

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 744 245**

51 Int. Cl.:

A61K 31/42 (2006.01)

A61P 37/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.04.2013 PCT/US2013/037020**

87 Fecha y número de publicación internacional: **24.10.2013 WO13158792**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.04.2013 E 13721573 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.06.2019 EP 2854805**

54 Título: **Compuestos que tienen actividad inmunomoduladora**

30 Prioridad:

17.04.2012 US 201261625635 P

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

24.02.2020

73 Titular/es:

**GENEONE LIFE SCIENCE INC. (100.0%)
The Pinnacle Gangnam, 10th Floor, 343
Hakdong-ro, Gangnam-Gu
Seoul 06060, KR**

72 Inventor/es:

**SARDESAI, NIRANJAN y
KIM, J.JOSEPH**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 744 245 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

Compuestos que tienen actividad inmunomoduladora

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere al uso de compuestos para uso en el tratamiento de la encefalomiелitis autoinmune o lupus eritematoso sistémico.

10 Antecedentes de la invención

La mejor comprensión de las vías inmunopatogénicas involucradas en la aparición de enfermedades autoinmunes, inflamaciones crónicas u otras enfermedades mediadas por el sistema inmune, ha permitido investigar para identificar el papel clave que las citoquinas, como IL-6, IL-23, TNF- α , TNF- β , IL-1 β , IL-12, IL-18 e IFN- γ , juegan en las enfermedades autoinmunes mediadas por células T. En particular, la evidencia experimental sugiere un papel patogénico clave para TNF- α en la patogénesis de la artritis reumatoide. Esta evidencia se ha traducido con éxito al estadio clínico como inhibidores específicos, a saber, un anticuerpo monoclonal neutralizante y una proteína de fusión del receptor de TNF, que actualmente están aprobados para el tratamiento de pacientes con artritis reumatoide.

Estudios clínicos dobles ciegos han demostrado que la neutralización de TNF- α puede abrogar completamente la etapa temprana de la inflamación. Los inhibidores específicos de TNF- α pueden prevenir la inflamación, en contraste con el ácido acetilsalicílico que disminuye la inflamación. Al principio, el tratamiento se administró a pacientes con enfermedad avanzada. Tras el gran éxito beneficioso de la medicación, los médicos comenzaron a tratar a los pacientes en una etapa temprana de la enfermedad. El tratamiento con el medicamento anti-TNF- α ahora se utiliza en otras enfermedades autoinmunes, como la enfermedad de Crohn y la psoriasis. Sin embargo, la producción de los inhibidores específicos de TNF es compleja y costosa. Además, los inhibidores anti-TNF solo pueden administrarse por vía parenteral y su uso crónico puede implicar un mayor riesgo de desarrollar tuberculosis.

La demostración de los efectos beneficiosos de los inhibidores específicos de TNF en la artritis reumatoide, la enfermedad de Crohn y la psoriasis ha generado esfuerzos para descubrir pequeños compuestos disponibles por vía oral que inhiben la síntesis y/o la acción de TNF endógeno y posiblemente otras citoquinas que incluyen IL-18, IL-6, IL-23, IFN- γ , IL-1, IL-12, u otras citoquinas.

Las enfermedades autoinmunes son enfermedades inmunomediadas que pueden definirse de acuerdo con el órgano que es atacado, el mecanismo de ataque, la mediación del autoanticuerpo o las células T, y el desarrollo de los procesos de inflamación crónica a través de las citoquinas. La evidencia creciente sugiere una contribución patogénica importante de los fenómenos autoinmunes a aterosclerosis, enfermedad psiquiátrica, esquizofrenia, epilepsia, calvicie, enfermedad de úlcera péptica y otros.

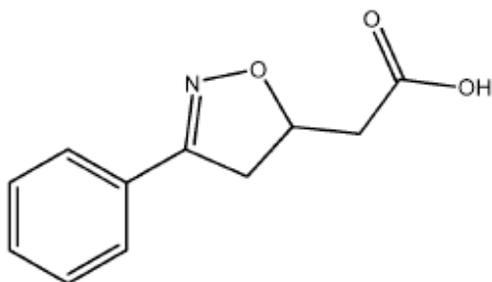
Las enfermedades autoinmunes pueden afectar a todos los órganos o tejidos. Existen enfermedades autoinmunes que afectan el sistema nervioso, como la esclerosis múltiple. Esta grave enfermedad daña el cerebro y provoca parálisis. Otras enfermedades autoinmunes que afectan el sistema nervioso son la miastenia gravis y el síndrome de Guillain-Barré. La miastenia gravis es una enfermedad caracterizada por una debilidad muscular extrema en la que se destruye el receptor que transmite el impulso eléctrico del nervio al músculo. Sin la transmisión, no hay contracción muscular y, por lo tanto, se desarrolla una debilidad muscular. El síndrome de Guillain-Barré puede desarrollarse después de una infección o vacunación. Existen enfermedades autoinmunes que afectan las articulaciones, como el lupus y la artritis reumatoide que causa deformidades en las articulaciones. Finalmente, hay enfermedades autoinmunes que dañan el corazón, los riñones y los pulmones.

Por consiguiente, existe la necesidad de que los inhibidores de base amplia supriman los trastornos inmunes, incluyendo el aumento de los niveles de TNF- α , IL-18, IL-6 e IL-23. Además, todavía hay una necesidad de nuevos tratamientos que mejoren, reduzcan y/o traten las enfermedades autoinmunes que se manifiestan a través de una vía proinflamatoria que involucre niveles elevados de TNF- α , IL-18, IL-6 e IL-23, incluyendo artritis, diabetes tipo I, colitis, uveítis y lupus eritematoso sistémico, por ejemplo.

55 Resumen de la invención

El objeto para el que se busca protección es como se define en las reivindicaciones adjuntas.

60 La presente invención proporciona un compuesto, en el que el compuesto es ácido 3-fenil-4,5-dihidro-5-isoxazoleacético representado por la fórmula:

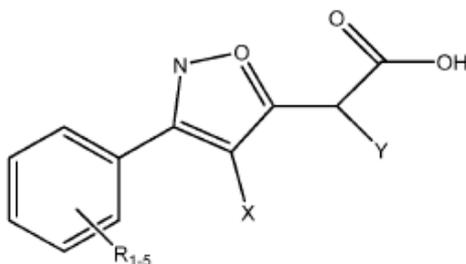


VGX-1027 o Fórmula II

para usar en un método para tratar la encefalomiелitis autoinmune o lupus eritematoso sistémico.

5 La presente invención también proporciona una composición farmacéutica que comprende el compuesto de la invención para uso en un método para tratar la encefalomiелitis autoinmune o lupus eritematoso sistémico.

10 La presente divulgación está dirigida a un método para tratar un trastorno inmune en un sujeto que así lo requiera. El método puede comprender administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto que tenga la siguiente fórmula:



(Fórmula I)

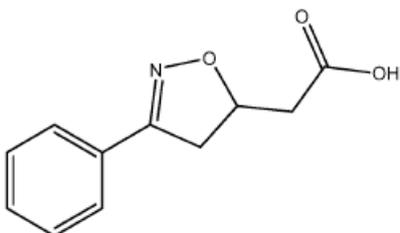
al sujeto que así lo requiera,

15 en donde R₁₋₅ representa de uno a cinco sustituyentes seleccionados independientemente de grupos hidrógeno, nitro, ciano, alquilo C₁-C₃, halógeno, carboxi, amino, trifluorometilo, hidroxí, alcoxi C₁-C₃,

20 X es hidrógeno, halo, N₃, SH, =O, =CH₂, un anillo aromático, preferiblemente fenilo, opcionalmente sustituido con grupos R₁₋₅ como se definió anteriormente, grupos amino, mono o disustituidos en donde los sustituyentes se seleccionan de grupos alquilo C₁-C₄, fenilo o bencilo opcionalmente sustituidos con grupos R₁₋₅ como se definió anteriormente,

25 Y es hidrógeno, alilo C₁-C₄, amino, o un grupo de fórmula -(CH₂)₀₋₁A en donde A es un anillo aromático, preferiblemente fenilo, opcionalmente sustituido con grupos R₁₋₅ como se definió anteriormente con la condición de que cuando X e Y son hidrógeno, R₁₋₅ no puede representar un grupo 4-hidroxí o 4-alcoxi.

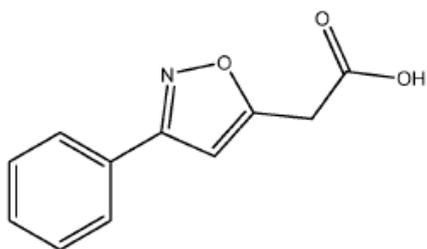
El compuesto de fórmula I puede ser ácido 3-fenil-4,5-dihidro-5-isoxazoleacético representado por la fórmula:



VGX-1027 o Fórmula II

30

El compuesto de fórmula I puede ser ácido 3-fenil-5-isoxazoleacético, representado por la fórmula:



Fórmula III

5 El trastorno puede ser un trastorno autoinmune, enfermedad de Crohn, psoriasis, dermatosis inflamatoria, diabetes tipo I, infección por VIH, cáncer, isquemia-reperusión, hepatitis y/o síndrome de Guillain-Barré. Preferiblemente, el trastorno puede ser un trastorno autoinmune. El trastorno autoinmune puede ser artritis reumatoide, diabetes tipo II, esclerosis múltiple o rechazo agudo de injertos, por ejemplo.

10 El trastorno puede tratarse o aliviarse mediante la inhibición de la producción/secreción de TNF- α ; la producción de células T Th17; la producción de IL-18; la producción de IL-6; la producción de IL-23; la inhibición de la activación de STAT3; y una combinación de los mismos.

15 La presente divulgación también se refiere a métodos para tratar una enfermedad caracterizada por niveles aumentados de IL-6, IL-23 o IL-18. Estos métodos pueden comprender administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto que tiene la fórmula I como se muestra anteriormente y se describe en el presente documento. Los compuestos de fórmula I pueden ser ácido 3-fenil-4,5-dihidro-5-isoxazoleacético. Véase la Fórmula II arriba. El compuesto de Fórmula I puede ser ácido 3-fenil-5-isoxazoleacético. Véase Fórmula III más arriba. La enfermedad asociada o caracterizada por niveles elevados de IL-6 puede ser diabetes tipo II, plasmocitosis, artritis reumatoide, artritis crónica juvenil de inicio sistémico, osteoporosis, psoriasis, enfermedad autoinmune, como artritis inducida por antígeno, encefalomiелitis alérgica, enfermedad inflamatoria intestinal, o enfermedad de Castleman. La enfermedad asociada o caracterizada por niveles elevados de IL-18 puede ser la enfermedad celíaca, la enfermedad periodontal o la enfermedad de Crohn. La enfermedad asociada con, o caracterizada por, niveles elevados de IL-23 puede ser una inflamación autoinmune, como la encefalomiелitis autoinmune.

25 Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra la concentración en plasma de VGX-1027 en ratones después de la administración intraperitoneal (i.p.).

30 La Figura 2 muestra el efecto de VGX-1027 en (A) la producción de TNF- α después de la estimulación con IL-1 β /INF- γ y (B) muerte celular luego de la estimulación con IL-1 β /INF- γ o IL-1 β /INF- γ /TNF- α . Ambos resultados se determinaron 48 horas después de la estimulación y se agregó VGX-1027 en el momento de la estimulación.

35 La Figura 3 muestra las rutas de IL-1 β y TLR que se requieren para la producción de citoquinas inflamatorias. Véase Trinchieri and Sher, 2007, Nat. Rev. Immunol., 7: 179-190.

40 La Figura 4 muestra que VGX-1027 inhibe la producción de TNF- α después de la activación de TLR-2, -4 y/o -6, pero no de TLR-3. (A) Los macrófagos provocados por el tioglicolato (1×10^6 /ml) se estimularon con LPS (5 μ g/ml), zimósán (ZYM, 50 μ g/ml), MDP (25 μ g/ml) o Poli(I:C) (50 μ g/ml) en presencia o ausencia de VGX-1027 (10 μ g/ml). TNF- α se midió 48 horas después del tratamiento. (B) Las fosforilaciones relativas de I- κ B α y p38 se midieron en los puntos de tiempo indicados después de la estimulación con LPS (5 μ g/ml). El eje y se presenta como un cambio en comparación con los valores obtenidos de cultivos tratados con LPS solo. * $p < 0.05$.

45 La Figura 5 muestra que VGX-1027 no es citotóxico y muestra una inhibición específica de tipo celular de la producción de TNF- α inducida por LPS. (A) La viabilidad celular se midió mediante el ensayo MTT después de 48 horas de tratamiento. (B) Los niveles de TNF- α se midieron 48 horas después de la estimulación con LPS (5 μ g/ml). (C) Las células T CD4 se estimularon con perlas de ConA (10 μ g/ml) o anti-CD3/CD28 (10 μ g/ml) y la proliferación se midió a través de la incorporación de timidina 3H.

50 La Figura 6 muestra que VGX-1027 inhibe la producción de citoquinas de DC inducida por LPS. Las CD humanas derivadas in vitro se trataron con LPS (5 μ g/ml), con o sin VGX-1027 (10 mM) durante 72 horas. Las concentraciones de las citoquinas en los medios se midieron mediante ELISA.

55 La Figura 7 muestra que VGX-1027 inhibe la maduración inducida por LPS de células dendríticas in vivo. Los ratones recibieron VGX-1027 (0.5 mg/ratón) o un control, y luego se inyectaron con LPS (25 μ g/ratón) 1 hora después. A las 3 horas posteriores a la administración de LPS, se sacrificaron los ratones y se midió (A) % de DC esplénicas con CD86 y (B) MFI de CD86 de las células CD86+.

