

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 653 968**

51 Int. Cl.:

C12N 15/113 (2010.01)

C12Q 1/34 (2006.01)

A61K 31/713 (2006.01)

C12N 9/14 (2006.01)

A61P 29/00 (2006.01)

A61P 37/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.10.2011 PCT/EP2011/068675**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.05.2012 WO12055880**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.10.2011 E 11785351 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.10.2017 EP 2633050**

54 Título: **Procedimiento de tratamiento basado en inhibidores de ATAD2**

30 Prioridad:

27.10.2010 GB 201018147

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

09.02.2018

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**KRUIDENIER, LAURENS;
LEE, KEVIN;
TOUGH, DAVID, FRANCIS y
WILSON, DAVID, MATTHEW**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 653 968 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

Procedimiento de tratamiento basado en inhibidores de ATAD2

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a nuevos procedimientos de tratamiento. Más particularmente, la presente invención se refiere a procedimientos para el tratamiento o la prevención de enfermedades y afecciones autoinmunitarias e inflamatorias a través de la inhibición o modificación de la expresión o función de las proteínas que contienen bromodominio. En un aspecto adicional, la invención se refiere a un procedimiento para identificar agentes útiles en dichos procedimientos de tratamiento. La invención describe en particular el papel de determinadas proteínas que contienen bromodominio, en particular ADAD2, en estas enfermedades y afecciones y su uso como dianas terapéuticas y de cribado.

Antecedentes de la invención

15 La cromatina es la combinación compleja de ADN y proteína que forma los cromosomas. Se encuentra dentro de los núcleos de las células eucariotas y se divide en heterocromatina (condensada) y eucromatina (extendida). Son posibles numerosos estados de condensación diferentes y la rigidez de esta estructura varía durante el ciclo celular, siendo más compacta durante el procedimiento de división celular. Los componentes principales de la cromatina son el ADN y las proteínas. Las histonas son el componente proteico principal de la cromatina y actúan como carretes alrededor de los cuales se enrolla el ADN. Los bloques componentes básicos de la cromatina son los nucleosomas, cada uno de los cuales está compuesto por 146 pares de bases de ADN alrededor de un octámero de histona que consiste en 2 copias de cada H2A, H2B, H3 y H4. Las funciones de la cromatina son empaquetar el ADN en un volumen más pequeño para caber en la célula, para reforzar el ADN y permitir la mitosis y la meiosis, y para servir como mecanismo de control de la expresión y la replicación del ADN. La cromatina contiene material genético que sirve como instrucciones para dirigir las funciones celulares. Los genomas de los organismos eucarióticos están muy organizados dentro del núcleo de la célula. La estructura de la cromatina está controlada por una serie de modificaciones postraduccionales en proteínas histonas, principalmente las histonas H3 y H4, y más habitualmente dentro de las "colas de histonas" que se extienden más allá de la estructura del nucleosoma principal. Las colas de histonas tienden a estar libres para la interacción proteína-proteína y también son la parte de la histona más susceptible a la modificación postraducciona. Estas modificaciones incluyen acetilación, metilación, fosforilación, ubiquitinilación, SUMOilación. Estas marcas epigenéticas son escritas y borradas por enzimas específicas, que colocan las marcas en restos específicos dentro de la cola de histona, formando de este modo un código epigenético, que después la célula interpreta para permitir una regulación génica específica de la estructura de la cromatina y, de este modo, la transcripción.

20 De todas las clases de proteínas, las histonas están entre las más susceptibles a la modificación postraducciona. Las modificaciones de las histonas son dinámicas, ya que se pueden añadir o eliminar en respuesta a estímulos específicos y estas modificaciones dirigen los cambios estructurales a cromatina y las alteraciones en la transcripción génica. La acetilación de la lisina es una modificación de histona que forma una marca epigenética sobre la cromatina para que las proteínas que contienen bromodominio se anclen y, a su vez, reglen la expresión génica. Distintas clases de enzimas, a saber, las histona acetiltransferasas (HAT) y las histona desacetilasas (HDAC) acetilan o desacetilan restos de lisina específicos de las histonas (1).

25 Actualmente, el bromodominio es el único dominio proteico que se sabe que se une específicamente a los restos de lisina acetilados en las colas de las histonas. Los bromodominios, que tienen aproximadamente 110 aminoácidos de longitud, se encuentran en un gran número de proteínas asociadas a la cromatina y actualmente se han identificado en aproximadamente 70 proteínas humanas, a menudo adyacentes a otros motivos proteicos (2,3). Las proteínas que contienen un bromodominio pueden contener bromodominios adicionales, así como otros motivos funcionales. Por ejemplo, muchas HAT también contienen un bromodominio (2). Las interacciones entre los bromodominios y las histonas modificadas pueden ser un importante mecanismo subyacente a los cambios estructurales de la cromatina y la regulación génica. Las proteínas que contienen bromodominio están implicadas en procedimiento de enfermedades, incluyendo cáncer, inflamación y replicación viral. El desarrollo de inhibidores de los bromodominios es, por tanto, un medio atractivo para controlar la expresión génica y en la materia existe la necesidad de regular la unión del bromodominio a la lisina acetilada con el fin de controlar la expresión génica.

30 Los presentes inventores han identificado bromodominios implicados en la respuesta inflamatoria. Por tanto, la inhibición de estos bromodominios a través de la inhibición de la expresión y/o la función proporcionaría un nuevo abordaje al tratamiento de las enfermedades y afecciones autoinmunitarias e inflamatorias.

Sumario de la invención

35 Por tanto, en un aspecto se divulga un procedimiento de tratamiento de enfermedades y afecciones autoinmunitarias e inflamatorias que comprende inhibir una o más proteínas que contienen bromodominio en un mamífero.

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

unas proteínas que contienen bromodominio ATAD2.

En un aspecto adicional se divulga el uso de un inhibidor de la proteína que contiene bromodominio en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de enfermedades y afecciones autoinmunitarias e inflamatorias en un mamífero.

- 5 En un aspecto adicional, la presente invención proporciona el uso de un inhibidor de la proteína que contiene bromodominio ATAD2, en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de enfermedades y afecciones autoinmunitarias e inflamatorias.

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un inhibidor de la proteína que contiene bromodominio ATAD2 para su uso en el tratamiento de enfermedades y afecciones autoinmunitarias e inflamatorias.

- 10 En un aspecto adicional, se proporciona una formulación farmacéutica para su uso en el tratamiento de enfermedades y afecciones autoinmunitarias e inflamatorias, que comprende un inhibidor de la proteína que contiene bromodominio ATAD2, junto con al menos un vehículo farmacéutico.

En un aspecto adicional, se proporciona un procedimiento de cribado de un inhibidor de la proteína que contiene bromodominio ATAD2, en particular que comprende la etapa de determinar si el compuesto inhibe o la etapa de determinar si el compuesto activa la proteína que contiene bromodominio ATAD2.

15

Descripción de los dibujos

Figura 1. ARNip dirigidos a ATAD2 inhiben la producción de TNF- α por macrófagos humanos. Los macrófagos derivados de monocitos se transfectaron con: (1) 4 ARNip diferentes dirigidos a ATAD2; (2) un ARNip dirigido a TNF- α como control positivo, o; (3) un ARNip codificado (All stars) como control negativo. Los macrófagos transfectados se estimularon con las concentraciones indicadas de lipopolisacárido (LPS) y la cantidad de TNF- α presente en el medio 6 horas después se midió mediante MSD (los resultados se representaron como unidades de fluorescencia). Los resultados muestran que los cuatro ARNip contra ATAD2 inhiben la producción de TNF- α a un nivel similar al del control positivo (ARNip de TNF- α). Los datos representan las transfecciones realizadas por triplicado para cada ARNip y son la media \pm SD para tres donantes diferentes.

20

Figura 2. La expresión de la proteína ATAD2 está aumentada tras la activación de los linfocitos T. (A) Las células mononucleares de sangre periférica empobrecidas en monocitos se dejaron sin tratar (-) o se trataron con un estímulo de activación de linfocitos T, anti-CD3 + anti-CD28 (+) durante 24 horas. La expresión de la proteína ATAD2 se midió en los lisados de células totales mediante transferencia Western. Los datos se muestran para dos donantes independientes. **(B)** Los linfocitos T CD4⁺ purificados se sembraron en placas de 6 pocillos a 3×10^6 células por pocillo en 4 ml de medio y 10 ng/ml de IL-2. A continuación, las células se trataron con PMA (10 ng/ml) y 500 ng/ml de ionomicina; 2,5 μ g/ml de PHA-P; 2 μ g/ml de anti-CD3 libre y anti-CD3 (2 μ g/ml) más anti-CD28 (2 μ g/ml) durante 72 horas o se dejaron sin tratar. A continuación, se detectó la expresión de ATAD2 mediante transferencia Western y la expresión de la histona H3 se usó como control de carga.

25

30

Figura 3. Expresión de ARNm de ATAD2 en subpoblaciones de linfocitos B de amígdala humana. Se separaron los linfocitos B aislados de amígdalas humanas usando clasificación de células activada por fluorescencia en linfocitos B intactos (IgD+/CD38-/CD27-), linfocitos B del centro germinal (IgD-/CD38+/CD27- e IgD-/CD38+/CD27+) y linfocitos B de memoria clásicos (IgD-/CD38-/CD27+). El nivel del ARNm de ATAD2 se determinó mediante RT-PCR cuantitativa. Los datos mostrados son los valores medios de 7 donantes (\pm SEM).

35

Figura 4: Expresión de ATAD2 en tejido de amígdala. La expresión de ATAD2 en muestras incluidas en parafina fijadas en formalina se detectó usando un anti-ATAD2 policlonal de conejo y se visualizó con el cromógeno DAB (marrón) a un aumento de 10x (A) y un aumento de 40x (B).

40

Figura 5. Expresión de ATAD2 en artritis reumatoide (A), (B) colitis ulcerosa y (C) enfermedad de Crohn. La expresión de ATAD2 en muestras incluidas en parafina fijadas en formalina se detectó usando un anti-ATAD2 policlonal de conejo y se visualizó con el cromógeno DAB (marrón). Las secciones se sometieron a contratinción con hematoxilina. N=4-6 donantes por indicación de enfermedad. Se muestran las imágenes representativas.

