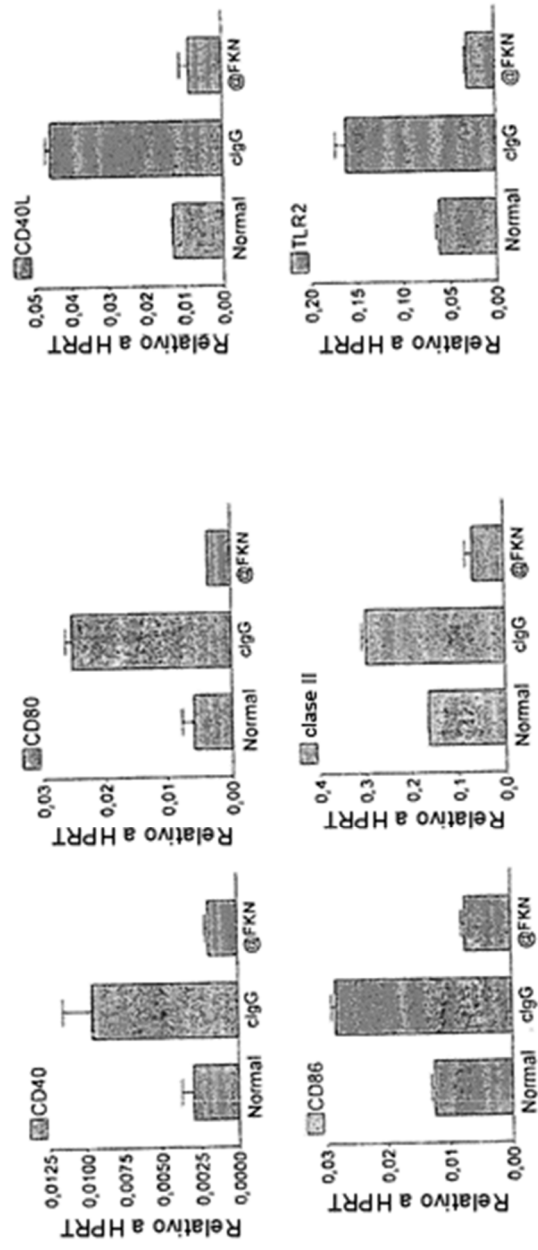


Fig. 23

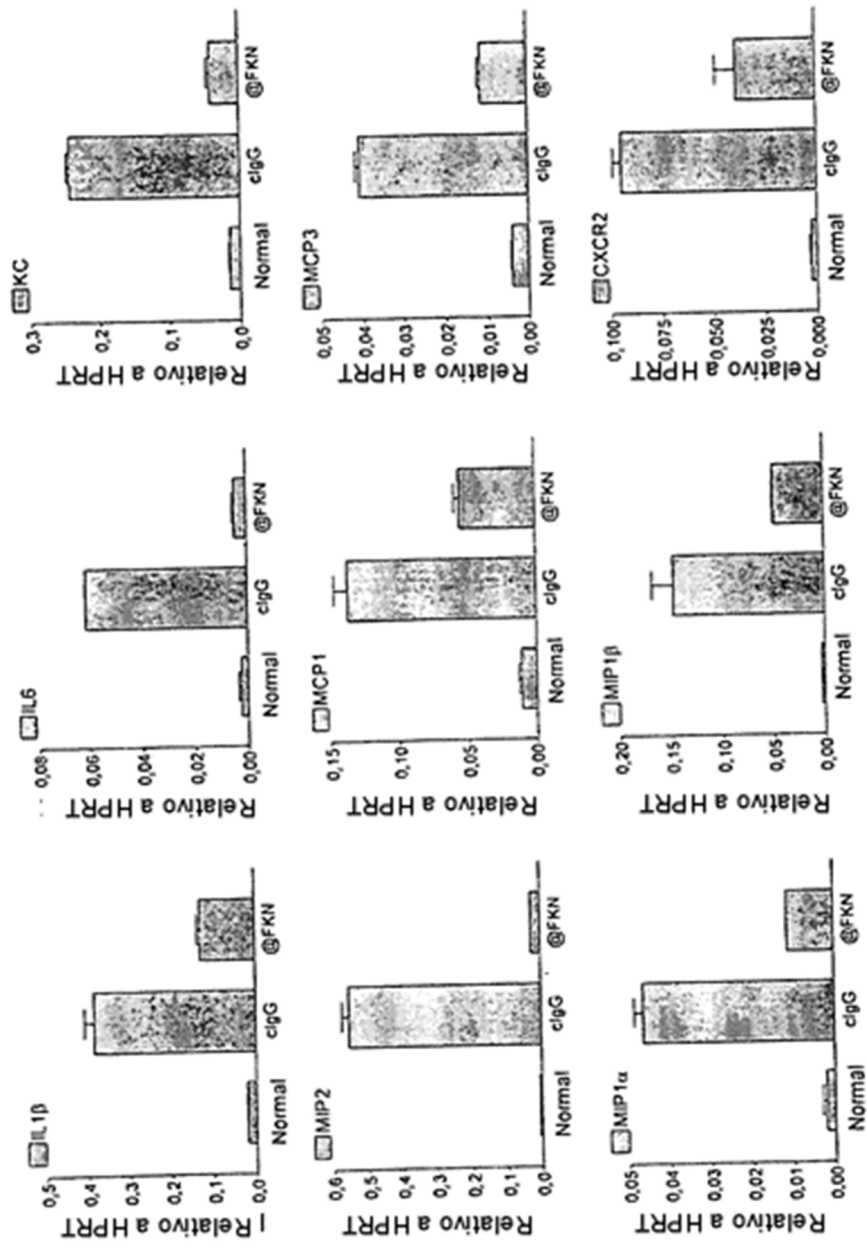