- La Figura 8 muestra que VGX-1027 previene el desarrollo de células T Th17 a través de un mecanismo celular autónomo. Las células T CD4 purificadas (CD3⁺ CD4⁺ CD45RA⁺ CD25⁻ HLA-DR) se incubaron con 10 µg/ml de IL-2, 10 ng/ml de IL-1β, 10 ng/ml de IL-23, 1 µg/ml de anti-IL-4, 1 µg/ml de perlas de activación anti-IFNγ y anti-CD3/CD28 en una proporción de 1 perla por célula más TGF-β (1ng/mL). El día 6, las células se incubaron en presencia de 50 ng/ml de PMA y 500 ng/ml de ionomicina durante 5 horas. Las células se analizaron para determinar la tinción intracelular de IL-17A e IFN-γ. (A) Análisis FACS de células CD4⁺ e IL-17⁺ con el porcentaje que se muestra en el cuadrante superior derecho. (B) Intensidad media de fluorescencia (MFI) de las células T IL-17⁺. (C) Concentración de IL-17 en los medios. La concentración de VGX-1027 fue de 10 mM.
- La Figura 9 muestra que VGX-1027 protege a los ratones de una dosis letal de LPS. VGX-1027 se administró por vía intraperitoneal (A) u oral (p.o.) (B), y se evaluó su efecto sobre la tasa acumulativa de letalidad inducida por LPS. Se muestran datos de 2 a 3 experimentos independientes. El análisis estadístico se realizó mediante Logrank (Mantel-Cox). *p<0.05 fue tomado como significativo. Cada grupo se compara con el grupo tratado con vehículo.
- La Figura 10 muestra que VGX-1027 reprime la pleuritis inducida por CAR. VGX-1027 se administró por vía intraperitoneal u oral, y se determinó la producción de volumen de exudados (A), infiltración de PCN (B) y actividad de MPO (C) en los pulmones. Los datos son medias ± SD de 2 experimentos independientes.
- La Figura 11 muestra el efecto de VGX-1027 en la colitis inducida por DNBS. Se inyectó DNBS a ratones en el recto y se les administró VGX-1027 una hora más tarde; 4 días después, los ratones se sacrificaron y se aislaron y analizaron colonos. Se determinó la variación en el peso corporal total (A), la consistencia de las heces (B), la puntuación macroscópica (C), las áreas necróticas 9D, el peso del colon (E) y la cantidad de citoquinas en el homogeneizado de colon. La puntuación macroscópica se determinó mediante los siguientes criterios: 0 = sin daño; 1 = hiperemia y/o edema localizados; 2 = úlcera lineal < la mitad del ancho del colon; 3 = úlcera lineal > la mitad del ancho del colon; 4 = úlcera circular < 1 cm; 5 = úlcera circular entre 1 y 2 cm; 6 = úlcera circular > 2 cm.
- La Figura 12 muestra que VGX-1027 previene la aparición de diabetes tanto en modelos espontáneos como en modelos STZ. (A) Los ratones NOD de 12 semanas de edad euglicémicos se trataron por vía intraperitoneal con 20 mg/kg de peso corporal VGX-1027 o su vehículo seis veces a la semana desde la semana 12 hasta la semana 25 de edad. Un grupo de control adicional de ratones se dejó sin tratar. Cada grupo estaba formado por 16 ratones. Los datos son representativos de dos experimentos independientes que se fusionaron debido a una variabilidad entre estudios inferior al 10%. El análisis estadístico fue realizado por Logrank (Mantel-Cox). (B) Niveles de glucosa en plasma en ratones CBA/H de control que recibieron STZ (40 mg/kg/día, durante 5 días consecutivos) junto con 12 inyecciones diarias de vehículo (STZ) con intraperitoneo, o en ratones tratados con STZ y VGX-1027 se administra como un tratamiento continuo de 12 días. 100 mg/kg pc de VGX-1027, administrado por vía oral desde el día -1 hasta el día +10. Los resultados de un experimento representativo se presentan como media ± desviación estándar para siete a ocho ratones por grupo. *p<0.05 se refiere al tratamiento con MLD-STZ.
- La Figura 13 muestra que VGX-1027 contrarresta el efecto inductor de uveítis del LPS en ratas. Las ratas se trataron con VGX-1027 a los 30 minutos (A) y 6 y 12 horas (B) después de la inyección de LPS (9200 g/plantar). Los ratones fueron evaluados 16 horas después de la inyección de LPS. Se administró dexametasona (1 mg/kg) como control positivo. *p<0.0001 vs. vehículo.
- La Figura 14 muestra los efectos de la terapia con VGX-1027 en el desarrollo de artritis inducida por colágeno tipo II (CIA). VGX-1027 se administró por vía intraperitoneal y se midió para una puntuación artrítica (A), se midió la puntuación artrítica acumulativa (B), el edema de las patas traseras (C) y la puntuación histológica (D). Los datos se muestran como valores medios ± SD de 2 experimentos independientes. El análisis estadístico se realizó mediante la t de Student. *p<0,001 fue tomado como significativo.
- La Figura 15 muestra los efectos inmunes de VGX-1027 ex vivo en células mononucleares de sangre periférica (PBMC). Las PBMC humanas normales se aislaron y se cultivaron en presencia de LPS (5 µg/ml) con o sin plasma tratado con VGX-1027. Las muestras de plasma se obtuvieron por extracción de sangre antes y en el quinto día después de la administración de VGX-1027 en estado estable. Se analizaron los sobrenadantes libres de células para determinar la producción de TNF-α e IL-1β 24 horas después del tratamiento. Los niveles de citoquinas (pg/ml) se analizaron por ELISA. Los resultados representativos se correlacionaron con la inhibición proinflamatoria de citoquinas.
- Figura 16. (A) Análisis de componentes principales (PCA) del transcriptoma expresado en PBMC sin tratamiento previo, PBMC estimuladas in vitro con LPS o tratadas con VGX-1027 después de la administración de LPS. La PCA se realizó en todos los genes para determinar las tendencias de expresión dentro del conjunto de datos. (B) K-mean clustering de genes expresados diferencialmente. El eje x corresponde a las condiciones experimentales, el eje y a los niveles de expresión. Cada línea representa un gen. (C, D) La regulación diferencial de los genes relacionados con las categorías KEGG "Procesamiento y Presentación de Antígenos" (C) o "Ciclo Celular" (D) se muestra como mapa de calor después de un agrupamiento jerárquico no supervisado.
- Figura 17. Inmunoprecipitación Western (A) y análisis densitométrico relativo (B) de los niveles de fosfo-STAT3 en células T CD4⁺ después de la estimulación con IL-6.

Figura 18. Proporción de supervivencia de ratones expuestos a SEB y tratados con un solo i.p. dosis de VGX-1027 o vehículo. La supervivencia fue monitorizada durante 48 horas.

5 Figura 19. Efectos de la administración de VGX-1027 en la tasa de supervivencia (A), proteinuria (B) y anticuerpos séricos anti-ADNds (C) de ratones NZB/NZW F1 tratados durante 20 semanas con VGX-1027 o vehículo.

Figura 20. Análisis histopatológico (A) y niveles relativos de fosfo-STAT3 (B) en una muestra de riñón de ratones NZB/NZW F1 tratados durante 20 semanas con VGX-1027 o vehículo.

10 Figura 21. Se muestra un gráfico de líneas que muestra los niveles de PK en sujetos humanos que formaron parte de un estudio de dosis única ascendente controlado con placebo para evaluar la seguridad y la farmacocinética de VGX1027 en sujetos sanos. Los sujetos fueron administrados desde 1 mg hasta 800 mg de VGX1027.

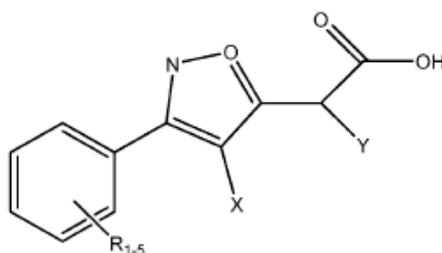
15 Figura 22. Se muestra un gráfico lineal que muestra los niveles de PK en sujetos humanos que formaron parte de un estudio de dosis múltiple ascendente controlado con placebo para evaluar la seguridad y la farmacocinética de VGX1027 en sujetos sanos. Los sujetos fueron administrados de 1 mg a 400 mg de VGX1027.

20 Descripción detallada de la invención

Los compuestos de isoxazolina se han descrito como inhibidores de la fosfodiesterasa tipo IV (Patente de los Estados Unidos No. 5,716,967), antagonistas del receptor de fibrinógeno (Patente de los Estados Unidos No. 5,849,736), inhibidores de la liberación de TNF (Patente de los Estados Unidos No. 6,114,367) y como factor inhibidor de la migración de macrófagos (MIF) antagonistas (documento WO 02/100332).

25 Se ha encontrado ahora que los compuestos de fórmula I, que difieren de los descritos en las Patentes de los Estados Unidos No. 5,716,967, Patente de los Estados Unidos No. 5,849,736 y el documento WO 02/100332 en ausencia de un grupo hidroxilo o alcoxi en la posición para del anillo de fenilo, inhibe la síntesis de IL-1 β , TNF- α e IL-10, y evita la activación de NF κ B.

30

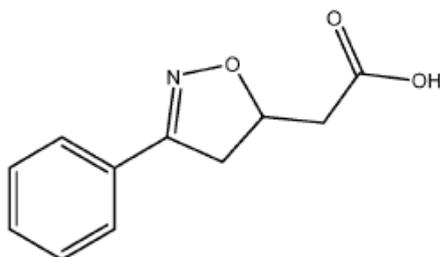


Fórmula I

35 En la fórmula I, R₁₋₅ representa de uno a cinco sustituyentes seleccionados independientemente de hidrógeno, nitro, ciano, alquilo C₁-C₃, halógeno, carboxi, amino, trifluorometilo, hidroxilo, grupos alcoxi C₁-C₃, X es hidrógeno, halo, N₃, SH, =O, =CH₂, un anillo aromático, preferiblemente fenilo, opcionalmente sustituido con grupos R₁₋₅ como se definió anteriormente, amino, grupos amino mono o disustituidos en los que los sustituyentes se seleccionan de alquilo C₁-C₄, grupos fenilo o bencilo opcionalmente sustituidos con grupos R₁₋₅ como se definió anteriormente, Y es hidrógeno, alilo C₁-C₄, amino, o un grupo de fórmula -(CH₂)₀₋₁A en donde A es un anillo aromático, preferiblemente fenilo, opcionalmente sustituido con R₁₋₅ grupos como se definió anteriormente con la condición de que cuando X e Y son hidrógeno, R₁₋₅ no puede representar un grupo 4-hidroxilo o 4-alcoxi.

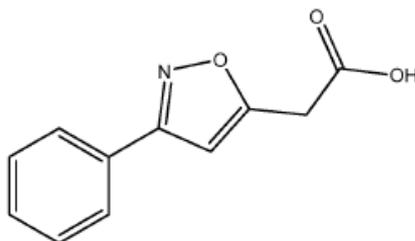
45 Algunos de los compuestos de fórmula I son conocidos o pueden prepararse por métodos conocidos. El compuesto en donde R y R' son tanto hidrógeno como un sistema de anillo de 4,5-dihidroisoxazolina ha sido reportado por Synth. Comm., 1998, 28(13), 2457-2466 y de Synth. Comm., 1997, 27(16), 2733-2742.

50 La divulgación descrita en este documento se refiere, por lo tanto, al uso de compuestos de fórmula I para la preparación de un medicamento para el tratamiento de aquellas enfermedades que pueden aliviarse mediante la inhibición de TNF- α , TNF- β , IL-1 β y/o IL-10 asociado o no a la activación desregulada de NF κ B. Los compuestos preferidos de fórmula I son ácido 3-fenil-4,5-dihidro-5-isoxazoleacético (en lo sucesivo denominado VGX-1027 o Fórmula II):



VGX-1027 o Fórmula II

y ácido 3-fenil-5-isoxazoleacético (en adelante Fórmula III):



Fórmula III

así como sus sales farmacéuticamente aceptables, tales como sales de sodio, potasio, calcio y similares. VGX-1027 es particularmente preferido.

El compuesto de la invención es particularmente útil para el tratamiento de patologías humanas mediadas por TNF- α , TNF- β , IL-1 β y/o IL-10 asociadas o no asociadas a una activación de NF κ B. Dichas patologías incluyen enfermedades inmunoinflamatorias, autoinmunes e infecciosas que incluyen artritis reumatoide, enfermedad de Crohn, psoriasis y dermatosis inflamatorias, diabetes tipo I, infecciones por VIH, cáncer, isquemia-reperfusión, hepatitis, esclerosis múltiple, síndrome de Guillain-Barré y prevención del rechazo agudo del injerto.

La invención, por lo tanto, también se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden un compuesto de la invención como el ingrediente activo en mezcla con un vehículo o excipientes adecuados.

a. Preparación de VGX-1027

Se disolvieron benzaldehído (32.8 mmol) e hidrocloreto de hidroxilamina (33 mmol) en metanol (100 ml) seguido de la adición de carbonato de sodio (65 mmol). La reacción durante la noche dio el derivado de oxima en 95% (2, 30.4 mmol). La cloración de la oxima usando N-clorosuccinimida (31.6 mmol) en DMF (100 ml) proporcionó cuantitativamente la cloroxima (3). El compuesto 3 se disolvió luego en THF/H₂O (*0/20) y se trató con 3-butenato (24.5 mmol) y carbonato de sodio (73.6 mmol). Una vez completado, (12 h), el producto se extrajo con acetato de etilo y los extractos orgánicos se lavaron con salmuera y se secaron sobre sulfato de magnesio. El GIT-27 se cristalizó en una mezcla de acetato de etilo/heptano. La estructura se confirmó mediante 1H-RMN, 13C-RMN y espectroscopía de masas. El régimen de dosificación diaria probablemente variará dentro de amplios rangos, por ejemplo, de 0.1 a 10 mg /k de peso corporal.

b. Absorción, distribución, metabolismo y eliminación (ADME) de VGX-1027

Para determinar las propiedades farmacocinéticas de VGX-1027, se analizaron las concentraciones de fármaco en plasma de ratones. El fármaco se midió después de la administración intraperitoneal a 20 mg/kg de peso al nacer en Na₂HPO₄ 500 mM, que es una concentración terapéuticamente activa. La concentración en plasma máxima del fármaco fue de 130 μ g/ml (C_{max}) y se observó después de 2 horas (T_{max}) tras la aplicación. Véase la Figura 1. La concentración del fármaco fue superior a 80 μ g/ml, que está muy por encima de la concentración requerida para ejercer efectos inmunofarmacológicos, 30 minutos después de la inyección, y finalmente disminuyó por debajo de 10 μ g/ml 6 horas después de la inyección. Sobre la base de la parte lineal del perfil farmacocinético, el $t_{1/2}$ de VGX-1027 es de aproximadamente 90 minutos.

Con respecto a la biodisponibilidad oral en ratones y perros, VGX-1027 se absorbió rápidamente. Las concentraciones plasmáticas más altas generalmente ocurrieron en 1-2 horas. Parece que hay un bajo potencial de interacciones farmacológicas, ya que no hubo una inhibición significativa de las enzimas CYP450 (1A2, 2C9, 2C19, 2D6 o 3A4). El nivel más alto de inhibición fue de ~35% para 2C19 a una concentración de 30 μ M. La alteración metabólica del anillo de isoxazol, la oxidación única y la glucuronidación individual no son vías del metabolismo, ya que no se observaron picos de metabolitos para las 3 masas monitorizadas para ninguna especie. Por último, VGX-1027 es estable en las fracciones S9 del hígado humano (con cofactores de fase 1 y 2) con $t_{1/2}$ >90 minutos, lo que indica una baja probabilidad de metabolismo en el hígado. No hubo inhibición significativa de la actividad de COX-1 o COX-2.

El VGX-1027 fue negativo en un ensayo de unión de radioligandos (MDS Pharma HitProfiling Screen) que probó 30 objetivos moleculares primarios a concentraciones de hasta 10 μ M. No se observó una respuesta significativa (\geq 50% de inhibición o estimulación para ensayos bioquímicos).

5 c. Estudios de toxicología en perros y ratones

Se realizaron estudios de toxicología de veintiocho días tanto en ratones como en perros con concentraciones crecientes para lograr la toxicidad. Los siguientes son los resultados de esos estudios.

10 En la dosis más alta (500 mg/kg/día) en ratones, se observaron cambios notables en riñones, hígado, bazo, testículos, epidídimo y vejiga, incluido el aumento del peso de los órganos y los cambios en la histopatología.

15 En la dosis más alta [100 mg/kg/día] en perros, 3 muertes tempranas -2 en estado moribundo, 1 debido a una infección que tenía un miembro anterior hinchado debido a una bolsa llena de pus que fue positiva para *Staphylococcus aureus*.

20 En un estudio de aumento de la MTD en ratones, se observaron muertes prematuras en 1000, 1500 y 2000 mg/kg/día; las observaciones incluyeron temblores, convulsiones mixtas, ptosis, disminución de la actividad, frío al tacto y/o deterioro de la función de las extremidades posteriores. (La C_{max} @ [1000 mg/kg/día] aproximada fue de 400 mg/mL). Según estos estudios, se determinó que 10 mg es una dosis inicial segura en el estudio en humanos.