45

Descripción detallada de la invención

Se han identificado y caracterizado varias proteínas que contienen bromodominio. Particularmente se mencionan las siguientes: -

ATAD2:

- 50 La secuencia de ácido nucleico del ARNm de ATAD2 humana se proporciona con el número de acceso NM_014109.3. La secuencia de aminoácidos de la proteína ATAD2 humana se proporciona con el número de acceso NP_054828.2.

Como se usa en el presente documento, el término "polipéptido" hace referencia a una cadena de aminoácidos que

incluye una proteína de longitud completa, oligopéptidos, péptidos cortos y fragmentos de los mismos, en el que los restos de aminoácidos están unidos por enlaces covalentes.

Como se usa en el presente documento, una "variante" es un polipéptido que comprende una secuencia, que difiere (por delección de un aminoácido, inserción de un aminoácido y/o sustitución de un aminoácido por un aminoácido diferente) en una o más posiciones de aminoácidos con respecto a la de una secuencia polipeptídica parental. La secuencia variante puede ser una secuencia de origen no natural, es decir, una secuencia que no se encuentra en la naturaleza.

Como se usa en el presente documento, la expresión "péptido sintético" hace referencia a un péptido, incluyendo un péptido corto, que se ha sintetizado *in vitro*. El término abarca además péptidos o péptidos cortos que se han modificado mediante sustitución con aminoácidos inusuales o no naturales.

Como se usa en el presente documento, "de origen natural", tal como se aplica a un objeto, se refiere al hecho de que el objeto se puede encontrar en la naturaleza distinto del producido artificialmente por el hombre.

Como se usa en el presente documento, un "fragmento" o "subsecuencia" se refiere a cualquier parte de una secuencia dada. Debe entenderse que un fragmento o subsecuencia de una secuencia será más corto que la propia secuencia en al menos un resto de aminoácido o uno de ácido nucleico. Por tanto, un fragmento o subsecuencia se refiere a una secuencia de aminoácidos o ácidos nucleicos que comprende una parte de una secuencia de aminoácidos más larga (por ejemplo, polipéptido).

Como se usa en el presente documento, la expresión "identidad de secuencia" indica una medida cuantitativa del grado de homología entre dos secuencias de aminoácidos o dos secuencias de ácidos nucleicos de igual longitud. Si las dos secuencias a comparar no son de igual longitud, deben alinearse para dar el mejor ajuste posible, permitiendo la inserción de huecos o, como alternativa, el truncamiento en los extremos de las secuencias de polipéptidos o secuencias de nucleótidos.

Como se usa en el presente documento, la expresión "molécula de ácido nucleico" se refiere a un oligómero o polímero de ácido ribonucleico (ARN) o ácido desoxirribonucleico (ADN) o miméticos de los mismos. Este término incluye moléculas compuestas por bases nucleotídicas de origen natural, azúcares y enlaces internucleosídicos covalentes (traseros) que funcional de forma similar o combinaciones de los mismos.

Como se usa en el presente documento, una "secuencia polinucleotídica" (por ejemplo, un ácido nucleico, polinucleótido, oligonucleótido, etc.) es un polímero de nucleótidos que comprende los nucleótidos A, C, T U, G u otros nucleótidos de origen natural o análogos de nucleótidos artificiales o una hebra de caracteres que representa un ácido nucleico, dependiendo del contexto. El ácido nucleico dado o el ácido nucleico complementario se puede determinar a partir de cualquier secuencia polinucleotídica especificada.

Tal como se usa en el presente documento, el término "inhibidor puede ser cualquier compuesto o tratamiento capaz de inhibir la expresión y/o función de la proteína que contiene bromodominio, es decir, cualquier compuesto o tratamiento que inhibe la transcripción del gen, maduración de ARN, traducción de ARN, modificación postraducciona de la proteína, unión de la proteína a una diana de lisina acetilada y similares. Por tanto, "inhibir la proteína que contiene bromodominio ATAD2" incluye inhibir la expresión y/o la función de la proteína de bromodominio ATAD2.

El inhibidor puede ser de naturaleza y origen variados, incluyendo origen natural [por ejemplo, vegetal, animal, eucariótico, bacteriano, vírico] o sintético [en particular, una molécula orgánica, inorgánica, sintética o semisintética]. Por ejemplo, puede ser un ácido nucleico, un polipéptido, una proteína, un péptido o un compuesto químico. En un aspecto, el inhibidor es selectivo de una proteína que contiene bromodominio concreta sin actividad contra otras proteínas que contienen bromodominio.

En un aspecto, el inhibidor es un ácido nucleico antisentido capaz de inhibir la transcripción de las proteínas que contienen bromodominio o la traducción del correspondiente ARN mensajero. El ácido nucleico antisentido puede comprender todo o parte de la secuencia de las proteínas que contienen bromodominio o de una secuencia que es complementaria a la misma. La secuencia antisentido puede ser un ADN, un ARN (por ejemplo, ARNip), una ribozima, etc. Puede ser bicatenario o monocatenario. También puede ser un ARN codificado por un gen antisentido. Cuando se está usando un ácido nucleico antisentido que comprende parte de la secuencia del gen o ARN mensajero en consideración, es preferente usar una parte que comprende al menos 10 bases consecutivas de la secuencia, más preferentemente al menos 15, con el fin de garantizar la hibridación específica. En el caso de un oligonucleótido antisentido, normalmente comprende menos de 100 bases, por ejemplo del orden de 10 a 50 bases. Este oligonucleótido se puede modificar para mejorar su estabilidad, su resistencia a las nucleasas, su penetración celular, etc. No se requiere una complementariedad perfecta entre la secuencia de la molécula antisentido y la del gen o ARN mensajero diana, pero generalmente es preferente.

De acuerdo con otra realización, el compuesto inhibidor es un polipéptido. Puede ser, por ejemplo, un péptido que comprende una región de la proteína que contiene bromodominio y capaz de antagonizar su actividad. Un péptido comprende, ventajosamente, de 5 a 50 aminoácidos consecutivos de la secuencia primaria de la proteína que

- contiene bromodominio en consideración, normalmente de 7 a 40. El polipéptido también puede ser un anticuerpo contra la proteína que contiene bromodominio o un fragmento o derivado de dicho anticuerpo, por ejemplo un fragmentos Fab, una región CDR o, más preferentemente, un anticuerpo de una sola cadena (por ejemplo, ScFv). Los anticuerpos de cadena sencilla son particularmente ventajosos en cuanto a que pueden actuar de una forma
- 5 específica e intracelular para modular la actividad de una proteína diana. Dichos anticuerpos, fragmentos o derivados se pueden producir mediante técnicas convencionales que comprenden inmunizar a un animal y recuperar el suero (policlonal) o las células de bazo (con el fin de producir hibridomas mediante fusión con las líneas celulares adecuadas).
- Los procedimientos para producir anticuerpos policlonales en varias especies se describen en la técnica anterior.
- 10 Típicamente, el antígeno se combina con un adyuvante (por ejemplo, adyuvante de Freund) y se administra a un animal, normalmente por inyección subcutánea. Se pueden realizar varias inyecciones. Se recogen muestras de sangre y se separa la inmunoglobulina o el suero. Los procedimientos convencionales para producir anticuerpos monoclonales comprenden inmunizar a un animal con un antígeno, seguido de la recuperación de células del bazo, que después se fusionan con células inmortalizadas, tales como células de mieloma. Los hibridomas resultantes
- 15 producen anticuerpos monoclonales y se pueden seleccionar mediante dilución límite con el fin de aislar clones individuales. Se pueden producir fragmentos Fab o F(ab')₂ mediante digestión con proteasa, conforme a técnicas convencionales.
- De acuerdo con otra realización, el inhibidor es un compuesto químico, de origen natural o sintético, en particular una molécula orgánica o inorgánica, capaz de modular la expresión o la actividad de la proteína que contiene
- 20 bromodominio. En una realización particular, el inhibidor es una molécula pequeña.
- Tal como se usa en el presente documento, "cantidad eficaz" significa la cantidad de un fármaco o agente farmacéutico que provocará la respuesta biológica o médica de un tejido, sistema, animal o ser humano que es buscada, por ejemplo, por un investigador o clínico. Además, la expresión "cantidad terapéutica" significa cualquier
- 25 cantidad que, en comparación con un sujeto correspondiente que no ha recibido dicha cantidad, tiene como resultado un tratamiento mejorado, curación, prevención o mejoría de una enfermedad, trastorno o efecto secundario, o una disminución de la velocidad de avance de una enfermedad o trastorno. La expresión también incluye dentro de su alcance cantidades eficaces para potenciar la función fisiológica normal. "Terapia" y "tratamiento" puede incluir tratamiento y/o profilaxis.
- Aunque es posible que, para su uso en terapia, el inhibidor se pueda administrar como el compuesto químico en
- 30 bruto, es posible presentar el principio activo como una composición farmacéutica. En consecuencia, la invención proporciona además composiciones farmacéuticas que comprenden un agente que inhibe una o más proteínas que contienen bromodominio, en particular ATAD2, y uno o más vehículos, diluyentes o excipientes farmacéuticamente aceptables. El o los vehículos, diluyente(s), o excipiente(s) deben ser aceptables en el sentido de que sean compatibles con los otros ingredientes de la composición y no deletéreos para el receptor de los mismos. De
- 35 acuerdo con otro aspecto de la invención se proporciona también un procedimiento para la preparación de una composición farmacéutica que incluye el agente o sales farmacéuticamente aceptables del mismo, con uno o más vehículos, diluyentes o excipientes farmacéuticamente aceptables. La composición farmacéutica puede ser para usar en el tratamiento y/o profilaxis de cualquiera de las afecciones descritas en el presente documento.
- Las composiciones farmacéuticas se pueden presentar en formas de dosis unitaria que contiene una cantidad
- 40 predeterminada de principio activo por dosis unitaria. Las composiciones de dosificación unitaria preferidas son las que contienen una dosis o subdosis diaria, o una fracción apropiada de las mismas, de un principio activo. Por consiguiente, dichas dosis unitarias se pueden administrar una vez o más de una vez al día. Dichas composiciones farmacéuticas pueden prepararse mediante cualquiera de los procedimientos bien conocidos en la técnica de farmacia.
- 45 Las composiciones farmacéuticas se pueden adaptar para administrar mediante cualquier vía adecuada, por ejemplo por vía oral (incluyendo bucal o sublingual), rectal, inhalación, intranasal, tópica (incluyendo bucal, sublingual o transdérmica), vaginal o parenteral (incluyendo la subcutánea, intramuscular, intravenosa o intradérmica). Dichas composiciones pueden prepararse mediante cualquiera de los procedimientos conocidos en la técnica de farmacia, por ejemplo, poniendo en contacto el principio activo con el(los) vehículo(s) o excipiente(s).
- 50 Las composiciones farmacéuticas adaptadas para la administración oral se pueden presentar como unidades discretas, tales como cápsulas o comprimidos; polvos o gránulos; soluciones o suspensiones en líquidos acuosos o no acuosos; espumas o cremas comestibles; o emulsiones líquidas de aceite en agua o emulsiones líquidas de agua en aceite.
- Por ejemplo, para la administración oral en forma de un comprimido o una cápsula, el componente farmacológico
- 55 activo se puede combinar con un vehículo oral inerte no tóxico farmacéuticamente aceptable tal como etanol, glicerol, agua y similares. Los polvos se preparan reduciendo el compuesto hasta un tamaño fino adecuado y mezclando con un vehículo farmacéutico preparado de forma similar, tal como un carbohidrato comestible, tales como, por ejemplo, almidón o manitol. También puede estar presente un agente saborizante, conservante, dispersante y colorante.