Fig. 24

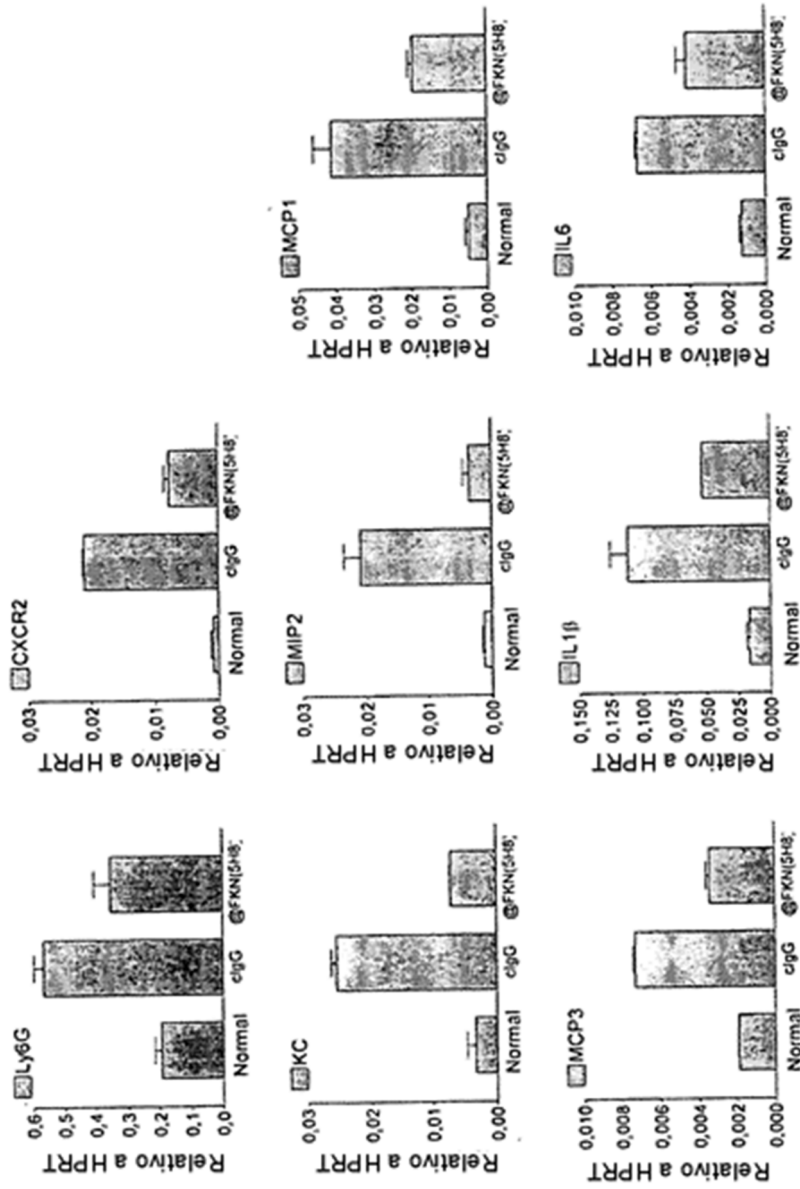


Fig. 25