25 En resumen, la administración intraperitoneal de VGX-1027 (20 mg/kg de peso corporal) conduce a una C_{max} de 130 μ g/ml y una T_{max} de aproximadamente 2 horas en ratones. VGX-1027 no está sujeto a biotransformación extensa en ratones y perros. Hay un bajo potencial para interacciones farmacológicas. A dosis terapéuticas, VGX-1027 no exhibió toxicidad. Además, el VGX-1027, cuando se administra como una píldora oral, fue bien tolerado en humanos. No se observaron toxicidades en la dosis de hasta 800 mg de dosis única de QD y de hasta 200 mg dos veces al día durante 5 días. No se informaron AE de grado 3 o 4, y no se informaron SAE. El análisis de PK en orina CAT002 mostró niveles altos de fármaco en la orina.

30 2. Efectos de VGX-1027 en condiciones específicas y en sistemas modelo

35 La actividad farmacológica de VGX-1027 ha sido ampliamente estudiada tanto in vitro como in vivo. Más particularmente, se han llevado a cabo experimentos en las siguientes condiciones y modelos, de acuerdo con métodos conocidos y bien establecidos: linfoproliferación, TNF- α , interferón (IFN)- γ , IL-1 β , IL-10 y síntesis/secreción de MIF; activación de NF- κ B en macrófagos humanos; letalidad inducida por LPS murino; pleuritis murina inducida por carragenina; artritis murina inducida por colágeno tipo II; hipersensibilidad inducida por oxazolona murina; diabetes inmunoinflamatoria murina inducida por dosis bajas múltiples de estreptozotocina; y colitis inducida químicamente en ratones. Además, se realizaron estudios adicionales relacionados con VGX-1027 para determinar su efecto en enfermedades mediadas por el sistema inmune, como la enfermedad autoinmune y la inflamación crónica; sobre la inflamación in vitro y el desarrollo de células T Th17; sobre la activación de monocitos y macrófagos; y en el desarrollo de células T Th17 a través de mecanismos autónomos celulares y no autónomos celulares. Aún más, VGX-1027 se administró por vía oral a varios modelos de ratones para estudiar su capacidad para tratar con eficacia la enfermedad autoinmune. Se investigaron los siguientes modelos de ratón de diversas enfermedades autoinmunes: letalidad inducida por LPS (inducida por endotoxinas); pleuritis (inflamación de los pulmones); colitis inmunoinflamatoria inducida por productos químicos (modelo DNBS); diabetes inducida por STZ en ratones NOD (diabetes tipo I); artritis inducida por colágeno tipo II (artritis reumatoide); uveítis inducida por endotoxinas (EIU) en ratas Lewis macho (modelo de enfermedad inflamatoria ocular); y el choque inducido por enterotoxina B (SEB) por estafilococo aureus y el modelo NZB/NZW F1 de lupus eritematoso sistémico (LES). Los resultados obtenidos realizando los experimentos enumerados anteriormente se resumen a continuación.

50 a. Efecto in vitro de VGX-1027 sobre la proliferación de linfocitos y sobre la síntesis y secreción de TNF, IFN- γ , IL-10 y MIF por macrófagos y linfocitos

55 Se aislaron macrófagos peritoneales (PM) y células mononucleares esplénicas (SMNC) de ratones normales, se cultivaron en medio nutriente y se estimularon con LPS y/o ConA en ausencia o presencia de VGX-1027. Los resultados muestran claramente que VGX-1027 inhibió notablemente la producción de TNF- α por PM y SMNC e inhibió la producción de IL-1 β IL-10 por PM. VGX-1027 no tuvo efecto en la expresión de MIF en ningún tipo de célula, en la proliferación de SMNC, y en la producción de IL-10 e Interferón (IFN) y por SMNC.

60 Capacidad de síntesis proliferativa y de citoquinas de linfocitos y macrófagos aislados de ratones tratados con G127.

65 Estos experimentos se llevaron a cabo para explorar si la administración intraperitoneal (i.p.) u oral (p.o.) en ratones con VGX-1027 podría influir en la respuesta proliferativa de SMNC y la producción de IL-1 β , IL-10, TNF- α , IFN- γ y MIF de PM y SMNC aislados. PM y SMNC aislados de ratones tratados in vivo con VGX-1027 durante 7 días consecutivos por vía intraperitoneal (0.5 mg/ratón), oralmente (2.5 mg/ratón), o aislados de animales de control que recibieron el

vehículo VGX-1027 ($\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{H}_2\text{O}$), o fueron sin ningún tratamiento. 24 h después del último tratamiento con VGX-1027, se recogieron PM y SMNC para su posterior estimulación y análisis in vitro.

5 Este experimento ex vivo muestra claramente que las PM aisladas de ratones tratados con VGX-1027 exhiben una síntesis alterada de IL-1 β , TNF- α e IL-10 mientras muestran un patrón normal de expresión de MIF en la estimulación mitogénica. Por otro lado, el SMNC aislado de ratones tratados con VGX-1027 muestra una capacidad normal para proliferar, una capacidad normal para producir TNF- α , IL-1 β , IL-10 e IFN- γ tras la estimulación, y una expresión normal patrón de expresión MIF.

10 Los hallazgos de los experimentos "in vitro" y "ex vivo" muestran de manera concordante que VGX-1027 regula a la baja la producción de IL-1 β , TNF- α e IL-10 por PM sin alterar la capacidad de SMNC para producir IFN- γ y no afecta la expresión de MIF por PM y SMNC. En contraste, los experimentos "in vitro" muestran que VGX-1027 redujo la producción de TNF- α por SMNC, mientras que los experimentos "ex vivo" no apoyan esta evidencia.

15 b. Efecto de VGX-1027 sobre la activación de NF- κ B en macrófagos humanos

Los resultados de este ensayo in vitro indican que VGX-1027 inhibe poderosamente de forma dependiente de la dosis la unión del ADN de NF- κ B que el LPS indujo en macrófagos humanos derivados de monocitos. Estos resultados proporcionan evidencia del mecanismo de acción de VGX-1027 y sugieren que los efectos inhibitorios que VGX-1027 ejerce sobre la síntesis de macrófagos de IL-1 β , TNF- α e IL-10 podrían ser secundarios a la inhibición de la unión de NF- κ B al ADN.

c. Efecto de VGX-1027 sobre la letalidad inducida por LPS in vivo

25 Este estudio in vivo mostró que la administración terapéutica de VGX-1027 contrarresta poderosamente la letalidad inducida por LPS en ratones.

30 Como se esperaba, la mayoría de los ratones de control no tratados o que recibieron el vehículo de VGX-1027 sucumbieron a la exposición a LPS en 3 días. Después de este período de observación, el seguimiento de una semana de los ratones supervivientes reveló una recuperación clínica completa. En contraste, el tratamiento con VGX-1027 administrado por vía oral o intraperitoneal protege a los ratones de los efectos letales de LPS de una manera dependiente de la dosis. Cuando se administró por vía oral, VGX-1027 fue efectivo en la dosis de 2.5 mg/ratón y se administró a dosis de 1.5 y 3 mg/ratón. Cuando se administró por vía intraperitoneal, VGX-1027 mostró una ventana terapéutica más amplia con protección dependiente de la dosis contra la letalidad inducida por LPS entre 0.25 y 0.5 mg/ratón. VGX-1027 también fue capaz de reducir significativamente la letalidad inducida por LPS cuando se administró por vía oral e intraperitoneal a dosis similares bajo un régimen profiláctico (por ejemplo, -24 y -1 hora antes de LPS).

40 d. Efecto de VGX-1027 sobre la dermatitis inducida por oxazolona

La hipersensibilidad inducida por oxazolona es una dermatitis mediada por el sistema inmune que puede ser inducida por dos exposiciones epicutáneas a la oxazolona. Mientras que la primera aplicación de oxazolona sensibiliza a los ratones, la segunda provoca la reacción de hipersensibilidad. Las manifestaciones de la dermatitis aparecen 18 horas después de la segunda exposición epicutánea a oxazolona, tanto el grosor como el peso de la oreja aumentan de manera notable y progresiva. Los estudios in vivo fueron planeados para evaluar la actividad farmacológica de VGX-1027. Los ratones fueron tratados durante o antes de la fase de sensibilización. Este experimento muestra que el grosor y el peso de la oreja aumentaron notablemente y progresivamente en los ratones que habían sido tratados con el vehículo de VGX-1027 o se dejaron sin tratar. En contraste, la hinchazón inflamatoria de la oreja, medida por el incremento del grosor y el peso de la oreja, fue suprimida significativamente por VGX-1027. En condiciones similares, la dexametasona redujo el grosor, pero no el peso de las orejas.

55 Para evaluar los efectos de VGX-1027 en la fase de provocación de la dermatitis inducida por oxazolona, el tratamiento con VGX-1027 se administró una hora después de la segunda exposición epicutánea a oxazolona y el comienzo de las respuestas inmunoinflamatorias. Bajo este régimen experimental, VGX-1027 solo afectó parcialmente el desarrollo de dermatitis alérgica. En comparación con los animales de control, los ratones tratados con VGX-1027 solo mostraron una disminución significativa en el grosor, pero no en el peso de las orejas. En este régimen experimental, la dexametasona no afectó el aumento del grosor y el peso de la oreja.

60 El resultado de este experimento muestra que el tratamiento con VGX-1027 puede suprimir con éxito la dermatitis inducida por la exposición epicutánea repetida a oxazolona cuando se administró VGX-1027 en régimen profiláctico, pero antes de la fase de sensibilización de la enfermedad.

65 Dado que la dexametasona es un potente inmunosupresor utilizado de manera amplia y efectiva para el tratamiento tópico de enfermedades inflamatorias de la piel humana, VGX-1027 muestra potenciales farmacológicos para el uso sistémico o tópico en el tratamiento de enfermedades de la piel dependientes de citoquinas mediadas por el sistema

inmunitario o tales como como la psoriasis, algunas formas de pénfigo vulgar y vasculitis cutánea durante la enfermedad de injerto contra huésped.

e. Efecto de VGX-1027 sobre la diabetes inducida por estreptozotocina

5 El tratamiento tanto intraperitoneal como oral con VGX-1027 suprimió el desarrollo clínico de la diabetes. Se intentó inducir el desarrollo clínico de la diabetes en ratones CBA/H mediante dosis bajas de estreptozotocina. Los ratones CBA/H desarrollaron hiperglucemia sostenida durante un período de 2 semanas después de las inyecciones de MLD-STZ. Como se esperaba, los ratones control CBA/H tratados con el vehículo de VGX-1027, ya sea por vía oral o intraperitoneal, desarrollaron diabetes con hiperglucemia sostenida durante un período de 2 semanas después de las inyecciones de MLD-STZ. En contraste, el efecto diabetogénico de MLD-STZ se redujo significativamente cuando los ratones se trataron con VGX-1027 por vía intraperitoneal. El fármaco también fue capaz de reducir significativamente el desarrollo de hiperglucemia cuando se administró por vía oral.

15 El tratamiento profiláctico con VGX-1027 administrado por vía intraperitoneal y por vía oral contrarrestó con éxito el desarrollo de hiperglucemia que es secundaria a la destrucción inmune mediada por células de las células β después de inyecciones consecutivas de STZ. El fármaco fue efectivo utilizando administraciones de tipo intraperitoneal y oral. Estos resultados sugieren que VGX-1027 posee propiedades farmacológicas dignas de ser consideradas para su uso clínico en el tratamiento temprano de la diabetes tipo 1 humana (T1D), así como en la prevención de la enfermedad en personas con riesgo de desarrollo, tales como aquellos familiares de primer grado de pacientes con DT1 que presentan parámetros metabólicos (secreción defectuosa de insulina) e inmunológicos (autoanticuerpos anti- β , haplotipos HLA) asociados con alto riesgo de desarrollo de DT1.

f. Efecto de VGX-1027 en la colitis inducida por DN

25 En el plazo de 5 días después del desafío con el ácido dinitrobenzeno sulfónico (DNB), los ratones desarrollan colitis. La gravedad de la enfermedad se evalúa con base en una puntuación macroscópica. Los ratones de control tratados con vehículo y los ratones no tratados desarrollaron colitis con un aumento predecible y progresivo de la inflamación y la pérdida de peso corporal. La progresión de la colitis inflamatoria se atenuó significativamente en esos animales, que habían sido tratados con VGX-1027 ($p < 0.001$). En comparación con los grupos de control, los animales tratados con VGX-1027 muestran una reducción significativa en la pérdida de peso. De acuerdo con estos datos, el aumento en el peso del colon que acompaña al desarrollo de la colitis inducida por DNB fue significativamente menor en los ratones tratados con VGX-1027 en comparación con los controles.

35 Los colonos de los ratones de control y de los ratones tratados con VGX-1027 se eliminaron, se seccionaron, se fijaron y se tiñeron con hematoxilina y eosina. En los animales tratados con VGX-1027 antes de la colitis inducida por DNB se observó una reducción en el infiltrado celular inflamatorio, el daño en la mucosa y en los músculos, así como el engrosamiento de la pared. La histología indica claramente que el daño tisular se reduce significativamente en los ratones tratados con VGX-1027 en comparación con los ratones de control. Estos datos confirman la eficacia antiinflamatoria de VGX-1027 en la colitis. La actividad de la mieloperoxidasa tisular es un marcador bien establecido para evaluar la infiltración de células inflamatorias (principalmente neutrófilos). La actividad de la mieloperoxidasa medida en los tejidos del colon recogidos de ratones tratados con VGX-1027 y de ratones de control indica claramente que los ratones tratados con VGX-1027 muestran una reducción significativa de la infiltración de células inflamatorias 5 días después de la inducción de colitis en comparación con los controles ($p < 0.0001$). Este resultado es paralelo a la reducción de neutrófilos que se infiltran en las mismas muestras de histología. Contamos con un promedio de 8.9 ± 1.2 (media \pm SD) células/campo de alta potencia de animales inducidos por DNB, mientras que solo hubo 3.37 ± 0.8 células/campo de alta potencia en animales inducidos por DNB tratados previamente con VGX-1027 ($p < 0.0001$). Estos datos demuestran que el tratamiento con VGX-1027 protege poderosamente a los animales de prueba de la colitis inducida por la administración de DNB. Los datos actuales indican que este fármaco es prometedor para su posible uso en el tratamiento de la EII humana.

g. Efecto de VGX-1027 en enfermedades mediadas por inmunidad tales como enfermedades autoinmunes e inflamaciones crónicas

55 Los resultados in vitro e in vivo obtenidos usando VGX-1027 demuestran que esta molécula tiene el potencial farmacológico de ser un fármaco interesante para el tratamiento de aquellas enfermedades que están mediadas por mecanismos inmunes como las enfermedades autoinmunes y las inflamaciones crónicas, y algunas enfermedades de la piel y endocrinitis. En general, VGX-1027 tiene un potencial en la terapia de aquellas enfermedades que están mediadas por IL-1 β , TNF- α u otras citoquinas.

60 Debido a que la IL-10 tiene propiedades antiinflamatorias (World J. Gastroenterol., 10; 620, 2004), el efecto inhibitor que ejerce VGX-1027 sobre la síntesis de macrófagos de esta citoquina puede parecer que no es consistente con el uso de este fármaco en enfermedades inmunoinflamatorias. No obstante, también se ha demostrado que la IL-10 ejerce efectos proinflamatorios en diferentes modelos de roedores, como la uveítis inducida por endotoxinas (J. Immunol., 1995, 155: 4090-4), diabetes tipo 1 (J. Immunol. 2000, 165: 2841-9), lupus eritematoso sistémico (Arthritis Rheum. 2000, 43: 1790-800) y orquitis autoinmune experimental (Cytokine. 2003, 22: 50-3). Por lo tanto, es posible

que, bajo ciertas circunstancias, la reducción de la síntesis de IL-10 pueda aumentar la eficacia antiinflamatoria de un medicamento. Esto también es consistente con el hecho de que la ciclosporina A, que se usa ampliamente en el entorno clínico para el tratamiento de enfermedades autoinmunes, también regula a la baja la síntesis de IL-10 in vitro (J. Exp Med. 199317: 551-5). Además, dado que se ha pensado que la producción exuberante de IL-10 desempeña un papel patógeno en ciertos cánceres (Immunol Rev. 2004 diciembre; 202: 223-36; Br J Haematol. 2003, 122: 927-33) e infecciones por VIH (Blood. 2003, 101: 2514-20), la capacidad de VGX-1027 para subregular la síntesis de esta citoquina representa una razón potencial para la investigación potencial de este medicamento en estas enfermedades.