Las cápsulas se fabrican preparando una mezcla de polvo, como se ha descrito anteriormente y llenando las cubiertas de gelatina formadas. Se pueden añadir agentes deslizantes y lubricantes tales como sílice coloidal, talco, estearato de magnesio, estearato de calcio, o polietilenglicol sólido a la mezcla en polvo antes de la operación de carga. Un agente disgregante o solubilizante tal como agar-agar, carbonato de calcio, o carbonato de sodio puede también añadirse para incrementar la disponibilidad del medicamento cuando la cápsula es ingerida.

Además, cuando se desee o sea necesario, se pueden añadir a la mezcla aglutinantes, emolientes, lubricantes, agentes edulcorantes, aromatizantes, agentes disgregantes y agentes colorantes. Los aglutinantes adecuados incluyen almidón, gelatina, azúcares naturales tales como glucosa o beta-lactosa, edulcorantes de maíz, gomas naturales y sintéticas tales como goma arábiga, de tragacanto o alginato de sodio, carboximetilcelulosa, polietilenglicol, ceras y similares. Los lubricantes usados en estas formas de dosificación incluyen oleato sódico, estearato sódico, estearato de magnesio, benzoato sódico, acetato de sodio, cloruro de sodio y similares. Los disgregantes incluyen, pero sin limitación, almidón, metilcelulosa, agar, bentonita, goma de xantano y similares. Los comprimidos se formularon, por ejemplo, preparando un mezcla en polvo, granulando o soldando con fusión incompleta, añadiendo un lubricante y disgregante, y prensando en comprimidos. Se preparó una mezcla en polvo mezclando el compuesto, molido adecuadamente, con un diluyente o base como se describe anteriormente, y opcionalmente, con un aglutinante tal como carboximetilcelulosa, un alginato, gelatina, o polivinilpirrolidina, un retardante de solución tal como parafina, un acelerados de resorción tal como una sal cuaternaria y/o agente de absorción tal como bentonita, caolín o fosfato dicálcico. La mezcla en polvo se puede granular por humectación con un aglutinante tal como jarabe, pasta de almidón, mucílago de goma arábiga, o soluciones de materiales celulósicos o poliméricos y forzándola a pasar a través de un tamiz. Como alternativa al granulado, la mezcla de polvo se puede pasar a través de una máquina formadora de comprimidos y el resultado son lingotes formados de manera imperfecta rotos en gránulos. Los gránulos se pueden lubricar para evitar que se adhieran al comprimido formando moldes por medio de la adición de ácido esteárico, una sal de estearato, talco, o aceite mineral. A continuación, la mezcla lubricada se comprime en comprimidos. Los compuestos de la presente descripción también pueden combinarse con un vehículo inerte fluido y darles forma de comprimidos directamente sin pasar por las etapas de granulado o formación de pellas. Se puede proporcionar un recubrimiento protector transparente u opaco que consiste en un recubrimiento sellante de goma laca, un recubrimiento de azúcar o de material polimérico, y un recubrimiento pulido de cera. Se pueden añadir pigmentos a estos recubrimientos para distinguir diferentes dosificaciones unitarias.

Los fluidos orales tales como una solución, jarabes y elixires se pueden preparar en forma de dosificación unitaria tal que una cantidad dada contiene una cantidad predeterminada del compuesto. Los jarabes se pueden preparar disolviendo el compuesto en una solución acuosa adecuadamente aromatizada, mientras que se prepararon elixires mediante el uso de un vehículo alcohólico no tóxico. Las suspensiones se pueden formular dispersando el compuesto en un vehículo no tóxico. También pueden añadirse solubilizantes y emulsionantes, tales como alcoholes de isoestearilo etoxilados y éteres de polioxietilen sorbitol, conservantes, aditivos aromatizantes tales como aceite de menta o edulcorantes naturales o sacarina u otros edulcorantes artificiales y similares.

Cuando sea apropiado, las composiciones unitarias de dosificación para la administración oral se pueden microencapsular. La formulación se puede preparar también para prolongar o mantener la liberación, por ejemplo, revistiendo o introduciendo material particulado en polímeros, ceras o similares.

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

Las composiciones farmacéuticas adaptadas para la administración transdérmica pueden presentarse como parches discretos, que se pretende que permanezcan en contacto íntimo con la epidermis del receptor durante un periodo de tiempo prolongado.

Las composiciones farmacéuticas adaptadas para la administración tópica pueden formularse en forma de ungüentos, cremas, suspensiones, lociones, polvos, soluciones, pastas, geles, pulverizadores, aerosoles o aceites.

Para tratamientos del ojo o de otros tejidos externos, por ejemplo boca y piel, las composiciones se aplican preferentemente como una pomada o crema tópica. Cuando se formulan en una pomada, el principio activo puede emplearse con una base de pomada parafínica o miscible en agua. Como alternativa, el principio activo se puede formular en una crema con una base de aceite-en-agua o con una base de agua en aceite.

Las composiciones farmacéuticas adaptadas para administraciones tópicas para el ojo incluyen gotas oculares en las que el ingrediente activo se disuelve o suspende en un vehículo adecuado, especialmente un disolvente acuoso.

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

Las composiciones farmacéuticas adaptadas para la administración rectal se pueden presentar como supositorios o como enemas.

Las formas farmacéuticas para su administración nasal o mediante inhalación se pueden preparar convenientemente en forma de aerosoles, soluciones, suspensiones, gotas, geles o polvos secos.

5 Para composiciones adecuadas y/o adecuadas para su administración por inhalación, se prefiere que el agente esté en una forma de reducido tamaño de partícula y, más preferentemente, la forma de reducido tamaño de partícula se obtiene o se puede obtener mediante micronización. El tamaño de partícula preferible del compuesto de tamaño reducido (por ejemplo, micronizado) o la sal o solvato se define por un valor de D50 de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 10 micrómetros (por ejemplo, medido usando difracción láser). Las composiciones adaptadas para administración por inhalación incluyen los polvos o nieblas de partículas. Las composiciones adecuadas en las que el vehículo es un líquido para administrar como nebulizador o gotas nasales incluyen soluciones/suspensiones acuosas u oleosas del principio activo que se pueden generar por medio de varios tipos de aerosoles presurizados de dosis medida, nebulizadores o insufladores.

10 Las formulaciones en aerosol, por ejemplo para administración inhalada, pueden comprender una solución o suspensión fina del agente en un disolvente acuoso o no acuoso farmacéuticamente aceptable. Las formulaciones en aerosol se pueden presentar en cantidades mono o multidosis en forma estéril en un contenedor sellado, que pueden tomar la forma de un cartucho o rellenarse para usar con un dispositivo atomizador o un inhalador. Como alternativa, el contenedor sellado puede ser un dispositivo dispensador unitario tal como un inhalador nasal de monodosis o un dispensador de aerosol equipado con una válvula aplicadora (inhalador de dosis medida), que se desechará una vez que los contenidos del contenedor se hayan agotado.

15 Cuando la forma de dosificación comprende un dispensador en aerosol, preferentemente contiene un propelente adecuada bajo presión tal como aire comprimido, dióxido de carbono o un propelente orgánico tal como hidrofluorocarbono (HFC). Propelentes de HFC adecuados incluyen 1,1,1,2,3,3,3-heptafluoropropano y 1,1,1,2-tetrafluoroetano. Las formas de dosificación en aerosol también pueden tomar la forma de una bomba-atomizador. El aerosol presurizado puede contener una solución o una suspensión del compuesto activo. Esto puede requerir la incorporación de excipientes adicionales, por ejemplo codisolventes y/o tensioactivos para mejorar las características de dispersión y homogeneidad de las formulaciones en suspensión. Las formulaciones en solución pueden también requerir la adición de codisolventes tales como etanol. Otros excipientes modificadores pueden también incorporarse para mejorar, por ejemplo, la estabilidad y/o el gusto y/o las características de masa de partícula fina (cantidad y/o perfil) de la formulación.

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

25 Las formulaciones en aerosol están dispuestas, preferentemente, de modo que cada dosis medida o "puff" de aerosol contenga una cantidad concreta de un compuesto de la invención. Se puede administrar una vez al día o varias veces al día, por ejemplo 2, 3, 4 u 8 veces, administrándose, por ejemplo, 1, 2 o 3 dosis cada vez. La dosis diaria global de la dosis medida administrada mediante cápsulas y cartuchos en un inhalador o insuflador será, generalmente, el doble de aquellas con formulaciones en aerosol.