Para los usos terapéuticos considerados, los compuestos de fórmula I se administrarán por vía oral, parenteral, transdérmica o transmucosa en forma de composiciones adecuadas en mezcla con un vehículo convencional o excipientes, preparados de acuerdo con métodos conocidos. La dosificación dependerá de varios factores, como la gravedad de la patología, el tipo de paciente (edad, sexo y peso) y, de todos modos, será fácilmente determinado por el experto en la materia basándose en las propiedades toxicológicas y farmacocinéticas del fármaco.

h. VGX-1027 exhibe efectos antiinflamatorios in vitro y reprime el desarrollo de células T Th17

Se usaron líneas celulares de insulinooma, que mueren después de la estimulación con IL-1 β /INF- γ o TNF- α /INF- γ , en este estudio. Específicamente, las líneas celulares RIN-m5F y MIN6 se trataron con IL-1 β /INF- γ solo o IL-1 β /INF- γ /VGX-1027, y solo se midió la producción de TNF- α , que es una consecuencia de la estimulación con estos factores.

Como se muestra en la Figura 2a, el tratamiento con VGX-1027 reprimió significativamente la producción de TNF- α después de la estimulación con IL-1 β /INF- γ en ambos tipos de células. Además de la producción de TNF- α , se produce la muerte celular después del tratamiento de estas células con IL-1 β /INF- γ . Como se muestra en la Figura 2b, solo alrededor del 30% de las células tratadas con IL-1 β /INF- γ permanecieron viables después de 48 horas de tratamiento; sin embargo, el tratamiento conjunto con VGX-1027 recuperó la viabilidad celular en más del 60%, que es similar a la del grupo de control. Lo que es más interesante, la adición exógena de rTNF- α previno el efecto protector del cotratamiento con VGX-1027, probablemente no debiéndose el resultado a la inhibición de INF- γ (Figura 2b). Por lo tanto, VGX-1027 inhibe la inducción de IL-1 β , pero no la muerte celular inducida por TNF- α .

Como VGX-1027 inhibe específicamente la inducción de IL-1 β , pero no la muerte celular inducida por TNF- α , VGX-1027 puede apuntar a una proteína corriente abajo del receptor de IL-1 β (IL-1R), pero no al receptor de TNF- α (TNFR). Esto es a diferencia de las señales que resultan de la activación de TNFR, que requieren señales tanto de IL-1R como del receptor similar a Toll (TLR) para activar la ruta MyD88-TRAF6-IRAK (Figura 3) (revisado en Trinchieri et al., Nat. Rev. Immunol., (8) 179-190 (2007).

Los macrófagos provocados por el tioglicolato se trataron con múltiples agonistas de TLR durante 48 horas. Se midió la producción de TNF- α . Los siguientes agonistas se utilizaron para activar los diversos TLR. Véase la siguiente Tabla 1.

Tabla 1

Agonista	TLR Activado	Dependencia MyD88
LPS	TLR4	Sí
Zymosan	TLR2/6	Sí
Dipéptido de Muramilo (MDP)	TLR2/4	Sí
Poli (I:C)	TLR3	No

Como se muestra en la Figura 4a, VGX-1027 inhibió la producción de TNF- α de células que fueron estimuladas con LPS, ZYM y MDP, que activan los TLRs 2, 4 y/o 6. Sin embargo, VGX-1027 no afectan la producción de TNF- α inducida por poli (I:C), lo que sugiere que la producción de TNF- α dirigida por TLR-3 no es inhibida por VGX-1027. Una distinción entre TLR-3 y los otros TLR e IL-1 β R es que la activación de TLR-3 no requiere MyD88/TRAF6/IRAK para estimular la activación de NF- κ B o la secreción de citoquinas inflamatorias. Véase la Figura 3. (Jiang et al., J. Biol. Chem., (278) 16713-16719 (2003). Además, se observó que VGX-1027 inhibía la fosforilación inducida por LPS de p38 y 1- κ B α , lo que indica que VGX-1027 inhibe una proteína en sentido ascendente de las vías de señalización de tanto p38 como de NF- κ B, (Figura 4b).

Como sugieren estos datos, VGX-1027 puede inhibir la secreción de TNF- α inducida por la activación de la mayoría de los TLR e IL-1R, y este efecto se correlaciona con la dependencia de MyD88-TRAF6-IRAK y la inhibición de las vías de NF- κ B y p38.

i. VGX-1027 inhibe la activación de monocitos y macrófagos

Se probó VGX-1027 para determinar si sus efectos eran específicos del tipo de célula. Como se muestra en la Figura 5a, el tratamiento con VGX-1027 de varias líneas celulares de crecimiento asíncrono no causó toxicidad según lo medido por el ensayo MTT (Figura 5a) y la tinción con PI/Anexina V. Se observó una viabilidad superior al 80% con 100 mM del fármaco, lo que indica que el VGX1027 por sí solo no es citotóxico en concentraciones incluso altas (Figura 5a).

A continuación, se midió la producción de TNF- α después de la estimulación con LPS en estos diferentes tipos de células. Como se muestra en la Figura 5b, el tratamiento con VGX-1027 inhibió la producción de TNF- α inducida por LPS en U937, RAW, monocitos primarios y PBMC. A la inversa, el tratamiento con VGX-1027 no afectó la producción de TNF- α en Jurkats, células T CD4 no diferenciadas, 293T o células RD. Esto sugiere que el efecto de VGX-1027 es específico de los monocitos/macrófagos. No se observaron efectos inducidos por VGX-1027.

Dado que el tratamiento con LPS no afecta la proliferación de células T (Imanishi et al., J. Immunol., (178) 6715-1719 (2007)), el efecto de VGX-1027 sobre la proliferación de células T CD4 no diferenciadas se midió después de la canavalina A (ConA) y proliferación inducida por CD3/CD28. La proliferación inducida por canavalina A (ConA) y CD3/CD28 no requiere la ruta MyD88-TRAF6-IRAK. Consecuentemente, se observó que VGX-1027 no afectaba la proliferación de células T CD4 indiferenciadas después de la estimulación de ConA o CD3/CD28 (Figura 5c), ni la producción de INF- γ después de la estimulación de ConA.

j. VGX-1027 previene el desarrollo de células T Th17 a través de mecanismos tanto autónomos de células como no autónomos de células

Las células T Th17 son críticas para el desarrollo de una serie de trastornos autoinmunes, que incluyen EAE y CIA (véase la Tabla 2). Por lo tanto, se analizó VGX-1027 para determinar si podía inhibir la producción y/o la actividad de factores directos o indirectos involucrados en el desarrollo de las células T Th17. El desarrollo de células T Th17 requiere TGF- β , IL-1 β , IL-6 y IL-21 o IL-23 (Manel et al., Nat. Immunol., (9) 641-649 (2008)). Además, la importancia in vivo de estas citoquinas se ha demostrado utilizando la genética de ratones. Por ejemplo, los ratones deficientes en IL-6 o IL-23 no inducen células T Th17 en una uveítis autoinmune experimental (EAU) de ratón (Yoshimura et al., Rheumatology, (48) 347-354 (2009)).

Tabla 2

Anulación	Fenotipo
<i>p35</i> ^{-/-} (<i>IL-12</i>)	Susceptible a Encefalomiелitis Autoinmune Experimental ("EAE"), Artritis Inducida por Colágeno ("CIA")
<i>p19</i> ^{-/-} (<i>IL-23</i>)	Resistente a EAE, CIA, colitis inducida por CD40
<i>p40</i> ^{-/-} (<i>IL-12</i> y <i>IL-23</i>)	Resistente a CIA
<i>INF-γ</i> ^{-/-} , <i>INF-γR</i> ^{-/-}	Hipersusceptible a CIA, EAE
<i>TNF-α</i> ^{-/-}	Susceptibilidad a EAE
<i>IL1R</i> ^{-/-}	Resistente a EAE

La fuente de estas citoquinas es, al menos en parte, las células dendríticas (DC), que también capturan el antígeno para su presentación a las células T. Además, una gran cantidad de estudios sugieren un papel esencial para los DC en el desarrollo de enfermedades autoinmunes. Por ejemplo, las DC se encuentran en grandes cantidades en los sueros y fluidos sinoviales de pacientes con Artritis Reumatoide (AR) (Zvaifler et al., J. Clin. Invest., (76) 789-800 (1985)). Son una fuente importante de producción de TNF- α en la psoriasis (Sabat et al., Exp. Dermatol., (16) 779-798 (2007)). Además, son suficientes para inducir autoinmunidad al presentar antígenos propios en varios modelos de ratón (Banchereau et al., Immunity, (20) 539-550 (2004)). Los DC expresan TLR y se pueden estimular con ligandos de TLR para inducir la autoinmunidad en una variedad de modelos de ratón. Por ejemplo, las DC presentan antígenos de mielina endógenos a las células T vírgenes y, como resultado, polarizaron las células T hacia el fenotipo Th17 mediante la producción mejorada de IL-1 β e IL-6 (Miller et al., Ann. NY Acad. Sci. (1103) 179-191 (2007)). Además, la activación de TLR en DC promueve la producción de IL-23, lo que lleva al desarrollo de células T Th17 (Van Beelen et al., Immunity, (27) 660-669 (2007)). Por lo tanto, primero investigamos si VGX-1027 podría inhibir la producción de IL-23 e IL-6, dos citoquinas esenciales para el desarrollo de células T Th17, a partir de DC estimuladas con LPS.

Como se muestra en la Figura 6, el tratamiento con LPS de las DC aumentó la producción de TNF- α , IL-18, IL-6 e IL-23. Sin embargo, el tratamiento conjunto con VGX1027 reprimió dramáticamente la producción de estas citoquinas (Figura 6), lo que indica que VGX-1027 actúa no solo en macrófagos, sino también en DC, cuya presentación de autoantígenos es suficiente para inducir autoinmunidad en varios modelos de ratón (Miller et al., Ann. N.Y. Acad. Sci. (1103) 179-191 (2007); Van Beelen et al., Immunity, (27) 660-669 (2007)).

Para determinar si este efecto podría traducirse in vivo, a los ratones se les inyectó LPS y se midió el porcentaje de CD que expresan CD86, que es un marcador de maduración, y se midió el MR de CD86 en las células positivas. La activación de las CD a través de la expresión de CD86, y no los niveles totales de citoquinas, se midió para determinar los efectos directos de VGX-1027 en las CD. La medición de citoquinas in vivo podría confundirse con otras células productoras de citoquinas, como los macrófagos. Los ratones fueron inyectados con LPS o LPS+VGX-1027 (VGX-1027 se administró 1 hora antes de la administración de LPS) 3 horas después de la inyección. El bazo de estos ratones se extrajo y se analizó para determinar las DC con expresión de CD86. Como se muestra en la Figura 7a, la inyección de LPS aumentó el % de las CD que expresaban CD86; e interesante, VGX-1027 redujo este porcentaje sin afectar el porcentaje total de CD en el bazo (Figura 7a). Además, la disminución inducida por VGX1027 en el porcentaje de células que expresaban CD86 y se asoció con una disminución en la expresión de CD86 por célula (Figura 7b). Por lo tanto, VGX-1027 inhibe la producción inducida por LPS de citoquinas inflamatorias que promueven Th17 por las CD in vitro y reduce la maduración inducida por LPS de las DC in vivo.

Aunque la inhibición de la producción de citoquinas promotoras de Th17 a partir de DCs puede contribuir a la disminución del desarrollo de células T Th17, la limitación potencial con este mecanismo es que otras células pueden compensar la producción de citoquinas promotoras de Th17. Por lo tanto, el efecto directo de VGX-1027 se probó en la diferenciación de células T CD4 ingenuas en células T Th17. La generación in vitro de células T Th17 requiere TGF- β , IL-1 β , IL-6 y IL-21 o IL-23. Las células T Th17 se evaluaron con células T CD4 purificadas (CD3+ CD4+ CD45RA+ CD25^{HLA-DR}) con o sin VGX-1027. Como se muestra en la Figura 8, se observó un aumento en el porcentaje de células T que expresan células T IL17 o Th17, después de la estimulación con el cóctel de citoquinas promotoras de Th17. Se observó un aumento significativo en el porcentaje de células T Th17 con inclusión de VGX-1027 durante la estimulación (Figura 8a).

La disminución en el porcentaje de células T Th17 también se asoció con una disminución en la cantidad de IL-17 expresada en una célula T Th17 medida por la intensidad fluorescente media (MFI) (Figura 8b). La disminución de la IL-17 también se observó en los medios de cultivo (Figura 8c), lo que sugiere que la disminución inducida por VGX-1027 en las células T Th17 conduce a una reducción en la forma secretada de IL-17.

Teniendo en cuenta que los experimentos en la Figura 8 se realizaron con células T CD4 purificadas, VGX-1027 puede ejercer un efecto negativo en el desarrollo de células T Th17 a través de un efecto directo autónomo de células. Estos datos, junto con los resultados de la Figura 7, que mostraron que el tratamiento con VGX-1027 inhibe la producción de citoquinas Th17 a partir de las CD, proporcionan evidencia de que el tratamiento con VGX-1027 puede ser suficiente para inhibir el desarrollo de células T Th17 a través de ambas células autónomas (efecto directo en células T) y mecanismos no autónomos de células (indirectos a través de la inhibición de las CD de la producción de citoquinas promotoras de Th17).

Con base en los efectos in vitro descritos anteriormente de VGX-1027, está claro que VGX-1027 inhibe la secreción de TNF- α inducida por la activación de la mayoría de los TLR e IL-1R, y este efecto se correlaciona con MyD88-TRAF6- La dependencia de IRAK y la inhibición de las vías NF- κ B y p38. Además, VGX-1027 no es tóxico a altas concentraciones (100 mM) en una variedad de tipos de células que incluyen HeLa, Jurkat, RD, PBMC y U937, y no inhibe la proliferación inducida por ConA o la producción de γ -INF de células T no diferenciadas. Más bien, VGX-1027 exhibe especificidad hacia macrófagos y células dendríticas. Por último, VGX-1027 inhibe el desarrollo de células T Th17 a través de mecanismos tanto celulares autónomos como no celulares autónomos.

k. VGX-1027 es un medicamento administrado por vía oral que trata eficazmente una variedad de enfermedades autoinmunes

Con base en los datos antiinflamatorios que se presentan anteriormente y los prometedores datos de PK y toxicidad en ratones y humanos, se probó la eficacia de VGX-1027 como un fármaco antiinflamatorio en varios modelos experimentales en ratones. Se investigaron los siguientes modelos de ratón de diversas enfermedades autoinmunes:

Letalidad inducida por LPS (enfermedad inducida por endotoxinas);

pleuritis (inflamación pulmonar);

colitis inmunoinflamatoria inducida químicamente (modelo DNBS - modelo de enfermedad inflamatoria intestinal);

diabetes espontánea e inducida por STZ en ratones NOD (diabetes tipo I);

artritis inducida por colágeno tipo II (artritis reumatoide); y

uveítis inducida por endotoxinas (EIU) en ratas Lewis (modelo de enfermedades inflamatorias oculares).

A continuación se muestran los resultados del efecto de la administración de VGX-1027 en estos modelos de ratón.

(1) Letalidad Inducida por LPS (Choque Inducido por Endotoxinas)

El lipopolisacárido (LPS) es el más estudiado de todos los agonistas de TLR porque induce inflamación local y sistémica, y las respuestas a LPS imitan muchas de las características de la lesión tisular observadas durante las infecciones con bacterias Gram-negativas. La inyección de LPS en ratones desencadena la producción de citoquinas inflamatorias y síntomas que son indistinguibles de los del choque séptico. Como se muestra en la figura 9, VGX-1027 se administró por vía intraperitoneal u oral, y la supervivencia se determinó después de recibir una dosis letal de LPS (1 mg/ratones) (Figura 9a y b). El tratamiento con VGX-1027 aumentó la supervivencia de los ratones después de la inyección de LPS; este resultado es consistente con VGX-1027 que inhibe los efectos inducidos por LPS en macrófagos y CD. Tanto la administración oral como la intraperitoneal de VGX-1027 confirieron supervivencia, lo que indica que la administración oral de VGX-1027 es biológicamente activa en la represión de la producción de citoquinas a partir de LPS.

(2) Pleuritis inducida por carragenina (CAR) (inflamación pulmonar)

A continuación, se evaluó la pleuritis inducida por carragenina (CAR), un modelo bien conocido de inflamación aguda mediada por leucocitos en los que las citoquinas proinflamatorias de tipo 1, como la IL-1 y el TNF- α , tienen un papel patógeno importante. Los ratones que son desafiados con CAR desarrollan pleuresía aguda con exudados turbios. La cantidad de inflamación se midió por el volumen de exudados, el número de granulocitos (PCN) y la cantidad de mieloperoxidasa (MPO), la actividad en los pulmones. Los anticuerpos anti-TNF se utilizaron como control para comparar los efectos de VGX-1027 con los del bloqueo de TNF- α , que se usa comúnmente para tratar trastornos inflamatorios en humanos.

Como se muestra en la Figura 10, el tratamiento con VGX-1027 disminuyó efectivamente las tres mediciones inflamatorias inducidas por CAR. VGX-1027, administrado por vía intraperitoneal u oral, fue tan eficaz como lo fue el tratamiento anti-TNF para prevenir la pleuresía inducida por CAR.

Estos signos de laboratorio de pleuritis inducida por CAR no se observaron en el grupo de ratones tratados de forma simulada. Por lo tanto, VGX-1027, en forma oral, se puede usar para tratar la inflamación del pulmón.

(3) Colitis inflamatoria aguda inducida por DNBS como modelo para enfermedades inflamatorias del intestino como la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa.

La enfermedad intestinal inflamatoria (EII) afecta a aproximadamente 1.8 millones de personas en 7 mercados principales, con la incidencia de la enfermedad de Crohn en aumento. La colitis ulcerosa y la enfermedad de Crohn son los 2 constituyentes principales de la EII y son causados por una falla del sistema inmune mucosal para atenuar las respuestas inmunes a antígenos propios o no propios (Strober et al., J., Clin. Invest., (117) 514-521 (2007)). Por lo tanto, se investigó el efecto de VGX-1027 sobre la colitis inflamatoria inducida por el ácido dinitrobenzenosulfónico (DNBS).

El desafío con DNBS de ratones indujo características clínicas de colitis que incluyen pérdida de peso, diarrea, daño intestinal y regiones necróticas (Figura 11a-d). El tratamiento con VGX-1027, que comenzó 1 hora después de la administración de DNBS y continuó hasta 4 días después de la administración de DNBS, mejoró notablemente una serie de características de la colitis. Este efecto se asoció con una disminución del peso del colon, un indicador de inflamación del colon y una disminución de las cantidades de TNF- α e IL-18 en los homogeneizados de colon (Figura 11e-f). Un aumento en el peso del colon es una medida indirecta del aumento del grosor de las paredes debido a la inflamación.

El grado de protección contra estos signos clínicos e histológicos de colitis proporcionados por VGX-1027 fue comparable al proporcionado por 1 mg/kg de dexametasona, que se usó como fármaco de control positivo (Figura 11). Por lo tanto, estos datos indican que VGX-1027 posee un perfil inmunofarmacológico que apoya su uso en el tratamiento de enfermedades inflamatorias del intestino humano.

(4) Diabetes espontánea e inducida por STZ en ratones NOD2 como modelo para la diabetes tipo I

La diabetes mellitus tipo I (T1D) es una enfermedad autoinmune mediada por células T que resulta de la destrucción selectiva de las células β productoras de insulina en los islotes pancreáticos de Langerhans. Tanto en el T1D humano como en los modelos de roedores de la enfermedad, como la diabetes inducida por MLD-STZ, el ratón NOD y la rata BB propensa a la diabetes, las células β pancreáticas se destruyen selectivamente al infiltrar las células mononucleares. Además, las células T Th17 pueden participar en la destrucción de las células β , y la transferencia adoptiva de las células T polarizadas Th17 en ratones NOD SCID es suficiente para transferir T1D (Jain et al., J. Exp. Med., (205) 207 -218 (2008)). Por lo tanto, se evaluó la eficacia de VGX-1027 para mitigar los efectos de T1D en ratones NOD y en T1D inducido por estreptozotocina (STZ).

Como se muestra en la Figura 12a, la mayoría de los ratones NOD hembra que no recibieron VGX-1027 desarrollaron T1D a las 25 semanas (13/16 u 81.3% para vehículo; 12/16 o 75% para el control sin tratar). A la inversa, el tratamiento

prolongado con VGX-1027 redujo la incidencia de la enfermedad con solo 5/16 o 31.3% de los ratones que desarrollaron T1D. El tratamiento prolongado, la administración intraperitoneal con 20 mg/kg de peso corporal 6 veces a la semana desde la semana 12 hasta la semana 25, fue bien tolerado sin diferencias en el comportamiento, el aspecto general y el consumo de alimentos.

También se evaluó el efecto de VGX-1027 con diabetes inducida por STZ. STZ es un agente alquilante de ADN con una toxicidad particular para las células β pancreáticas. VGX-1027 se administró por vía oral durante 12 días, y se administró STZ a ratones durante 5 días consecutivos a partir del día posterior al tratamiento con VGX-1027. Como se muestra en la Figura 12b, los ratones con STZ solo desarrollaron hiperglucemia aproximadamente 2 semanas después de la inyección de STZ; a la inversa, los ratones STZ⁺ VGX-1027 no desarrollaron hiperglucemia a pesar de solo 12 días de tratamiento con VGX-1027. Además, el tratamiento con VGX-1027 evitó la infiltración de células inmunitarias y la atrofia y pérdida de los márgenes de los islotes que se observaron en el páncreas de ratones con STZ solo. Como sugieren estos resultados, VGX-1027 se puede utilizar en la prevención y el tratamiento del T1D humano.

(5) Uveítis inducida por endotoxinas (UII) en ratas (modelo para inflamación ocular)

La inflamación intraocular crónica denota un grupo heterogéneo de enfermedades que es una causa principal de ceguera adquirida en adultos. La uveítis se refiere a la inflamación de la úvea, que es la túnica vascular o capa media del ojo, y es responsable de aproximadamente el 3% de la ceguera en los Estados Unidos. A diferencia de otras afecciones autoinmunes con etiologías conocidas, la uveítis se manifiesta en varios síndromes inflamatorios que incluyen la enfermedad de Crohn, la enfermedad de Behçet, la sarcoidosis y otras (Yeh et al., *Semin. Immunopathol.*, (30) 145-164 (2008)). Para estudiar la posible utilidad de VGX-1027 en el tratamiento de afecciones inflamatorias oculares, inyectamos LPS en los plantares de las ratas Lewis para inducir la uveítis. Después de 16 horas después de la inyección de LPS, se sacrificaron las ratas y se recogieron sus ojos y humor acuoso para estudiar los signos serológicos, inmunológicos e histológicos de la EIU. El desarrollo de EIU se calificó en la siguiente escala: (0) sin reacción inflamatoria; (1) dilatación discreta del iris y los vasos conjuntivales; (2) dilatación moderada del iris y de los vasos conjuntivales; (3) hiperemia irídea intensa con destello en la cámara anterior; y (4) los mismos signos clínicos que el grado 3 más la presencia de exudado fibrinoso en el área pupilar con un brote intenso en la cámara anterior.

Como se muestra en la Figura 13a, la puntuación de la inflamación clínica con VGX-1027, administrada 30 minutos después de la infección por LPS, fue significativamente más baja que con el vehículo solo. Se observó una disminución similar en el grado de inflamación clínica cuando se administró VGX-1027 6 horas después de la inyección de LPS; sin embargo, la disminución no se observó cuando se administró VGX-1027 12 horas después de la inyección de LPS. La disminución en el grado de inflamación con el tratamiento con VGX-1027 fue similar a la del tratamiento con dexametasona. Además, VGX-1027 también disminuyó los aumentos inducidos por LPS en la cantidad de proteínas y citoquinas inflamatorias en el humor acuoso y la infiltración de células en el cuerpo ciliar del iris. Por lo tanto, este estudio demuestra que VGX-1027 atenúa la uveítis inducida por LPS en ratas, y el efecto se correlaciona con una disminución en la inflamación general. Estos datos también sugieren que VGX-1027 se puede usar, tal vez como una formulación tópica, para tratar o mejorar la uveítis humana.

(6) Artritis inducida por colágeno tipo 11 (modelo para la artritis reumatoide)

La artritis reumatoide (AR) es un trastorno autoinmune crónico que afecta a varios tejidos y órganos, pero principalmente induce la inflamación de la membrana sinovial que conduce a la destrucción del cartílago articular y la rigidez de las articulaciones. Aunque el mecanismo exacto de la AR no se conoce completamente, los productos biológicos basados en TNF e IL-1 parecen atenuar la gravedad de la enfermedad; y al igual que el desarrollo de muchas afecciones autoinmunes, el desarrollo de la AR probablemente requiera una gran cantidad de factores para la aparición de la enfermedad (Hirota et al., *J. Exp. Med.*, (204) 41-47 (2007)). Uno de estos factores parece ser las células T Th17, que el VGX-1027 inhibe (Figura 8). IL-17A se encuentra en los fluidos sinoviales de algunos pacientes con AR y puede detectarse en áreas ricas en células T del tejido sinovial de AR (Ziolkowska et al., *J. Immunol.*, (164) 2823-2838 (2000)). El bloqueo de IL-17 con anticuerpos anti-IL-17 reduce la inflamación articular, la destrucción del cartílago y la erosión ósea en la artritis inducida por colágeno (CIA), que es el modelo murino de AR (Lubberts et al., *Arthritis Rheum.*, (50) 650-659 (2004)). Debido a la participación de las células T Th17 en la AR, y la efectividad de la terapia anti-IL-1 β y TNF- α en la mejora de los síntomas de la RA en humanos, se investigaron las perspectivas de la terapia basada en VGX-1027 para tratar la AR con el modelo de ratón CIA mencionado anteriormente.

Para inducir la CIA, los ratones se inyectaron por vía intradérmica en la base de la cola con 100 μ l de una emulsión que contenía 100 μ l de CII y se reforzaron el día 21. En términos de tratamiento, VGX-1027 se usó solo como un régimen "terapéutico" mediante la administración del fármaco por administración intraperitoneal a ratones con una puntuación clínica igual o superior a 1. Los ratones se trataron con vehículo, dexametasona (0.3 mg/kg) o VGX-1027 (0.5 mg/ratón) para 10 días consecutivos. Los ratones se evaluaron con el siguiente sistema de puntuación: 0 = sin signos de artritis; 1 = hinchazón y/o enrojecimiento de la pata o 1 dígito; 2 = afectación de 2 articulaciones; 3 = afectación de articulaciones N2, y 4 = artritis severa de la pata y los dedos completos. Se calculó un índice de artritis para cada ratón sumando las puntuaciones para las patas individuales. Otras medidas de gravedad clínica fueron el

volumen de la pata trasera y la evaluación histológica del daño; esta última se midió con los siguientes criterios: 0 = sin daño; 1 = edema; 2 = presencia de células inflamatorias y reabsorción de 3 huesos.

5 Como se muestra en la Figura 14, todas las características clínicas de la CIA se atenuaron con el tratamiento con VGX-1027. Se observaron beneficios inmediatos, ya que se observaron disminuciones significativas en la puntuación
artrítica media y el volumen de la pata trasera incluso después de solo 3 días de tratamiento con VGX-1027 (Figura 14a-c). Estos efectos también se asociaron con mejoras en la inflamación a través de la medición histológica (Figura 14d). La cantidad de mejoría en los signos clínicos de CIA con VGX-1027 fue comparable a la cantidad observada con dexametasona (Figura 14). Por último, estos beneficios con VGX-1027 se observaron después del inicio de la
10 enfermedad, lo que sugiere que VGX-1027 se puede usar para mejorar o aliviar los síntomas de la AR en los pacientes.

I Terapia VGX-1027 extendida

15 Se analizaron los efectos inmunitarios de VGX-1027 ex vivo en células mononucleares de sangre periférica (PBMC) para determinar si, y durante cuánto tiempo, VGX-1027 podría reprimir o inhibir IL-1 β y TNF- α después de estimular las PBMC de plasma con LPS. 5 días después de la administración de VGX-1027, los niveles de TNF- α e IL-1 β se reprimieron a niveles comparables a los controles negativos. Compárese "LPS + C-plasma + VGX-1027" con "Nave" y "VGX-1027" en la Figura 15. Estos datos muestran que la terapia con VGX-1027 puede proporcionarse en diferentes regímenes de dosificación, incluidos los regímenes que imparten terapia extendida.

20 Se aislaron PBMC humanas normales y se cultivaron en presencia de LPS (5 μ g/ml) con o sin plasma tratado con VGX-1027. Las muestras de plasma se obtuvieron por extracción de sangre antes y en el quinto día después de la administración de VGX-1027 en estado estable. Se analizaron los sobrenadantes libres de células para determinar la producción de TNF- α e IL-1 β 24 horas después del tratamiento. Los niveles de citoquinas (pg/ml) se analizaron por ELISA. Los resultados representativos se correlacionaron con la inhibición proinflamatoria de citoquinas. Vea la figura 15.

m. Efectos inmunes de VGX-1027 en dos modelos de enfermedad en ratones

30 (1) Los efectos inmunomoduladores de VGX-1027 in vitro se estudiaron utilizando el enfoque de la micromatriz de oligonucleótidos de todo el genoma.

35 Análisis del perfil transcripcional: PBMC de tres donantes sanos individuales, obtenidos de University of Pennsylvania School of Medicine, Immunology Clinical Core. Las células (5×10^6) se trataron con LPS (5 μ g/ml), LPS (5 μ g/ml) + VGX-1027 (10 μ M) o PBS durante 48 horas y, posteriormente, se extrajo el ARN utilizando el kit RNeasy (Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante.

40 El ARN se hibridó con la matriz Human Gene 1.0 ST (Affymetrix). Los datos de microarreglos se analizaron utilizando la utilidad web Expression Profiler (<http://www.ebi.ac.uk/expressionprofiler/>). La normalización de los datos se logró mediante la transformación logarítmica de todas las intensidades seguidas por el centrado de los genes. Las sondas de múltiples matrices se colapsaron promediando las intensidades. El análisis de componentes principales (PCA) se realizó en todos los genes para asignar la variabilidad general en los datos a un conjunto reducido de variables. Las diferencias en la expresión génica se evaluaron mediante la prueba t de Student y los genes con una $p < 0.01$ se consideraron expresados diferencialmente. Los genes seleccionados se sometieron a agrupación de K-medias, utilizando la distancia euclidiana como medida de correlación, y se realizó un análisis de ontología génica (GO) utilizando la herramienta Base de datos para anotación, visualización y descubrimiento integrado (DAVID). El agrupamiento jerárquico de genes seleccionados se realizó utilizando mediciones de distancia euclidianas como comparación de similitud.