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

35 Las composiciones farmacéuticas adaptadas para la administración parenteral incluyen soluciones inyectables estériles acuosas y no acuosas que pueden contener antioxidantes, tampones, bacterioestáticos y solutos, que hacen que la composición sea isotónica con la sangre del receptor que se pretenda; y suspensiones estériles acuosas y no acuosas que pueden incluir agentes de suspensión y agentes espesantes. Las composiciones pueden presentarse en envases de dosis individual o de multidosis, por ejemplo, ampollas selladas y viales, y pueden almacenarse en estado criodesecado (liofilizado) que requiere únicamente la adición del transportador líquido estéril, por ejemplo agua para inyección, inmediatamente antes de su uso. Las soluciones y suspensiones de inyección extemporáneas se pueden preparar a partir de polvos estériles, gránulos y comprimidos.

40 Se debe entender que, además de los ingredientes mencionados en particular anteriormente, las composiciones pueden incluir otros agentes convencionales en la técnica teniendo en cuenta el tipo de formulación en cuestión, por ejemplo, las adecuadas para la administración oral pueden incluir agentes aromatizantes.

45 Se pueden administrar moléculas de ARN de interferencia o antisentido al mamífero que lo necesite. Como alternativa, se pueden administrar construcciones que las incluyan. Dichas moléculas y construcciones se pueden usar para interferir con la expresión de la proteína de interés, por ejemplo, bromodominio y, como tales, modificar la expresión génica. Normalmente, la administración se realiza por medios conocidos en la materia.

50 Las moléculas de ARN de interferencia o antisentido se pueden administrar in vitro a las células o in vivo, por ejemplo, a tumores de un mamífero. Se pueden usar modos de administración sin limitaciones, incluyendo:

intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, intraarterial, administración local durante cirugía, endoscópica, subcutánea y por vía oral. Se pueden seleccionar vectores según propiedades deseables para cualquier aplicación concreta. Los vectores pueden ser víricos o plasmídicos. Los vectores adenovíricos son útiles a este respecto. Se pueden usar promotores específicos de tejido, específicos de tipo de célula o regulables de otro modo para controlar la transcripción de las moléculas de polinucleótidos inhibidores. Los vehículos no víricos, tales como liposomas o nanoesferas.

Una cantidad terapéuticamente eficaz del agente dependerá de una serie de factores, incluyendo, por ejemplo, la edad y el peso del sujeto, la afección precisa que requiere tratamiento y su gravedad, la naturaleza de la formulación y la vía de administración, y, en última instancia, dependerá del criterio del médico o veterinario encargado de la atención. En particular, el sujeto que se va a tratar es un mamífero, particularmente un ser humano.

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

El agente puede usarse solo o en combinación con otros agentes terapéuticos.

El agente para su uso en la presente invención se puede usar en combinación o incluir uno o más de otros agentes terapéuticos y se puede administrar de forma secuencial o simultánea por cualquier vía conveniente en combinaciones farmacéuticas separadas o combinadas.

El agente y las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la invención se pueden usar en combinación con o incluir uno o más de otros agentes terapéuticos, por ejemplo seleccionados de entre AINE, corticoesteroides, inhibidores de la COX-2, inhibidores de las citocinas, agentes anti-TNF, inhibidores de la oncostatina M, antipalúdicos, inmunosupresores y citostáticos.

Procedimientos de tratamiento y enfermedades

En el presente documento se divulgan procedimientos de tratamiento o prevención de afecciones y enfermedades autoinmunitarias e inflamatorias que se pueden mejorar mediante la inhibición de las proteínas que contienen bromodominio y, de este modo, por ejemplo, modulan el nivel de expresión de los genes diana activados por acetilación y reprimidos por acetilación. Un procedimiento puede comprender administrar a un sujeto, por ejemplo, un sujeto que lo necesite, una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente descrito en el presente documento.

Por tanto, en un aspecto se proporciona el uso de un inhibidor de bromodominio en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de enfermedades y afecciones autoinmunitarias e inflamatorias.

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

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un inhibidor de la proteína que contiene bromodominio ATAD2 para su uso en el tratamiento de enfermedades y afecciones autoinmunitarias e inflamatorias.

En un aspecto, la proteína que contiene bromodominio es ATAD2.

En un aspecto, el inhibidor inhibe la proteína que contiene bromodominio ATAD2.

Basado en al menos el hecho de que se ha descubierto que un incremento de la acetilación de histonas está asociada con la inflamación, un procedimiento para tratar la inflamación en un sujeto puede comprender administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más agentes que disminuye la acetilación o restaura la acetilación a su nivel en las correspondientes células normales.

La inflamación representa un grupo de respuestas vasculares, celulares y neurológicas al traumatismo. La inflamación se puede caracterizar por el movimiento de células inflamatorias, tales como monocitos, neutrófilos y granulocitos en los tejidos. Normalmente esto se asocia con una reducción de la función de barrera endotelial y edema en los tejidos. La inflamación se puede clasificar como aguda o crónica. La inflamación aguda es la respuesta inicial del cuerpo a estímulos dañinos y se consigue mediante un movimiento incrementado del plasma y los leucocitos desde la sangre a los tejidos dañados. Una cascada de acontecimientos bioquímicos se propaga y madura la respuesta inflamatoria, que implica al sistema vascular local, el sistema inmunitario y varias células dentro del tejido dañado. La inflamación prolongada, conocida como inflamación crónica, conduce a un desplazamiento progresivo del tipo de células que están presentes en el lugar de la inflamación y se caracteriza por la destrucción y curación simultáneas del tejido del procedimiento inflamatorio.

Cuando se produce como parte de una respuesta inmunitaria a la infección o como una respuesta aguda al traumatismo, la inflamación puede ser beneficiosa y normalmente es autolimitante. Sin embargo, la inflamación puede ser dañina en varias condiciones. Estas incluyen la producción de inflamación excesiva en respuesta a agentes infecciosos, que puede dar lugar a un daño orgánico importante y a la muerte (por ejemplo, en una situación

de sepsis). Además, la inflamación crónica es, generalmente, perjudicial y se encuentra en la raíz de numerosas enfermedades crónicas, lo que causa un daño grave e irreversible a los tejidos. En dichos entornos, la respuesta inmunitaria a menudo se dirige contra los tejidos propios (autoinmunidad), aunque las respuestas crónicas a entidades extrañas también pueden provocar daños a los tejidos propios.

- 5 El objetivo de la terapia antiinflamatoria es, por lo tanto, reducir esta inflamación, inhibir la autoinmunidad cuando esté presente y permitir el progreso del procedimiento fisiológico o de la cicatrización y la reparación del tejido.

Los agentes pueden usarse para tratar la inflamación de cualquier tejido y órgano del cuerpo, incluyendo inflamación musculoesquelética, inflamación vascular, inflamación neural, inflamación del sistema digestivo, inflamación ocular, inflamación del sistema reproductor y otro tipo de inflamación, como se ilustra a continuación.

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

- 20 Inflamación ocular se refiere a la inflamación de cualquier estructura del ojo, incluidos los párpados. Ejemplos de inflamación ocular que puede tratarse con los compuestos de la invención incluyen blefaritis, blefarocalasia, conjuntivitis, dacrioadenitis, queratitis, queratoconjuntivitis seca (sequedad del ojo), escleritis, triquiasis y uveítis.

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

- 25 Ejemplos de inflamación del sistema vascular o linfático que puede tratarse con los compuestos de la invención incluyen artroesclerosis, artritis, flebitis, vasculitis y linfangitis.

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

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

- 35 Los agentes se pueden usar para tratar afecciones autoinmunitarias que tienen un componente inflamatorio. Dichas afecciones incluyen alopecia universal diseminada aguda, enfermedad de Behcet, enfermedad de Chagas, síndrome de fatiga crónica, disautonomía, encefalomielitis, espondilitis anquilosante, anemia aplásica, hidradenitis supurativa, hepatitis autoinmune, ooforitis autoinmunitaria, enfermedad celíaca, enfermedad de Crohn, diabetes mellitus de tipo 1, arteritis de células gigantes, síndrome de Goodpasture, enfermedad de Graves, síndrome de Guillain-Barre, enfermedad de Hashimoto, púrpura de Henoch-Schonlein, enfermedad de Kawasaki, lupus eritematoso, colitis microscópica, poliarteritis microscópica, enfermedad del tejido conectivo mixto, esclerosis múltiple, miastenia grave, 40 síndrome de opsoclonía-mioclónia, neuritis óptica, tiroiditis de Ord, pénfigo, poliarteritis nodosa, polimialgia, artritis reumatoide, síndrome de Reiter, síndrome de Sjögren, arteritis temporal, granulomatosis de Wegener, anemia hemolítica autoinmunitaria por anticuerpos calientes, cistitis intersticial, enfermedad de Lyme, morfea, psoriasis, sarcoidosis, esclerodermia, colitis ulcerosa y vitíligo.

- 45 Los agentes se pueden usar para tratar enfermedades de hipersensibilidad mediadas por los linfocitos T que tienen un componente inflamatorio. Dichas afecciones incluyen hipersensibilidad por contacto, dermatitis por contacto (incluyendo la producida por la hiedra venenosa), urticaria, alergias cutáneas, alergias respiratorias (fiebre del heno, rinitis alérgica) y enteropatía sensible al gluten (enfermedad celíaca).

- 50 Otras afecciones inflamatorias que pueden tratarse con los agentes incluyen, por ejemplo, apendicitis, dermatitis, dermatomiositis, endocarditis, fibrositis, gingivitis, glositis, hepatitis, hidradenitis supurativa, iritis, laringitis, mastitis, miocarditis, nefritis, otitis, pancreatitis, parotiditis, pericarditis, periodontitis, faringitis, pleuritis, neumonitis, prostatitis, pielonefritis y estomatitis, rechazo de trasplantes (incluyendo órganos tales como riñón, hígado, corazón, pulmón, páncreas (por ejemplo, células de islote), médula ósea, córnea, intestino delgado, aloinjertos de piel, homoinjertos de piel y xenoinjertos de válvulas cardíacas, enfermedad del suero y enfermedad de injerto contra hospedador), pancreatitis aguda, pancreatitis crónica, síndrome de la dificultad respiratoria aguda, síndrome de Sezary, hiperplasia 55 suprarrenal congénita, tiroiditis no supurativa, hipercalcemia asociada con el cáncer, pénfigo, dermatitis ampollosa herpetiforme, eritema multiforme grave, dermatitis exfoliativa, dermatitis seborreica, rinitis alérgica estacional o perenne, asma bronquial, dermatitis de contacto, dermatitis atópica, reacciones de hipersensibilidad a fármacos,

conjuntivitis alérgica, queratitis, herpes zóster oftálmico, iritis y oiridociclitis, corioretinitis, neuritis óptica, sarcoidosis sintomática, quimioterapia para la tuberculosis pulmonar fulminante o diseminada, púrpura trombocitopénica idiopática en adultos, trombocitopenia secundaria en adultos, anemia hemolítica (autoinmunitaria) adquirida, leucemia y linfomas en adultos, leucemia aguda de la infancia, enteritis regional, vasculitis autoinmunitaria, 5 esclerosis múltiple, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, rechazo de trasplantes de órganos sólidos, septicemia. Entre los tratamientos preferentes se incluyen el tratamiento de los rechazos de trasplantes, artritis reumatoide, artritis psoriásica, esclerosis múltiple, diabetes de tipo 1, asma, enfermedad inflamatoria del intestino, lupus eritematoso sistémico, psoriasis, enfermedad pulmonar crónica y afecciones infecciosas acompañadas de inflamación (por ejemplo, septicemia).

10 Los procedimientos de tratamiento y usos de la invención se pueden usar en mamíferos, particularmente en seres humanos.

La presente invención también proporciona un procedimiento para identificar agentes que pueden ser compuestos candidatos para el tratamiento de enfermedades o afecciones autoinmunitarias e inflamatorias que comprende determinar si un compuesto es capaz de inhibir la siguiente proteína ATAD2 que contiene bromodominio.

15 **Procedimientos de detección selectiva**

La presente invención propone, por primera vez que la ATAD2 que contiene bromodominio es un potencial objetivo terapéutico para el tratamiento de afecciones y enfermedades autoinmunitarias e inflamatorias y/o cáncer. Por tanto, la presente invención proporciona n nuevo objetivo para la identificación, validación, selección y optimización de 20 agentes activos sobre la base de su capacidad para modular la expresión o la actividad de la proteína ATAD2 que contiene bromodominio. Dichos agentes activos incluyen los inhibidores tal como se ha descrito anteriormente.

Por tanto, la presente invención atañe a un procedimiento de identificación, detección selectiva, caracterización o definición de un agente que es capaz de modular la actividad de la proteína ATAD2 que contiene bromodominio. Los procedimientos se pueden usar para la detección selectiva, por ejemplo, de grandes números de compuestos candidatos para su uso clínico en enfermedades inflamatorias y autoinmunitarias o cáncer.

25 Los ensayos (procedimientos de detección selectiva) se pueden realizar en un sistema celular, un sistema animal o un sistema sin células. Dichas técnicas serán evidentes para un experto en la técnica y pueden estar basadas en la determinación de la interacción [por ejemplo, ensayos unión, desplazamiento o competición) o una determinación de la función de la actividad, transcripción y similares.

30 Por tanto, por ejemplo, la presente invención proporciona un procedimiento de análisis de la capacidad de un agente para modular la expresión de la proteína ATAD2 que contiene bromodominio, en particular para inhibir la expresión. En otro ejemplo, la presente invención proporciona un procedimiento de análisis de la capacidad de un agente para y unirse y, opcionalmente, modular la actividad de la proteína ATAD2 que contiene bromodominio, en particular para inhibir la actividad. En un ejemplo adicional, la presente invención proporciona un procedimiento de análisis de la capacidad de un agente para modular la actividad de la proteína ATAD2 que contiene bromodominio, en particular 35 para inhibir la actividad.

En el presente documento se proporcionan procedimientos de detección selectiva para identificar agentes que inhiben proteínas que contienen bromodominio como potencialmente útiles en el tratamiento o prevención de enfermedades y afecciones autoinmunitarias e inflamatorias y/o cáncer. Un procedimiento implica la detección selectiva de un inhibidor de la actividad de la proteína que contiene bromodominio, incluyendo las etapas de poner 40 en contacto un péptido, que puede modificarse mediante acetilación, con un bromodominio, en particular la proteína ATAD2 que contiene bromodominio o un fragmento de la misma en presencia y en ausencia de una sustancia de ensayo, e identificar una sustancia de ensayo como inhibidor o activador de la actividad de bromodominio. Los agentes (o sustancias) de ensayo para la detección selectiva como inhibidores del bromodominio pueden proceder de cualquier fuente conocida en la materia. Pueden ser productos naturales, purificados o mezclas, compuestos 45 sintéticos, miembros de bibliotecas de compuestos, etc. Las sustancias de ensayo se pueden seleccionar de aquellas que anteriormente se ha identificado que tienen actividad biológica o farmacológica o de aquellas que no.

En un aspecto adicional, el procedimiento de detección selectiva de un inhibidor de la proteína que contiene bromodominio incluye un ensayo de unión. Por tanto, un compuesto que inhibe la unión de la proteína ATAD2 que contiene bromodominio a su sustrato se puede identificar en ensayos de competición o de unión directa. Los 50 formatos de ensayo de unión directa y de competición son similares a los formatos usados en inmunoensayos y ensayos de unión al receptor y generalmente conocidos para un experto en la materia.

En un aspecto, la proteína que contiene bromodominio es ATAD2.

Típicamente, los procedimientos usan péptidos de la proteína ATAD2. En particular, los procedimientos usan una proteína humana. Más particularmente, la proteína tiene la secuencia de aminoácidos de la proteína ATAD2 humana 55 como se describe en el número de acceso NP_001420.2. o un fragmento del mismo o una secuencia que tiene al menos un 75 %, 80 %, 85 %, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98 % o 99 % de homología con la secuencia de aminoácidos de la proteína ATAD2 o un fragmento de la misma.

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

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

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

Típicamente, se proporciona un polinucleótido que codifica el componente relevante dentro de un vector de expresión. Dichos vectores de expresión se construyen de forma rutinaria en la materia y pueden implicar, por ejemplo, el uso de ADN plasmídico y de iniciadores, promotores, potenciadores adecuados, además de otros elementos, tales como, por ejemplo, señales de poliadenilación que pueden ser necesarias y que están en la orientación correcta con el fin de permitir la expresión de proteínas completas. Dichos vectores serán fácilmente evidentes para los expertos en la materia, tales como los que se describen con mayor detalle en los ejemplos de la presente solicitud. Las secuencias de los promotores pueden ser promotores inducibles o constitutivos en el formato de ensayo seleccionado.

Como se ha descrito que los sustratos naturales para los bromodominios incluyen péptidos de histonas acetiladas, los sustratos preferentes podrían comprender péptidos correspondientes a estas secuencias y modificaciones. A la inversa, se podrían usar otros péptidos con una afinidad adecuada por ATAD2.

Por tanto, por ejemplo, el sustrato podría ser un péptido, tal como un péptido sintético que comprende restos en N-terminal de la histona 3 o 4, de una longitud de al menos 10, 20, 30, 40, 50 o completa. El sustrato puede ser al menos un 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, homólogo al mismo.

Puede ser preferente usar un sustrato seleccionado de todas las histonas, péptidos sintéticos y nucleosomas.

Los siguientes ejemplos se exponen para ilustrar la eficacia del enfoque descrito en la presente invención y para ilustrar adicionalmente aplicaciones particulares de procedimientos generales descritos anteriormente. En consecuencia, la siguiente sección de Ejemplos no pretende ser, de ningún modo, limitante del alcance de la invención contemplada en el presente documento.

Ejemplos

Para investigar si las proteínas que contienen bromodominio podrían representar objetivos para el tratamiento de la autoinmunidad y las enfermedades inflamatorias, se proyectó una biblioteca de ARNip dirigida a 43 proteínas que contienen bromodominio (Tabla 1) según los efectos sobre la función de los macrófagos humanos. Los ARNip se unen específicamente a un transcrito de ARNm que porta una secuencia de nucleótidos complementaria y posteriormente reduce la expresión de la proteína codificada por dicho ARNm específico. Dado que un número de factores dispares puede influir sobre si un ARNip puede reducir con eficacia la expresión de su gen objetivo y aún no se han desarrollado algoritmos avanzados capaces de predecir con precisión ARNip eficaces, se recomienda utilizar un mínimo de tres o cuatro ARNip contra un objetivo dado al realizar una detección selectiva (4). Los inventores utilizaron al menos cuatro ARNip distintos dirigidos a cada gen, incluido ATAD2 (Tabla 2) para sus estudios.

Tabla 1. Lista de objetivos de proteínas que contienen bromodominio en la biblioteca

ASH1L	ATAD2
ATAD2	FALZ
ATAD2	KAT2A
ATAD2B	KAT2B
BAZ1A	MLL
BAZ1B	MLL4
BAZ2A	PBRM1

(continuación)	
BAZ2B	PHIP
BRD1	PRKCBP1
BRD2	SMARCA2
BRD3	SMARCA4
BRD4	SP100
BRD7	SP110
BRD8	SP140
BRD9	TAF1
BRDT	TAF1L
BRPF1	TRIM24
BRPF3	TRIM28
BRWD1	TRIM33
BRWD3	TRIM66
CECR2	ZMYND11
CREBBP	ZMYND11

Tabla 2. Lista de secuencias objetivo de ARNip de ATAD2

AAGGCATTTATAAAGATCGAA
 CTGGTACTTAGGCACCATAAA
 CCGGATAAAGAAGAACGGACA
 AAGAATAATTAGCAGCGTTAA

5 Los inventores analizaron el efecto de la introducción de estos ARNip en macrófagos humanos derivados de monocitos primarios. Se cree que los macrófagos hacen importantes contribuciones a la autoinmunidad y a la inflamación a través de la producción de citocinas proinflamatorias. A la inversa, estas células también pueden producir citocinas antiinflamatorias que contrarrestan los procedimientos inflamatorios. Por tanto, los inventores evaluaron el efecto de los ARNip dirigidos a las proteínas que contienen bromodominio sobre la producción de citocinas tanto proinflamatorias como antiinflamatorias. El TNF- α se midió como ejemplo de una citocina proinflamatoria, dado su papel central en las enfermedades autoinmunitarias e inflamatorias (5), mientras que la IL-10 se midió debido a su función crucial en la inhibición de la inflamación (6).