50 Análisis transcripcional global: Los cambios transcripcionales asociados al tratamiento con VGX-1027 tras la estimulación con LPS se evaluaron utilizando microarreglos de oligonucleótidos. Los datos indican que VGX-1027 puede modificar significativamente los eventos proinflamatorios asociados a la activación de TLR-4. La composición de los componentes arrojó ocho componentes principales, y cuatro de ellos se asociaron con la mayor parte de la variabilidad entre los datos. El análisis de PCA se realizó en todo el conjunto de datos y demuestra que la estimulación con LPS de las PBMC está asociada con una modificación significativa del transcriptoma global (Figura 16A). El tratamiento con VGX-1027 también se asocia con cambios dramáticos en el nivel transcripcional, y revela un patrón complejo de expresión génica. El tratamiento con LPS se asoció con la modulación de 325 transcritos, mientras que VGX-1027 indujo la modulación de 895 genes en relación con el LPS (la Tabla 3 y la Tabla 4 indican los 50 principales genes regulados por disminución y regulados por incremento).

60

Tabla 3. Cincuenta genes más subregulados en el grupo tratado con VGX frente al grupo estimulado con LPS

Gen	valor p	media/diferencia de medias	intervalo de confianza
8135943	0.0000312	0.406	(0.353, 0.458)

ES 2 744 245 T3

Gen	valor p	media/diferencia de medias	intervalo de confianza
CABYR	0.000213	0.135	(0.109, 0.161)
GGTLC2	0.000255	0.179	(0.145, 0.213)
8153835	0.000303	0.0829	(0.0656, 0.1)
LRRC8D	0.000326	0.139	(0.111, 0.167)
EDN2	0.00036	0.0391	(0.0295, 0.0487)
C11o f53	0.000423	0.184	(0.138, 0.229)
HAGH	0.000424	0.0712	(0.0538, 0.0886)
TUSC3	0.000539	0.0955	(0.0693, 0.122)
8140035	0.000735	0.388	(0.273, 0.503)
MOV10L1	0.000961	0.0753	(0.0519, 0.0988)
PAH	0.00112	0.0906	(0.061, 0.12)
EGR4	0.00123	0.129	(0.103, 0.155)
8028281	0.00134	0.0791	(0.0517, 0.107)
SNRNP70	0.00137	0.0617	(0.0401, 0.0833)
OFCC1	0.00139	0.0379	(0.0274, 0.0483)
FUK	0.00141	0.0866	(0.057, 0.116)
VIPR1	0.00141	0.123	(0.0797, 0.167)
YPEL2	0.00146	0.183	(0.118, 0.249)
TXNRD1	0.00152	0.117	(0.0771, 0.157)
8007069	0.00153	0.074	(0.0478, 0.1)
TRABD	0.00157	0.0439	(0.0313, 0.0566)
UAP1L1	0.00174	0.0398	(0.0253, 0.0544)
GATAD1	0.00179	0.0258	(0.0168, 0.0348)
FAM108C1	0.00179	0.0544	(0.0369, 0.0718)
8102775	0.00186	0.101	(0.068, 0.134)
SH3PXD2A	0.00191	0.0515	(0.0319, 0.071)
KLF3	0.00203	0.115	(0.0731, 0.157)
CCKBR	0.00227	0.0588	(0.0354, 0.0822)
FNBP1L	0.00231	0.203	(0.125, 0.282)
8094946	0.00232	0.07	(0.0424, 0.0977)
SLC38A2	0.00234	0.0979	(0.0705, 0.125)
7923965	0.00241	0.439	(0.262, 0.616)
Cl o f2	0.00279	0.106	(0.0616, 0.151)
8160555	0.00299	0.171	(0.101, 0.242)
SERPINI1	0.00311	0.187	(0.106, 0.267)
HSPA12B	0.0032	0.0281	(0.0174, 0.0388)
7945084	0.00322	0.165	(0.102, 0.229)
HISPPD2A	0.00328	0.0217	(0.0123, 0.031)

ES 2 744 245 T3

(continuación)

Gen	valor p	media/diferencia de medias	intervalo de confianza
8134024	0.00331	0.0796	(0.0444, 0.115)
8017100	0.00338	0.108	(0.0787, 0.138)
CYTH1	0.0035	0.0452	(0.0272, 0.0632)
8077169	0.00362	0.153	(0.0997, 0.207)
CIZ1	0.00363	0.0416	(0.0232, 0.0601)
7912155	0.00372	0.111	(0.0674, 0.154)
ALKBH5	0.00373	0.0698	(0.0447, 0.0949)
ZNF746	0.00375	0.0386	(0.0228, 0.0545)
ETNK2	0.00384	0.278	(0.171, 0.384)
8104068	0.00411	0.118	(0.0643, 0.173)
C20 o f173	0.00422	0.14	(0.0766, 0.203)

Tabla 4. Cincuenta genes más regulados por incremento en el grupo tratado con VGX frente al grupo estimulado con LPS

Gen	valor p	media/diferencia de medias	intervalo de confianza
MAGOH	9.51E-06	-0.1	(-0.109, -0.0911)
CD38	0.000112	-0.468	(-0.519, -0.416)
SNORA24	0.000134	-0.212	(-0.252, -0.172)
FCRL1	0.000178	-0.301	(-0.35, -0.252)
GEN1	0.000192	-0.368	(-0.446, -0.291)
DNAH1	0.00021	-0.134	(-0.16, -0.107)
CLIC5	0.000255	-0.175	(-0.214, -0.136)
CPA3	4.00E-04	-0.669	(-0.831, -0.508)
KARS	0.000424	-0.126	(-0.156, -0.0957)
PAK1IP1	0.000444	-0.271	(-0.332, -0.209)
CD22	0.000527	-0.453	(-0.561, -0.344)
NLN	0.000585	-0.217	(-0.278, -0.157)
SPAG7	0.000644	-0.149	(-0.188, -0.109)
LYRM4	0.000663	-0.294	(-0.379, -0.21)
MRPL15	0.000663	-0.147	(-0.188, -0.106)
CHML	0.000703	-0.24	(-0.31, -0.17)
CCL8	0.000744	-1.08	(-1.3, -0.851)
ADAM19	0.000748	-0.176	(-0.228, -0.123)
APOBEC3G	0.000768	-0.239	(-0.307, -0.171)
hCG_2024410	0.000792	-0.102	(-0.133, -0.0714)
NDUFA4	0.000795	-0.0638	(-0.0823, -0.0452)
BLNK	0.000809	-0.398	(-0.518, -0.277)
8043441	0.000815	-0.406	(-0.527, -0.285)
EOMES	0.000821	-0.0887	(-0.116, -0.0616)
BOLA3	0.000826	-0.118	(-0.149, -0.0869)

(continuación)

Gen	valor p	media/diferencia de medias	intervalo de confianza
SRFBP1	0.00104	-0.124	(-0.163, -0.0841)
WARS2	0.00108	-0.246	(-0.325, -0.168)
ATXN10	0.0011	-0.131	(-0.17, -0.0921)
OAS3	0.00111	-0.134	(-0.178, -0.0896)
WDR70	0.00111	-0.0908	(-0.114, -0.0673)
LCP2	0.00114	-0.0536	(-0.0711, -0.0361)
8136446	0.00116	-0.146	(-0.194, -0.0983)
AIM2	0.00117	-0.221	(-0.285, -0.156)
RGS1	0.00118	-0.294	(-0.388, -0.2)
7997245	0.00129	-0.0599	(-0.0799, -0.04)
CLU	0.00131	-0.218	(-0.283, -0.153)
LARS2	0.00138	-0.176	(-0.237, -0.114)
MRPS35	0.00142	-0.164	(-0.222, -0.106)
KLHDC4	0.00147	-0.0727	(-0.0967, -0.0487)
TCL1A	0.00152	-0.442	(-0.534, -0.351)
8150101	0.00152	-0.237	(-0.322, -0.152)
FAS	0.00153	-0.12	(-0.154, -0.086)
PGDS	0.00155	-0.708	(-0.895, -0.521)
KCTD10	0.00159	-0.0613	(-0.081, -0.0416)
KLF10	0.00161	-0.11	(-0.141, -0.0795)
SNX6	0.00162	-0.0607	(-0.0823, -0.039)
ZNF596	0.00164	-0.432	(-0.591, -0.274)
TSN	0.00168	-0.105	(-0.142, -0.069)
RPE	0.0017	-0.116	(-0.159, -0.0731)
TNFRSF17	0.00174	-0.295	(-0.404, -0.186)

5 El análisis GO se realizó utilizando la Base de datos Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) (Kanehisa et al., 2012). Se encontró una sobrerrepresentación de moléculas asociadas a "Proteasoma", "Procesamiento y presentación del antígeno", "Espliceosoma" y "Ciclo de citrato" (Tabla 5).

Tabla 5. Análisis GO de genes expresados diferencialmente

Término	Contar	valor p	factor enriquecimiento	Benjamini	FDR
hsa03050:Proteasoma	13	1.22E-06	5.78802	1.71E-04	0.00144
hsa04612: Procesamiento y presentación de antígenos	13	4.89E-04	3.27755	0.03388	0.57584
hsa03040: Espliceosoma	16	8.47E-04	2.65726	0.03904	0.99599
hsa00020: Ciclo de citrato (Ciclo de TCA)	7	0.00295	4.72521	0.09875	3.42467
hsa00240: Metabolismo de la pirimidina	12	0.00509	2.64327	0.13413	5.855
hsa04110: Ciclo celular	14	0.0061	2.3437	0.13402	6.97828
hsa00230: Metabolismo de la purina	15	0.01354	2.05156	0.24006	14.8713

Término	(continuación)				
	Contar	valor p	factor enriquecimiento	Benjamini	FDR
hsa03022: Factores de transcripción basales	6	0.02363	3.5873	0.34393	24.6119
hsa00970: Biosíntesis de aminoacil-ARNt	6	0.0434	3.06233	0.50096	40.7927
hsa03018: Degradación de ARN	7	0.05222	2.56985	0.53053	46.9296
hsa05012: Enfermedad de Parkinson	11	0.08262	1.79832	0.66889	63.8937
hsa05322: Lupus eritematoso sistémico	9	0.09778	1.90236	0.70153	70.3483

Los genes expresados diferencialmente se sometieron a agrupación de K-medias realizadas para un total de 5 agrupaciones. La distancia euclidiana se utilizó como medida de similitud y se inicializó con los genes más distantes (Figura 16B). Para comprender mejor los procesos biológicos involucrados, se realizó un análisis GO en cada grupo. Un grupo incluía 525 genes, que eran fuertemente subregulados por el tratamiento con VGX1027 pero solo parcialmente regulados por LPS. El análisis de GO reveló conjuntos enriquecidos de genes que pertenecen a las rutas "Proteasoma", "Espliceosoma" y "Procesamiento y presentación de antígenos". Un tercer grupo de genes incluía genes que estaban subregulados por la estimulación con LPS y regulados posteriormente por VGX1027 (CD180, TLR7, MS4A6A, FCGR3A, CX3CR1, ENPP2, NLN, C17orf87). Un grupo más de genes, incluía transcripciones fuertemente reguladas por LPS que volvieron a los niveles basales tras la administración de VGX1027 (IL12RB2, RGS1, CCL7, RSAD2, IL22, IFNG). Finalmente, se encontró que dos grupos de genes 61 y 296 estaban significativamente relacionados con las categorías KEGG "Ciclo celular" y "Factores de transcripción basales" (STON1-GTF2A1L, LOC391764, GTF2IRD1), respectivamente.

Análisis GO de categorías funcionales: "Procesamiento y presentación de antígenos"

Los genes asociados a la ruta de "Procesamiento y presentación de antígenos" pertenecían a la familia de las proteínas de choque térmico (HSP90AB1 y HSPA8), que están estrechamente involucradas en el plegamiento de los péptidos que se cargarán en las proteínas MHC; las moléculas MHC de clase II HLA-DOA y HLA-DRA; la glicoproteína transmembrana TAPBP, que media la interacción entre las moléculas MHC de clase I recién ensambladas y la TAP, y que se requiere para el transporte de péptidos antigénicos a través de la membrana del retículo endoplásmico; los receptores KIR3DS1, KIR2DS1, KIR2DS4 y KIR3DL1 de tipo inmunoglobulina Killer, que están involucrados en la transducción de las señales de activación en las células NK y las células T; la proteína disulfuro isomerasa PDIA3, que modula el plegamiento de las glicoproteínas recién sintetizadas; y finalmente los genes que codifican para las tres subunidades del regulador 11S de PA28, que es el regulador endógeno del inmunoproteasoma, involucrado en el procesamiento de péptidos MHC de clase I (Figura 16C).

Análisis GO de categorías funcionales: "Ciclo celular"

Una segunda categoría resaltada por el análisis GO se representó por "Ciclo celular". Los genes correlacionados con esta categoría estaban representados por los dos miembros de la familia de ciclinas, CCNE2 y CCNB1, que se expresan predominantemente en la transición G1/S y G2/M, respectivamente. Otros dos genes fueron CDC6 y ORC6, involucrados en el inicio de la replicación del ADN y en la coordinación de la replicación y la segregación de los cromosomas con la citocinesis. La subregulación de los genes BUB1 y BUB1B también se observó en las células tratadas con VGX-1027 en comparación con el grupo LPS. Estas dos transcripciones son esenciales para la señalización del punto de control del ensamblaje del huso y para la alineación correcta del cromosoma. CHK1 y MCM4 están involucrados en la regulación de la progresión del ciclo celular y el inicio de la replicación del genoma eucariótico, respectivamente (Figura 16D).

Tratamiento de células T in vitro: se obtuvieron células T CD4+ sin tratamiento previo, de University of Pennsylvania School of Medicine, Immunology Clinical Core, se cultivaron in vitro con IL-6 (20 ng/ml) en presencia o ausencia de VGX1027 (10 uM) durante 0.30 minutos, 1 hora, 2 horas y 5 horas. Al final del período de incubación, las células se lisaron durante 30 minutos a 4°C utilizando el regulador de lisis Nonidet P-40 (Invitrogen) suplementado con una mezcla inhibidora de fosfatasa (PhosSTOP) y una mezcla inhibidora de proteasa (completa) como indica el fabricante (Roche Applied Science). Los lisados se recogieron y se centrifugaron a 10.000 rpm durante 5 min a 4°C, y luego, se mezclaron 50 µg de proteínas con regulador de muestra 2X (Invitrogen) para la posterior electroforesis con SDS-PAGE al 4-12%. Posteriormente, las proteínas se transfirieron a nitrocelulosa utilizando el Sistema de Transferencia Seca iBlot (Invitrogen), se realizó la inmunodetección con el SNAP i.d. El Sistema de Detección de Proteínas (Millipore) que utiliza anticuerpos monoclonales específicos p-STAT3 y STAT3 (Señalización Celular), y las proteínas expresadas se visualizaron con IgG antirratón de cabra conjugada con HRP usando un sistema de detección de ECL (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ).