15 Los ARNip se introdujeron en macrófagos mediante transfección, después de lo cual las células se estimularon mediante tratamiento con lipopolisacárido (LPS), un componente bacteriano. Se midieron las cantidades de TNF- α e IL-10 presentes en el medio de seis a dieciocho horas después de la activación. Como se muestra en la figura 1, se descubrió que los ARNip dirigidos a ATAD2 alteran significativamente la producción de citocina por los macrófagos. Específicamente, los ARNip contra ATAD2 inhibieron la producción inducida por LPS de la citocina proinflamatoria TNF- α . A todas las concentraciones de LPS analizadas, 4 ARNip diferentes dirigidos a ATAD2 inhibieron la inducción de TNF- α y lo hicieron en una medida similar a la de un ARNip dirigido directamente al TNF- α .

20 Los inventores también exploraron un posible papel de ATAD2 en otras células inmunitarias. Para investigar si ATAD2 podría contribuir a la función de los linfocitos T activados, los inventores compararon la expresión de la proteína ATAD2 antes y después de tratar las células con un estímulo de activación de los linfocitos T. Como se muestra en la Figura 2A, la expresión de la proteína ATAD2 aumentó tras el tratamiento de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) empobrecidas en monocitos con anticuerpos anti-CD3 más anti-CD28, un estímulo que imita el reconocimiento por los linfocitos T de antígenos y conduce a la proliferación de linfocitos T y citocinas. Dado que las PBMC empobrecidas en monocitos están altamente enriquecidos para linfocitos T (linfocitos T tanto CD4+ como CD8+), los datos sugirieron que los linfocitos T regulan por aumento la expresión de ATAD2 después de la activación. Los inventores investigaron esta posibilidad utilizando linfocitos T CD4+ purificados. Como se muestra en

la Figura 2B, la expresión de la proteína ATAD2 aumentó después del tratamiento de los linfocitos T CD4+ con anticuerpos anti-CD3 más anti-CD28. Además, el tratamiento de los linfocitos T CD4+ CON otros varios estímulos de activación, incluido el acetato de miristato de forbol (PMA) + ionomicina, fitohemaglutinina (PHA) y anticuerpos anti-CD3 de forma individual, provocaron la regulación por aumento de la expresión de la proteína ATAD2. El estrecho vínculo entre la activación de los linfocitos T y el aumento de la expresión de ATAD2 implica que ATAD2 puede contribuir a la respuesta funcional de los linfocitos T.

Los inventores también evaluaron la expresión de ATAD2 en los linfocitos B en diferentes estados de activación. Se aislaron subpoblaciones de linfocitos B intactos, del centro germinal y de memoria de amígdalas humanas y se midieron sus niveles de ARNm de ATAD2 mediante RT-PCR cuantitativa. La expresión del ARNm de ATAD2 fue relativamente baja en la población de linfocitos B intactos pero aumentó significativamente en los linfocitos B del centro germinal (Figura 3). Los linfocitos B de memoria clásicos expresaron niveles bajos de ATAD2 similares a los linfocitos B intactos. Estos datos indican que la expresión de ATAD2 está regulada por aumento en los linfocitos B durante la reacción del centro germinal *in vivo*. Se proporcionaron pruebas adicionales para esto mediante la evaluación de la expresión de la proteína ATAD2 *in situ* en tejido de amígdalas humanas (Figura 4). La correlación entre la elevada expresión de ATAD2 y el estado de linfocitos B activados del centro germinal sugiere que ATAD2 puede tener una función en las respuestas de los linfocitos B dependientes de linfocitos T al antígeno, por ejemplo, proliferación, diferenciación, hipermutación somática o intercambio de clase.

Finalmente, los inventores evaluaron la expresión de la proteína ATAD2 en varios tejidos inflamados de enfermedades inflamatorias humanas (Figura 5). La positividad nuclear para ATAD2 fue evidente en los infiltrados inflamatorios de células mononucleares en el tejido sinovial (A) de artritis reumatoide (AR) y también en la lámina propia de tejido enfermo por colitis ulcerosa (B) y enfermedad de Crohn (C). Cuando se formaron estructuras foliculares secundarias, la expresión de ATAD2 estaba presente en células mononucleares en el centro folicular pero no en la mayoría de la zona del manto circundante con pocas células positivas. No se observó tinción de las células polimorfonucleares. También se observó tinción positiva en el plexo nervioso (nuclear y citoplasmático en particular), una proporción de las células epiteliales de la cripta de la mucosa (nuclear) de secciones de colitis ulcerosa y de Crohn y de las células endoteliales de los vasos en el tejido de AR. Estos resultados indican que las células mononucleares en infiltrados inflamatorios en diversas enfermedades autoinmunes expresan ATAD2.

En conjunto, estos resultados proporcionan evidencia de un papel previamente desconocido para ATAD2 en la inflamación. Por tanto, se demostró que ATAD2 contribuye a la generación de un perfil de citocinas de los macrófagos proinflamatorios; Se demostró que la expresión de ATAD2 aumentaba tras la activación de los linfocitos T y la activación de los linfocitos B; y se demostró que la expresión de ATAD2 era prominente en tejidos inflamados de diversas enfermedades autoinmunes inflamatorias humanas. Estos hallazgos indican que los enfoques de inhibición de la expresión y/o la función de esta proteína que contiene bromodominio serían beneficiosos para el tratamiento de enfermedades y afecciones autoinmunitarias e inflamatorias.

35 Procedimientos:

Estudios de ARNip en macrófagos

Aislamiento celular: Se prepararon células mononucleares de sangre periférica (PBMC) a partir de 100 o 200 ml de sangre heparinizada de voluntarios sanos de GSK diluyendo las muestras a 1:1 en PBS (sin calcio y magnesio, Invitrogen) y superponiéndolas en alícuotas de 30 ml en 20 ml de Ficol -Paque Plus (Amersham Biosciences) en tubos Falcon de 50 ml. Tras la centrifugación a 400 x g, a temperatura ambiente (RT) durante 20 minutos sin freno, la capa leucocitaria formada en la interfaz se transfirió a tubos de 50 ml nuevos, se diluyó en PBS, se centrifugó a 400 xg (RT) durante 10 minutos y se retiró el sobrenadante. Las PBMC se resuspendieron luego en 3 ml de tampón Miltenyi a 4 °C con BSA al 0,5 % (Miltenyi Biotec), que contenía 300 µl de MicroBeads CD14 humanas MACS (Miltenyi Biotec) y se incubaron a 4 °C durante 15-25 minutos. Después de esta incubación, se añadió tampón Miltenyi a 4 °C a un volumen total de 50 ml, las muestras se centrifugaron a 400 x g (RT) durante 10 minutos, se eliminó el sobrenadante y las células se resuspendieron en 4 ml de tampón Miltenyi a 4 °C. Posteriormente, se colocaron 4 columnas MACS LS Separation (Miltenyi Biotec) en un soporte magnético y se equilibraron con 3 ml de tampón Miltenyi. A continuación, la suspensión celular se dividió en estas columnas, después de lo cual las columnas se lavaron con 3 x 3 ml de tampón Miltenyi a 4 °C. Las células CD14⁺ unidas se eluyeron posteriormente retirando las columnas de su soporte magnético, colocándolas sobre un tubo Falcon de 15 ml y empujando 5 ml de tampón Miltenyi a través de las columnas usando un émbolo de jeringa suministrado (Miltenyi Biotec). Las suspensiones de las células eluidas se centrifugaron a 400 xg (RT) durante 10 minutos, se resuspendieron en 2 ml de medio de cultivo (medio RPMI 1640 (Invitrogen) suplementado con L-glutamina 2 mM (Invitrogen), 100 unidades/ml de penicilina (Invitrogen) y 100 µg/ml de estreptomycin (Invitrogen)) con 5 % de suero bovino fetal (FBS, inactivado con calor, Invitrogen) y se contaron usando un hemocitómetro, después de lo cual se añadió medio de cultivo a una concentración final de 200.000 células/ml.

Cultivo celular y transfección: Las suspensiones de monocitos CD14⁺ se incubaron en medio de cultivo que contenía FBS al 5 % y 100 ng/ml de hrM-CSF (R & D Systems) a 37 °C en una atmósfera humidificada con CO₂ al 5 % durante seis días. Después de 6 días de diferenciación, las células se transfectaron con ARNip de la siguiente manera. Los ARNip se prepararon a 200 nM (concentración final 10x), en medios Optimem (Gibco, Invitrogen). El

ARNip diluido se mezcló con un volumen igual de reactivo de transfección de Gemini (7) (10 µg/ml en Optimem). Las mezclas se dejaron en complejo durante 20-30 minutos antes de añadir 4 veces el volumen del medio de macrófagos (5 % de FBS RPMI). La mayor parte del medio se retiró de las células y se reemplazó con los complejos diluidos. Las placas se sellaron con selladores permeables a los gases y se incubaron durante 48 horas. Después, se estimularon las células mediante la adición de diversas concentraciones de LPS y se incubaron durante 6-18 horas. Se extrajeron los sobrenadantes y se analizaron para determinar la IL-10 y el TNF-α o se centrifugaron, se transfirieron a placas nuevas y se almacenaron a -80 °C hasta el análisis. Las citocinas se analizaron usando placas MSD y se leyeron en un lector de placas MSD Sector 6000.

Búsqueda de coincidencias en detecciones de ARNip

En algunos estudios, la función de las proteínas que contienen bromodominio se evaluó como parte de detecciones selectivas grandes, incluyendo ARNip dirigidos a proteínas que contienen bromodominio y que no contienen bromodominio. Utilizando los datos de la biblioteca de respuestas, se calculó una media robusta y una desviación estándar placa por placa para cada donante para cada citocina indicadora. También se calcularon dos puntos de corte para encontrar el 10 % del extremo de los datos en cada cola. Cualquier respuesta mayor que la media robusta más 1,3 veces la desviación estándar robusta se consideró una coincidencia creciente y cualquier respuesta menor que la media robusta menos 1,3 veces la desviación estándar robusta se consideró una coincidencia inhibida. El análisis utilizó respuestas de en log, usando el log en base 10.