Las células T CD4+ se expusieron durante períodos crecientes de tiempo a IL-6 y se trataron con VGX-1027 o con un vehículo. Se sabe que la IL-6, al activarse con los receptores gp130, induce la fosforilación de STAT3, después de la activación de la quinasa JAK2 (Murray PJ. 2007. La vía de señalización JAK-STAT: Integración de entrada y salida. J

Immunol 178: 2623-2629.). Los efectos de VGX-1027 in vitro sobre los niveles relativos de p-STAT3 se determinaron mediante inmunotransferencia Western después de la estimulación de células T ingenuas a IL-6. Los niveles de STAT3 activado alcanzaron un pico alrededor de 30 minutos después de la estimulación con IL-6, y luego disminuyeron de manera dependiente del tiempo (Figura 17). La administración de VGX-1027 se asoció a una reducción general en la magnitud de la fosforilación STAT3. El pico de activación se retrasó, alcanzando el máximo 1 h después de la administración de IL-6. Los resultados anteriores muestran que VGX-1027 es capaz de afectar significativamente la vía de señalización JAK/STAT inducida por la citoquina proinflamatoria IL6 (Figura 17).

(2) Los efectos inmunomoduladores de VGX-1027 in vivo se estudiaron utilizando dos modelos murinos diferentes de enfermedades inmunológicas: el choque inducido por enterotoxina B (SEB) por *Staphylococcus aureus* y el modelo NZB/NZW F1 de lupus eritematoso sistémico (SLE).

El SLE es una enfermedad autoinmune compleja con manifestaciones y curso clínicos heterogéneos. El tratamiento actual incluye el uso de fármacos antiinflamatorios, agentes antipalúdicos y fármacos inmunosupresores, incluidos azatioprina, ciclofosfamida, metotrexato y ácido micofenólico. Sin embargo, a pesar de la mejora significativa en el pronóstico de los pacientes con LES, se justifican los agentes farmacológicos menos tóxicos. Además, la enfermedad refractaria representa un gran problema sin una nueva terapia aprobada para el tratamiento del LES en los últimos cincuenta años.

Protección de ratones frente al choque letal inducido por SEB por VGX-1027

Los efectos protectores de VGX-1027 se investigaron en el modelo de choque letal inducido por SEB. Los ratones desafiados comenzaron a mostrar síntomas de enfermedad (pelaje enmarañado) durante 1 h después de la exposición. El cien por ciento de los ratones tratados con vehículo expuestos a 10 µg de dosis de SEB murieron en un período de 24 horas y el 90% de ellos murieron en las primeras 12 horas. La administración de una dosis única de VGX-1027, 30 minutos después de la inyección de SEB, fue principalmente efectiva para prevenir la muerte inducida por toxinas. La supervivencia mejoró en ratones expuestos a SEB de 0 a 50% en los animales tratados con VGX-1027 ($p=0.007$ mediante la prueba de Logrank). Además, el tratamiento con VGX-1027 atenuó la sintomatología asociada con el desafío de SEB. Sin embargo, una minoría de animales todavía murieron a causa del desafío de SEB, aunque estas muertes se produjeron más de 24 horas después de que todos los animales tratados con el vehículo sucumbieran (Figura 18).

Efectos de VGX-1027 en un modelo murino de LES/Efectos de VGX-1027 sobre la proteinuria y la supervivencia de ratones NZB/NZW F1

Para determinar los efectos de VGX-1027 sobre el desarrollo y la progresión de LES, se trataron diariamente NZB/NZW F1 propensos al lupus con 5 mg/ratón VGX-1027 i.p. durante 20 semanas, a partir de las 16 semanas de edad. Los ratones de control recibieron un volumen igual de vehículo. Los ratones de control comenzaron a morir a las 20 semanas de edad. En la semana 36, el 62.5% de ellos estaban muertos en comparación con el único 33.3% de los ratones tratados ($p=0.0487$ mediante la prueba Log-rank) (Figura 19A). La mejora de la supervivencia se correlacionó con la inhibición de la enfermedad renal. La proteinuria se evaluó una vez a la semana. La administración de VGX-1027 mejoró significativamente la enfermedad renal y los niveles de proteinuria en ratones tratados con VGX-1027 se mantuvieron significativamente más bajos durante todo el período experimental ($p=0.0265$ según la prueba t de Student). Eventualmente, todos los ratones desarrollaron proteinuria, pero el retraso en la progresión de la enfermedad y la supervivencia prolongada de los animales tratados con VGX-1027 permanecieron evidentes (Figura 19B).

VGX-1027 redujo la producción de autoanticuerpos anti-ADNs y la nefritis

La presencia de anti-ADNs Abs se usa comúnmente como un biomarcador asociado con un mal pronóstico de LES y está fuertemente asociada con el desarrollo de nefritis lúpica. El efecto de VGX-1027 sobre la producción de autoanticuerpos anti-ADNs se evaluó después de 10 semanas de tratamiento y al final del período experimental. Solo se encontraron niveles ligeramente aumentados de anticuerpos anti-ADNs a las 26 semanas de edad tanto en el vehículo como en los animales tratados con VGX-1027. En contraste, al finalizar el estudio, cuando los ratones tenían 36 semanas de edad, los ratones tratados con VGX-1027 mostraron niveles significativamente más bajos de autoanticuerpos en el suero ($p<0.0001$ por ANOVA) (Figura 19C).

La nefritis LES en etapa terminal se evaluó mediante histopatología y fue evaluada por un patólogo independiente para la evaluación del daño renal total. Se observó una disminución en la infiltración celular/glomerulonefritis en las secciones renales teñidas con H&E del grupo tratado con VGX-1027 en comparación con el grupo de tratamiento con vehículo. Las puntuaciones medias fueron 1.9 ± 0.8 y 3.1 ± 0.9 para el VGX-1027 y el grupo de control del vehículo, respectivamente ($p=0.01$ por prueba de Mann Whitney U) (Figura 20A).

Las reducciones significativas en p-STAT3 renal se evaluaron mediante ELISA con el fin de evaluar los efectos de VGX-1027 en la vía de señalización IL-6 / JAK / STAT. El tratamiento con VGX-1027 se asoció con una reducción significativa ($p = 0.0234$ por la prueba t de Student) de los niveles relativos de p-STAT3. Por lo tanto, el tratamiento de

ratones NZB / NZW F1 con VGX-1027 puede retrasar el desarrollo de la nefritis LES, bloqueando parcialmente la vía proinflamatoria inducida por IL-6 (Figura 20B).

Los estudios tanto in vitro como en estos modelos murinos con el compuesto VGX-1027 mostraron que el compuesto puede reducir la secreción tanto de las citoquinas proinflamatorias IL-1 β y TNF- α , como de la citoquina antiinflamatoria IL-10 de macrófagos murinos estimulados in vitro con LPS. También mostró la capacidad de subregular la activación de las vías de quinasa NF- κ B y p38 MAP junto con una sobre regulación de la vía ERK. Además, se utilizó el enfoque de microarreglos de todo el genoma para investigar el efecto general de VGX-1027 en una población mixta de células inmunes tras la exposición al ligando TLR-4, LPS. Los datos de microarreglos revelaron que la administración de VGX-1027 afectó significativamente la respuesta inmune a antígenos exógenos, al modular fuertemente la expresión de los genes que están involucrados principalmente en el procesamiento y presentación del antígeno, así como a los genes que regulan la progresión y proliferación del ciclo celular. Los datos obtenidos son consistentes con los datos adicionales de los experimentos de este documento, que revelaron que VGX-1027 inhibe tanto la proliferación de células CD4+CD25-T reactivas al antígeno enterobacteriano in vitro como el desarrollo de signos clínicos e histológicos de colitis in vivo. El efecto beneficioso en el modelo de colitis inflamatoria aguda inducida por DNBS se encontró que estaba asociado con una producción reducida de colon de citoquinas proinflamatorias como la interleucina (IL)-1 β , TNF- α , IL-12p70 e interferón (IFN)- γ y menor contenido del factor nuclear (NF)- κ B (p65) (Mangano K, Sardesai N, D'Alcamo M, Libra M, Malaguarnera L, Donia M, Bendtzen K, Meroni P, Nicoletti F. In vitro inhibition of enterobacteria-reactive CD4+CD25-T cells and suppression of immunoinflammatory colitis in mice by the novel immunomodulatory agent VGX-1027. *Eur J Pharmacol.* 2008 May 31; 586(1-3): 313-21).

También se demostró que VGX-1027 afecta la ruta de JAK/STAT inducida por IL-6. El compuesto demostró ser capaz de reducir fuertemente la activación de STAT3, una quinasa corriente abajo de los receptores gp130. La señalización de STAT3 parece regular la supervivencia y activación de las células T y la diferenciación de las células B en células plasmáticas; también desempeña un papel crítico para la tolerancia y activación de las células T mediadas por células presentadoras de antígenos. La IL-6 representa uno de los principales contribuyentes para la activación de STAT3, y está implicada en la etiopatogenia de varias enfermedades autoinmunes, dada su amplia gama de células diana en la inflamación. En el LES, los macrófagos infiltrados en el riñón son la principal fuente de IL-6. Se pueden encontrar altas concentraciones de IL-6 en los sueros de los pacientes con LES, así como en los modelos con LES murinos. Se ha encontrado que el bloqueo de IL-6 con anticuerpos anti-IL-6 reduce la nefritis en el ratón NZB/NZW F1, propenso al lupus. La administración del compuesto VGX-1027 aumentó significativamente la supervivencia de los ratones NZB/NZW F1 y redujo la patología renal, como lo demuestran los niveles de proteinuria y la histopatología. Además, se encontraron niveles reducidos de STAT3 fosforilado en los riñones de los animales supervivientes al final del período experimental. Además, un porcentaje significativamente más bajo de ratones expuestos a SEB murió cuando se trató terapéuticamente con VGX-1027. Los datos presentados en este documento demuestran que VGX-1027 es capaz de orquestar las respuestas inmunes modulando genes producidos por diferentes tipos de células inmunes en múltiples niveles y, al menos parcialmente, al afectar la capacidad de las células para promover la presentación de antígenos y/o la proliferación celular.

n. VGX-1027 - Dianas de la enfermedad, comparaciones con otros compuestos y ventajas del mecanismo

Sobre la base de los experimentos y los datos proporcionados anteriormente, VGX-1027 puede usarse para reprimir o inhibir la producción de IL-18, IL-6, IL-23 y/o TNF- α . Las células dendríticas producen estas citoquinas. La producción de células T Th17 in vitro requiere las citoquinas IL-6, IL-21 o IL-23, y TGF- β y el factor de transcripción ROR γ t. Debido a que la hiperactividad y/o la producción de células T Th17 pueden inducir a la mayoría de los trastornos autoinmunes, VGX-1027 puede usarse para tratar, por ejemplo, uveítis autoinmune, inflamación pulmonar, enfermedades inflamatorias del intestino, artritis reumatoide y/o diabetes tipo I. VGX-1027 se puede usar para tratar la enfermedad o trastorno correlacionado, ya que este fármaco regula las citoquinas IL-18, IL-6 e IL-23, que a menudo se usan como marcadores para diversas enfermedades y trastornos. Por ejemplo, se han encontrado niveles elevados de IL-18 en sujetos que tienen enfermedad celíaca, enfermedad periodontal y enfermedad de Crohn. Véase, por ejemplo, Lettesjo, et al., *Clinical and Experimental Immunology*, 139: 138-143 (2005); Orozco, et al., *J. of Dental Research*, 86(7): 586-593 (2007); y Pizzaro et al., *J. of Immunology*, 162: 6829-6835 (1999). El aumento de los niveles de IL-6 se ha asociado con diabetes tipo II, plasmocitosis, artritis reumatoide, artritis crónica juvenil de inicio sistémico, osteoporosis, psoriasis, enfermedad autoinmune, como artritis inducida por antígenos, encefalomiелitis alérgica experimental, enfermedad inflamatoria del intestino, enfermedad de Castleman y, en general, las enfermedades autoinmunes y las enfermedades proliferativas inflamatorias crónicas. Véase, por ejemplo, Hu et al., *Diabetes*, 53(3): 693-700 (2004); Nishimoto et al., *Blood*, 95: 56-61 (2000); Ishihara et al., *Cytokine Growth Reviews*, 13 (4-5): 357-368 (2002); Ito, *Curr. Drug Targets Inflamm. Allergy*, 2(2): 125-130 (2003); y Mudter et al., *Inflammatory Bowel Diseases*, 13(8): 1016-1023 (2007). Se ha encontrado que los niveles elevados de IL-23 están asociados, por ejemplo, con la inflamación autoinmune, como la encefalomiелitis autoinmune. Véase, por ejemplo, Chen et al., *J. Clin. Invest.*, 116(5): 1317-1326 (2006).

Numerosos fármacos antiinflamatorios, que incluyen los inhibidores de p38 y NF- κ B, han demostrado eficacia en modelos preclínicos, pero los obstáculos relacionados con la toxicidad y/o la eficacia han impedido su avance. Ejemplos clásicos incluyen los inhibidores p38 de Vertex y Boehringer Ingelheim, que se han suspendido en la Fase II debido a la toxicidad hepática (Revisado en Dambach, *Curr. Top. Med. Chem.*, (5) 929-939 (2005)). Si bien el potencial clínico de VGX-1027 aún no se ha determinado, VGX-1027 parece ser seguro y bien tolerado incluso con la

dosis más alta probada en humanos. Además, proponemos varias diferencias cruciales entre VGX-1027 y estos otros medicamentos.

En contraste con los inhibidores clásicos de p38, VGX-1027 parece inhibir selectivamente la activación de células presentadoras de antígenos y el desarrollo de células T Th17. El tratamiento de las APC con VGX-1027 inhibe la producción de TNF- α /IL-1 β inducida por LPS, la regulación positiva de CD80/86 y la activación de células T mediada por APC. Además, el tratamiento de las células T con VGX-1027 evita el desarrollo de las células T Th17 (Figuras 4-8). A la inversa, VGX-1027 no parece afectar la proliferación de células T inducida por ConA y CD3/CD28. Por lo tanto, VGX-1027 podría contribuir aparentemente a minimizar la toxicidad indeseable (Figura 5a). Esto contrasta con los inhibidores de p38, que inhiben la proliferación de células T de manera indiscriminada (Ward et al., *Biochem. Soc. Trans.*, (25) 304S (1997); Crawley et al., *J. Biol. Chem.*, (272) 15023-15027 (1997)). Sin embargo, parece poco probable que esta selectividad limite el potencial antiinflamatorio de VGX-1027, porque en muchos casos, como la resistencia a la insulina, la distrofia muscular de Duchenne y ciertos modelos de inflamación crónica, la inhibición específica de mieloide de las quinasas inducidas por citoquinas es suficiente para revertir la condición respectiva (Arkan et al., *Nat. Med.*, (11) 191-198 (2005); Acharyya et al., *J. Clin. Invest.*, (117) 889-901 (2007); Eckmann et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, (105) 15058-15063 (2008)).

Además, el hecho de que VGX-1027 no sea un inhibidor directo de enzimas como p38 y IKK β es probablemente una ventaja en términos de minimización de la toxicidad. Los experimentos genéticos han demostrado que estas enzimas son necesarias para funciones fisiológicas básicas. La pérdida de la función de NF-KB conduce a la letalidad embrionaria asociada con la degeneración hepática masiva, y la pérdida específica de hepatocitos de p38 α coopera con la inhibición de NF-kB para conducir a daño hepático inducido por endotoxinas (Beg et al., *Science*, (274) 782-784 (1996); Li et al., *J. Exp. Med.* (189) 1839-1845 (1999); Heinrichsdorff et al., *EMBO Rep.*, (9) 1048-104 (2008)). Sin embargo, VGX-1027, a diferencia de los otros fármacos, solo inhibiría NF-kB y p38 en contextos inflamatorios donde la activación es impulsada por TLR o IL-1R. Por lo tanto, la clave es inhibir estas vías específicamente en las células que son responsables de la inflamación sin inhibir estas mismas rutas en las células espectadoras. Este criterio no se logra con los inhibidores tradicionales de p38 y NF-kB, y por lo tanto puede contribuir a una toxicidad indeseable como niveles elevados de transaminasas plasmáticas (Dambach et al., *Curr. Top. Med. Chem.* (5) 929-939 (2005)).