Evaluación de la expresión de la proteína ATAD2 en PBMC empobrecidas en monocitos

Se aislaron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) a partir de sangre heparinizada humana usando tubos Accupsin (Sigma) y centrifugación en gradiente de densidad Ficoll Paque (GE Healthcare). Las células CD14+ se empobrecieron usando esferas anti-CD14 y columnas LS (MACS, Miltenyi Biotech). La fracción eluida no contenía células CD14+, predominantemente linfocitos, incluyendo tanto linfocitos T como linfocitos B. Los linfocitos T se activaron incubando las PBMC empobrecidas en monocitos durante 24 horas a 37 °C con esferas conjugadas con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 (Dynabeads, activador de linfocitos T humanos CD3/CD28, Invitrogen).

Los lisados celulares se prepararon del siguiente modo. Las células se centrifugaron durante 5 minutos a 1.200 rpm y el sedimento se lavó con 5 ml de PBS. El sedimento se resuspendió en 30 µl de agua y se transfirió a un tubo Eppendorf. Se añadió 30 µl de la mezcla desnaturalizante (275 µl de agua, 375 µl de tampón de muestras NuPAGE®LDS (4X), Invitrogen y 100 µl de DTT 1,5M) y las muestras se congelaron a -20 °C hasta su uso. Las muestras de SDS-PAGE se calentaron durante 5 minutos a 80 °C (termobloque) y después se sometieron a ultrasonidos durante 5 segundos a 10 micrómetros para romper el ADN. Las muestras se centrifugaron y se mezclaron mediante pipeteo. Se cargaron 40 µl de muestras y 5 µl de patrón preteñido See Blue®Plus 2 (1X) (Invitrogen) en una placa NuPAGE® 4-12 % Gel Bis-Tris de 1,5 mm x 10 pocillos (Invitrogen). Las muestras se procesaron durante una hora a 100 mA/gel en tampón MOPS 1X en condiciones reductoras.

Las proteínas se transfirieron a las membranas mediante transferencia semiseca utilizando el kit iBlot™ Gel Transfer Stacks Nitrocellulose Mini (Invitrogen), programa 2, a 23 voltios durante 6 minutos.

Para la detección, la membrana de nitrocelulosa se incubó con 10 ml de PBS que contenía leche desgrasada al 3 %, a pH 7,4 (Sigma) durante 2-3 horas a temperatura ambiente con agitación, para bloquear sitios no específicos. Se añadió el anticuerpo primario (anticuerpo anti-ATAD2, HTA029424 Prestige, Sigma usado a 1:500 en tampón de bloqueo) y la membrana se incubó durante la noche con agitación. La membrana se lavó en mQ PBS-Tween 20 al 0,1 % para eliminar el exceso de anticuerpo primario: 5 lavados rápidos, un lavado durante 30 minutos, 5 lavados rápidos, un lavado durante 30 minutos. Se añadió el anticuerpo secundario (anti-HRP de conejo, Sigma, dilución = 1:20.000) y la membrana se incubó durante una hora a TA con agitación y se lavó en PBS-Tween 20 al 0,1 % como se ha descrito anteriormente. La imagen de la membrana se capturó utilizando el kit Supersignal® West Femto Maximum Sensitivity Substrate (Thermo Scientific) y la cámara de imágenes de quimioluminiscencia LAS-3000 (Fujifilm). Se extrajeron los anticuerpos y la membrana se volvió a sondar con un anticuerpo anti-histona H3 (Abcam) usado a 1:2.500. La histona H3 sirvió como control de carga.

Evaluación de la expresión de la proteína ATAD2 en linfocitos T CD4+

Se aislaron células mononucleares de sangre periférica a partir de sangre periférica donada por un donante sano mediante centrifugación (800 g) sobre histoplaque™. A continuación se aislaron los linfocitos T CD4+ mediante selección negativa usando separación con esferas magnéticas y se resuspendieron en medio de células primarias a 1x10⁶ células/ml (RPMI 1640 + suero bovino fetal inactivado con calor al 10 %, L-glutamina 2 mM y 100 U/ml de penicilina y 100 mg/ml de estreptomina). A continuación, se estimularon las células como se describe en la figura 2B y se incubaron a 37 °C con 5 % de CO₂ durante 72 horas. A continuación se recogieron las células, se centrifugaron a un sedimento (800 g), se disolvieron en 200 µl de tampón de muestra SDS, la sonda se sometió a ultrasonidos durante 30 segundos y se centrifugó (1000 g). Después, se analizaron las muestras mediante análisis de transferencia Western con las muestras procesadas en geles de electroforesis bis-tris al 4 % -12 % con tampón de carrera MOPS y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa en tampón de transferencia más metanol al 20 %. Las membranas se bloquearon con tampón de bloqueo Odyssey durante 1 hora y después se sondaron con anti-ATAD2 (1:500) y anti-histona H3 (1:3000) diluidas en tampón Odyssey. La incubación se realizó durante la noche. Después de lavar en TBST, se sondaron las membranas Alexa Fluor™ 680 de burro anti-conejo (1:6000) diluido en TBST (1 hora) y, a continuación, después de lavados adicionales con TBST analizados en el escáner fluorescente

Odyssey.

Evaluación de la expresión del ARNm de ATAD2 en linfocitos B de amígdalas

Los linfocitos B se aislaron de las amígdalas humanas utilizando un kit de purificación de linfocitos B humanos de selección negativa (kit II de aislamiento de linfocitos B MACS B, Miltenyi Biotech, n.º de cat. 130-091-151) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los linfocitos B purificados se tiñeron para IgD, CD27 y CD38, usando anticuerpos marcados fluorescentemente descritos previamente. La subpoblación de linfocitos B se clasificó usando un BD FACS Aria con acotación para a) IgD⁺/CD38⁻/CD27⁻, b) IgD⁺/CD38⁺/CD27⁻, c) IgD⁺/CD38⁺/CD27⁺, d) IgD⁻/CD38⁻/CD27⁻. Se recogieron 1 x 10⁶ células para cada subpoblación en FCS enfriado con hielo, se lavaron una vez en PBS y luego se lisaron para la extracción de ARNm (Qiagen, kit RNeasy) y el análisis por qRT-PCR. En resumen, las concentraciones de las muestras de ARNm se midieron usando un espectrofotómetro NanoDrop y se realizó la transcripción inversa de la cantidad apropiada de ARNm usando SuperScript III First-Strand Synthesis SuperMix para qRT-PCR (Invitrogen, n.º de producto 11752250) según las instrucciones del fabricante. La Q-PCR se realizó usando una máquina ABIPRISM 7900HT. Se utilizaron los siguientes conjuntos de cebador/sonda específicos de gen: cebador directo de ubiquitina (CGGCAAGACCATCACTCTGG), cebador inverso de ubiquitina (AAAGAGTGGGCCATCTTCC), sonda de ubiquitina (6-FAM-TGGAGCCCAGTGACACCATCGAAAATG-TAMRA), cebador directo de ATAD2 (TCAAATGCCCTCCTCCATC), cebador inverso ATAD2 (TTGTGGTGCAGCCAGAAGTG). Se usó la mezcla maestra de verde SYBR (Invitrogen, n.º de producto 4364346) con el conjunto de cebadores de ATAD2. El análisis de datos de la qRT-PCR se realizó usando el software SDS 2.3 (Applied Biosystems) y MS Office Excel 2007. El programa anterior calculó las concentraciones de ARNm basadas en la curva patrón del ADN genómico diluido. En este último programa, los números de copias de ARNm de la muestra se calcularon para cada gen y se normalizaron para ubiquitina, un gen de mantenimiento doméstico, dividiendo el número de copias del gen de citocinas por el número promedio de copias de la ubiquitina para esa muestra.

Evaluación de la expresión de la proteína ATAD2 en tejidos

Se obtuvieron muestras incluidas en parafina fijadas en formalina (FFPE) de bancos de tejidos comerciales. Las muestras se recolectaron éticamente y se consintió totalmente para cumplir con las condiciones de la Ley de tejidos humanos del Reino Unido de 2006. En los casos en LOS que las muestras se recolectaron DE FORMA prospectiva, nuevamente se recolectaron bajo la guía de LA LREC y los pacientes dieron su consentimiento total. Las muestras se fijaron con formalina durante 24 horas y se procesaron en cera parafina usando protocolos estándar. Para la inmunohistoquímica, las secciones se hidrataron y luego se recuperaron los antígenos utilizando un protocolo de microondas o utilizando recuperación en instrumento "integrado". Las secciones se marcaron en una Leica BondMax o en un instrumento Ventana Discovery. La expresión de ATAD2 se detectó usando un anticuerpo policlonal de conejo anti-ATAD2 generado internamente. Los sitios de unión del anticuerpo se visualizaron usando amplificación de polímero patentada (Leica) o un sistema de biotina avidina (Ventana) con 3,3'-diaminobenzidina (DAB) como cromógeno y se contratiñeron con hematoxilina en ambos casos. Las secciones se escanearon analizaron usando un Hamamatsu Nanozoomer.

Materiales:

Tampón Miltenyi: PBS sin Ca ni Mg, BSA al 0,5 %, EDTA 5 mM
 Esferas CD14 Miltenyi (MACS): Microesferas CD14, 2 ml humanas, contiene BSA al 0,1 %, azida al 0,05 %.
 BSA: Albúmina, polvo de fracción V bovina (Sigma A-1933)
 EDTA: ácido etilendiaminotetraacético (Sigma E-7889). conc. de reserva 0,5M
 ARNip: Todos los ARNip se obtuvieron de Qiagen.
 PHA-P; PMA; ionomicina; metanol y anti-ATAD2 (policlonal de conejo) adquiridos en Sigma.
 geles bis-tris al 4 %-12 %; nitrocelulosa; tampón de carrera MOPS; tampón de transferencia y Alexa FlourTM 680
 anti-conejo de burro; RMP1 1640; suero bovino fetal; L-glutamina; penicilina; estreptomycin y placas de seis pocillos adquiridas de Invitrogen.
 IL-2 adquirida de &D systems
 Kit de aislamiento de linfocitos T CD4+ adquirido de Miltenyi biotech
 Anti-histona H3 (policlonal de conejo) adquirido de Abcam
 Anti-CD3 (clon UCHT1) y anti-CD28 (clon 28.2) adquiridos de BD pharmingen.
 Marcadores de las calles adquiridos de Li-Cor.

Referencias

- (1) Struhl K. Histone acetylation and transcriptional regulatory mechanisms. *Genes Dev.* 1 Mar 1998;12(5):599-606.
- (2) Jeanmougin F, Wurtz JM, Le Douarin B, Chambon P, Losson R. The bromodomain revisited. *Trends Pharmacol Sci.* 1997 May;22(5):151-3.
- (3) Tamkun JW, Deuring R, Scott MP, Kissinger M, Pattatucci AM, Kaufman TC, Kennison JA. Brahma: a regulator of *Drosophila* homeotic genes structurally related to the yeast transcriptional activator SNF2/SWI2. *Cell.* 1992 Feb 7;68(3):561-72.

- (4) Wolters NM, MacKeigan JP. From sequence to function: using RNAi to elucidate mechanisms of human disease. *Cell Death Differ.* 2008 May;15(5):809-19.
- (5) Sethi G, Sung B, Kunnumakkara AB, Aggarwal BB. Targeting TNF for Treatment of Cancer and Autoimmunity. *Adv Exp Med Biol.* 2009; 647:37-51.
- 5 (6) Mosser, DM, Zhang, X. Interleukin-10: new perspectives on an old cytokine. *Immunol Rev.* 2008; 226: 205-218.
- (7) Wettig, SD, Verrall, RE, Foldvari, M. Gemini surfactants: a new family of building blocks for non-viral gene delivery systems. *Curr. Gene Ther.* 2008 Feb 8 (1):9-23.

REIVINDICACIONES

1. Un inhibidor de la proteína que contiene bromodominio ATAD22 para su uso en el tratamiento de enfermedades y afecciones autoinmunitarias e inflamatorias.

5 2. Una formulación farmacéutica para su uso en el tratamiento de enfermedades o afecciones autoinmunes e inflamatorias, que comprende un inhibidor de la proteína que contiene bromodominio ATAD2, junto con al menos un vehículo farmacéutico.

3. Un procedimiento de identificación de compuestos que serán útiles en el tratamiento de enfermedades y afecciones autoinmunitarias e inflamatorias, que comprende la etapa de determinar si el compuesto inhibe, o la etapa de determinar si el compuesto activa, la proteína que contiene bromodominio ATAD2.

10

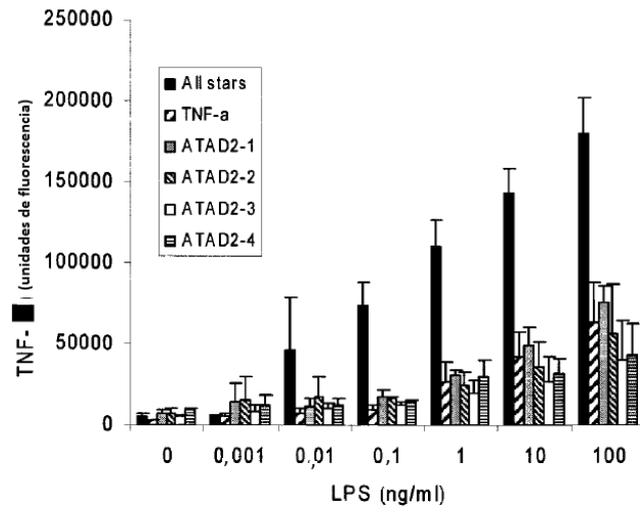
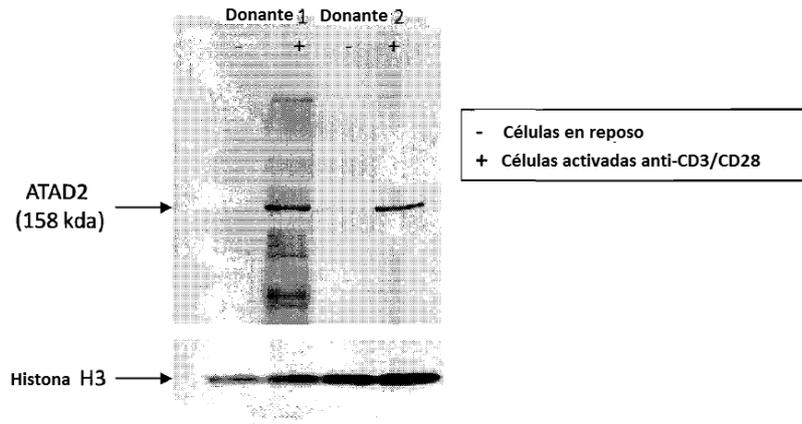


Figura 1

A



B

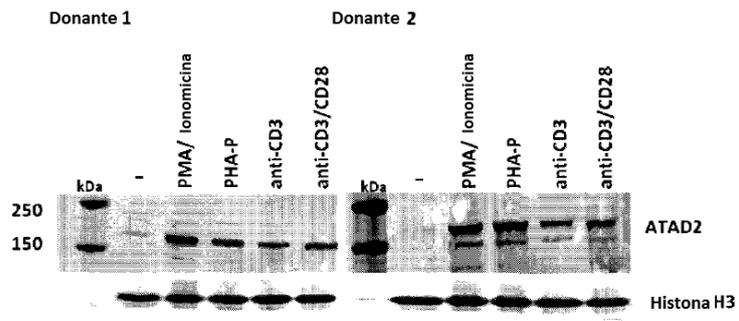


Figura 2

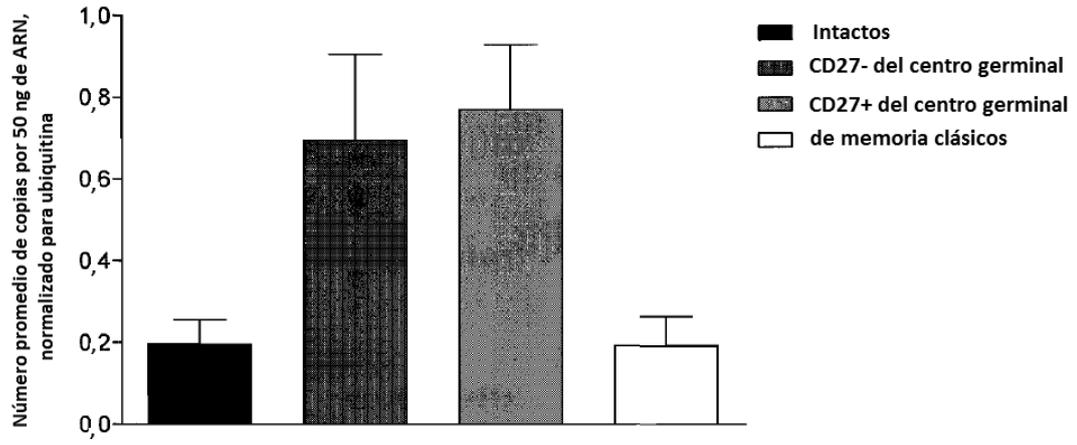


Figura 3

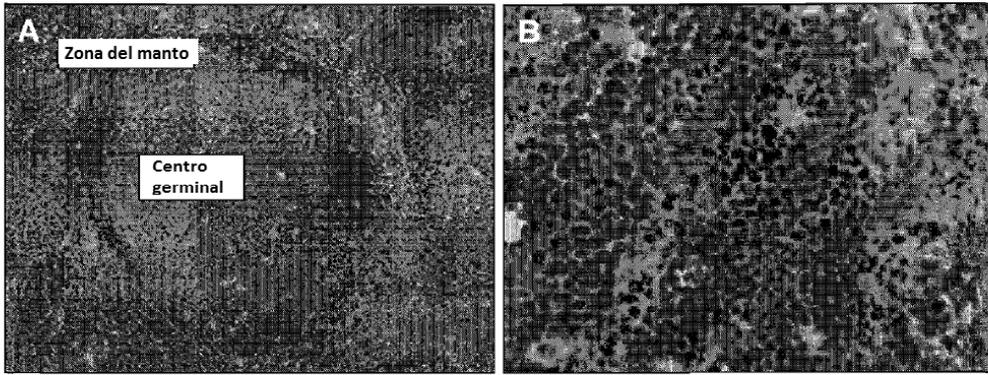


Figura 4

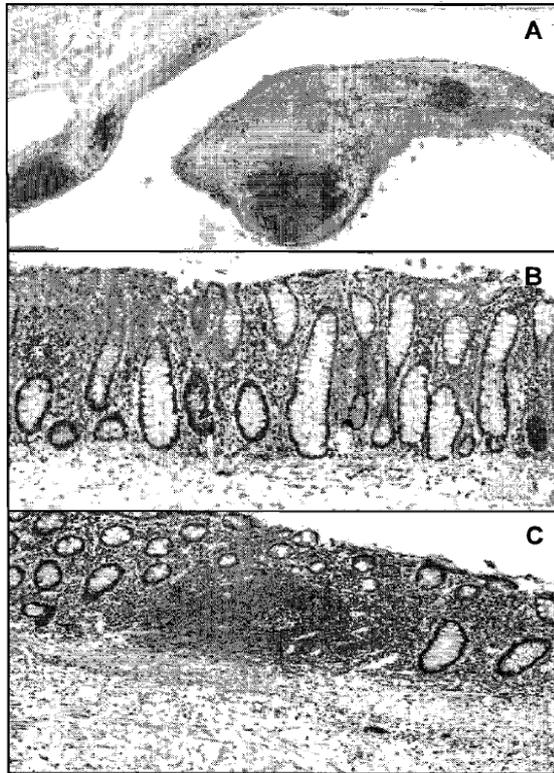


Figura 5