En un aspecto, los VGX-1027 pueden dirigirse a la activación de macrófagos inducida por LPS, pero no a los inducidos por poli (I:C), y la producción de TNF- α (Figura 5). Esto sugiere que el efecto de VGX-1027 no solo está en el nivel de especificidad de tipo celular, sino también en la especificidad de la vía, considerando que el LPS requiere TLR-4 y la poli(I:C) requiere TLR-3. El efecto de VGX1027 se correlaciona con la dependencia de MyD88-IRAK, aunque se requiere más investigación (Figura 2 y 4). Por lo tanto, uno no esperaría que VGX-1027 inhibiera las actividades de p38 y NF-kB a nivel mundial, sino que inhibiera las actividades en células y/o situaciones específicas (Stojanovic et al., *Clin. Immunol.*, (123) 311-323 (2007); Mangano et al., *Br. J. Pharmacol.*, (155) 722-730 (2008)). Como resultado, se anticipa que VGX-1027 exhibirá menos toxicidad que los otros medicamentos mencionados anteriormente, pero con propiedades antiinflamatorias específicas de la vía.

Los datos proporcionados en el presente documento sugieren que VGX-1027 inhibe la inflamación a través de al menos dos mecanismos distintos, aunque ambos pueden requerir la inhibición de la misma proteína diana. En primer lugar, VGX-1027 inhibe la activación de las APC, medida por la disminución de la producción y la maduración de citoquinas. Sin embargo, este efecto se limitó a la estimulación con agonistas -LPS, IL-1 β , ZYM y MDP- que requirieron la ruta MyD88-IRAK (Figura 2 y 4). En segundo lugar, VGX-1027 inhibe el desarrollo de células T Th17 a través de mecanismos tanto autónomos como no celulares (Figura 6 y 8). Hay varias ventajas de este mecanismo. Algunas condiciones requieren la inhibición de múltiples factores para la reducción de los síntomas clínicos. Por ejemplo, un tercio de los pacientes con enfermedad de Crohn no responden a la terapia anti-TNF. Al abordar la producción de numerosas citoquinas, incluidas TNF- α e IL-1 β , el tratamiento con VGX-1027 sería suficiente para mitigar esta limitación. Además, ahora se cree que la mayoría de los trastornos autoinmunes son impulsados por la hiperactividad y/o la producción de células T Th17. Estas células son muy abundantes en los tejidos de los pacientes que sufren trastornos autoinmunes y son necesarias para una serie de trastornos autoinmunes en ratones. Actualmente, no hay medicamentos en el mercado que inhiban específicamente las células T Th17, aunque los productos biológicos anti-p40 (ABT-874 y CNTO-1275), que se dirigen a la subunidad p40 de IL-12 e IL-23, están pendientes de aprobación en los Estados Unidos (Reich et al., *Nat. Rev. Drug. Discov.*, (8) 355-356 (2009); Lima et al., *Expert. Opin. Biol. Ther.* (9) 1107-1113 (2009)). A la inversa, no hay inhibidores directos de moléculas pequeñas de células T Th17, y solo medidas indirectas al inhibir MAPK y FLT3 de DC y APC (Brereton et al., *J. Immunol.*, (183) 1715-1723 (2009); Skarica et al. al., *J. Immunol.*, (182) 4192-4199 (2009)). Los datos descritos aquí sugieren que VGX-1027 inhibe no solo el efecto mediado por APC, sino también el proceso de diferenciación directa de las células T Th17 (Figura 6 y 8). Por lo tanto, VGX-1027 merece consideración en el tratamiento de una serie de trastornos autoinmunes debido a su nuevo mecanismo para inhibir la activación de APC y el desarrollo de células T Th17T.

o. VGX-1027 - Estudios de dosificación en humanos para seguridad.

Se realizó un estudio de dosis única ascendente, controlado con placebo, para evaluar la seguridad y la farmacocinética de VGX-1027 en sujetos humanos sanos. El estudio se realizó en 7 grupos de sujetos: grupo 1: 1 mg de VGX-1027 después del ayuno; grupo 2: 10 mg de VGX-1027 después del ayuno; grupo 3: 100 mg de VGX-1027

ES 2 744 245 T3

después del ayuno; grupo 4: 200 mg de VGX-1027 después del ayuno; grupo 5: 400 mg de VGX-1027 después del ayuno; grupo 6: 800 mg de VGX-1027 después del ayuno; y grupo 7: 100 mg de VGX-1027 después del ayuno y después de la alimentación. La farmacocinética se proporciona en la Tabla 6, a continuación:

5

Tabla 6

Dosis ^a (mg)	Tmax ^b (hr)	Cmax ^c (ug/mL)	AUC ^c (ug*h/mL)		Vida media ^c (hr)
1	1.00	0.05	0.46		7.2
10	0.50	1.1	4.43		4.9
100	1.75	9.1	74.6		8.8
200	1.50	15.7	111.1		7.7
400	1.25	23.8	155.2		6.7
800	2.00	43.2	329.7		7.9
En ayuno vs alimentados					
100 en ayuno		1.25	6.5	37.8	5.9
100 alimentados		3.50	4.6	55.7	6.3
^a administrado en ayunas ^b mediana ^c media geométrica La comparación de los perfiles medios geométricos a través de los niveles de dosis se puede ver en la Figura 21.					

10

También se realizó un estudio de dosis múltiples ascendente controlado con placebo para evaluar la seguridad y farmacocinética de VGX-1027 en sujetos humanos sanos. El principal resultado por medir fue la seguridad determinada por los signos vitales, los exámenes físicos, los ECG, las evaluaciones de laboratorio clínico y los informes de eventos adversos. El resultado secundario medido fue la farmacocinética en el día 1 y en el día 5 en estado estacionario. El estudio se realizó en 4 grupos de sujetos: grupo 1: 40 mg de VGX-1027 QD; grupo 2: 100 mg de VGX-1027 QD; grupo 3: 200 mg de VGX-1027 QD; Grupo 4: 200 mg de VGX-1027 BID. La farmacocinética se proporciona en la Tabla 7, a continuación, junto con los datos del estudio de dosis única:

15

Tabla 7

Dosis	Dosis única (CAT001)			Dosis Múltiple (Día 1)			Dosis Múltiple (Día 5)		
	**Tmax (hr)	Cmax (mg/L)	AUC (0-24) (hr*mg/L)	**Tmax (hr)	Cmax (mg/L)	AUC (0-24) (hr*mg/L)	**Tmax (hr)	Cmax (mg/L)	AUC (0-24) (hr*mg/L)
100 mg									
Media geo.	1.8	9.07	66.83	1.0	7.57	31.34	1.5	6.76	23.23
% CV geo	0.5 - 2.0	29.03	61.75	0.5 - 3.0	30.71	21.25	0.5 - 3.0	21.62	31.15
200 mg									
Media geo.	1.5	15.69	98.41	1.3	15.74	78.10	2.0	14.07	65.67
% CV geo	1.0 - 4.0	37.2	32.10	1.0 - 3.0	38.40	65.77	0.5 - 3.0	29.97	47.65

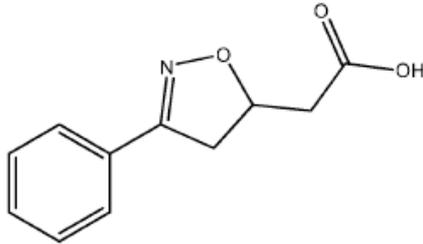
ES 2 744 245 T3

Dosis	Dosis única (CAT001)			Dosis Múltiple (Día 1)			Dosis Múltiple (Día 5)		
	**Tmax (hr)	Cmax (mg/L)	AUC (0-24) (hr*mg/L)	**Tmax (hr)	Cmax (mg/L)	AUC (0-24) (hr*mg/L)	**Tmax (hr)	Cmax (mg/L)	AUC (0-24) (hr*mg/L)
200 vs primera dosis BID el día 1 y el día 5 (AUC a 12 horas)									
Media geo.	1.5	15.69	78.54	1.0	13.10	58.22	1.5	16.80	70.39
% CV geo	1.0 - 4.0	37.2	30.65	0.5 - 3.0	24.60	24.46	0.5 - 3.0	30.61	35.88

La comparación de los perfiles medios geométricos a través de los niveles de dosis se puede ver en la Figura 22.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto, en donde el compuesto es ácido 3-fenil-4,5-dihidro-5- isoxazoleacético representado por la fórmula:



5

VGX-1027 o Fórmula II

para uso en un método para tratar la encefalomiелitis autoinmune o el lupus eritematoso sistémico.

10

2. Una composición farmacéutica que comprende el compuesto de la reivindicación 1 para uso en un método para tratar la encefalomiелitis autoinmune o el lupus eritematoso sistémico.

Figura 1.

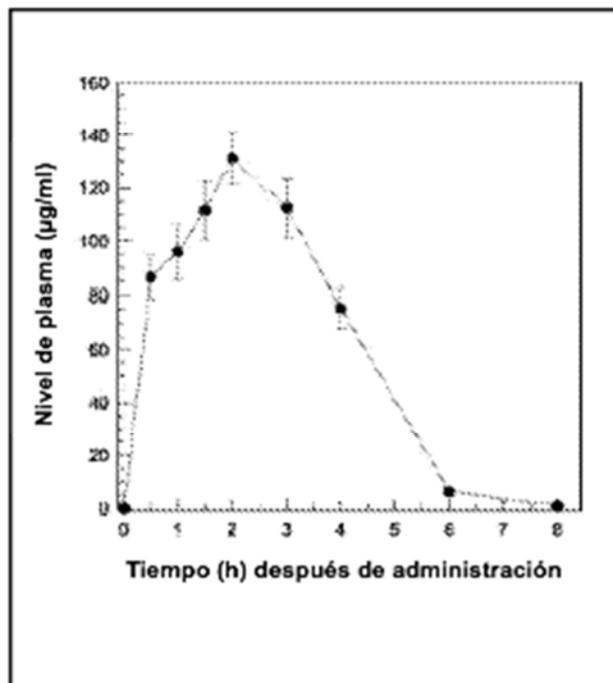


Figura 2.

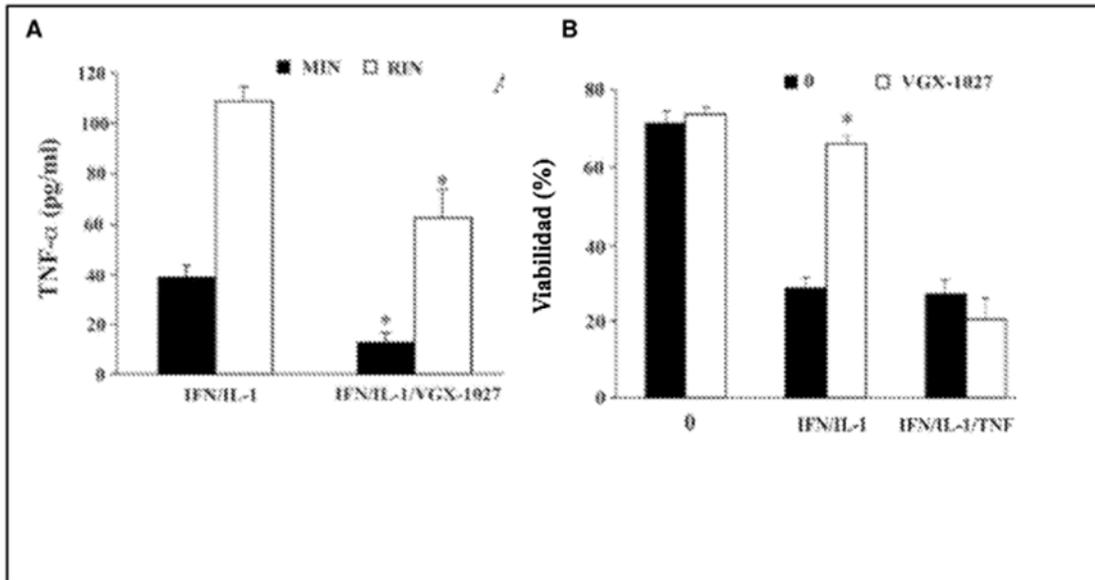


Figura 3.

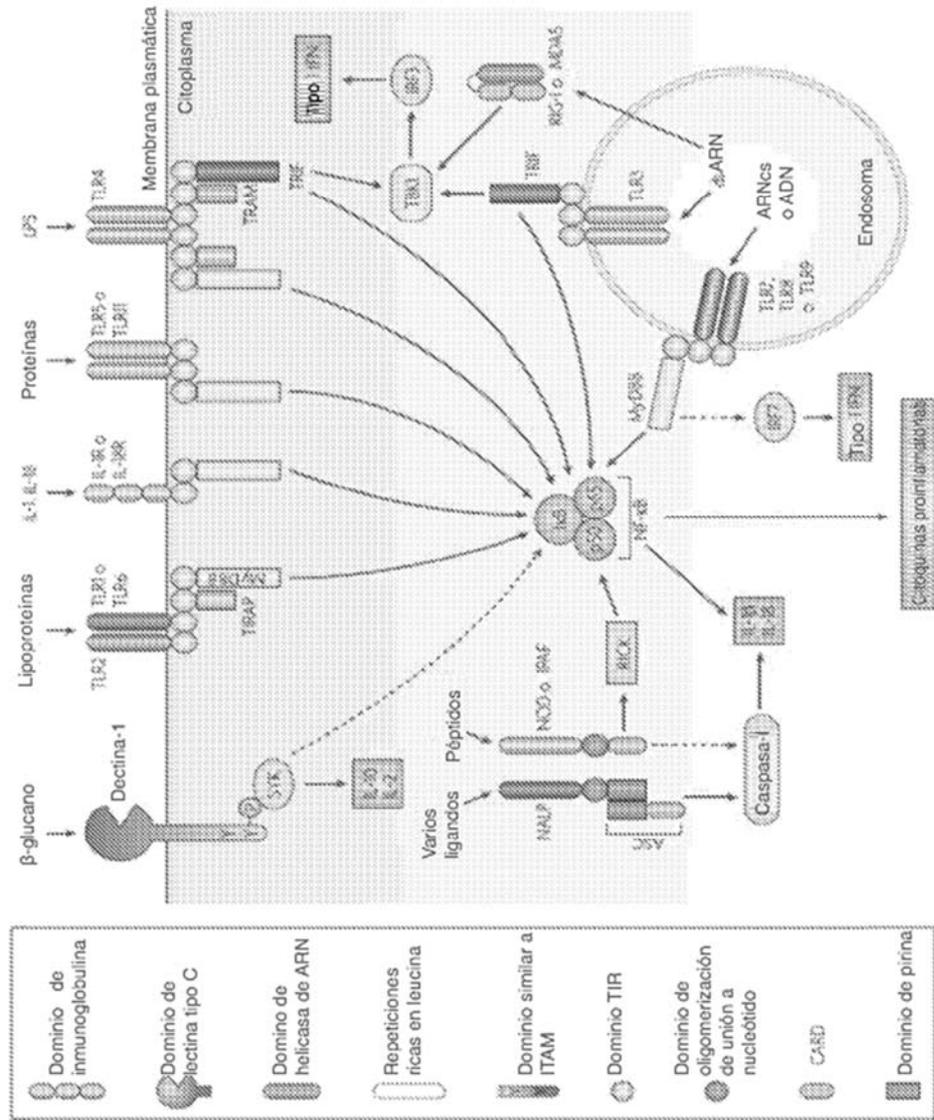


Figura 4.

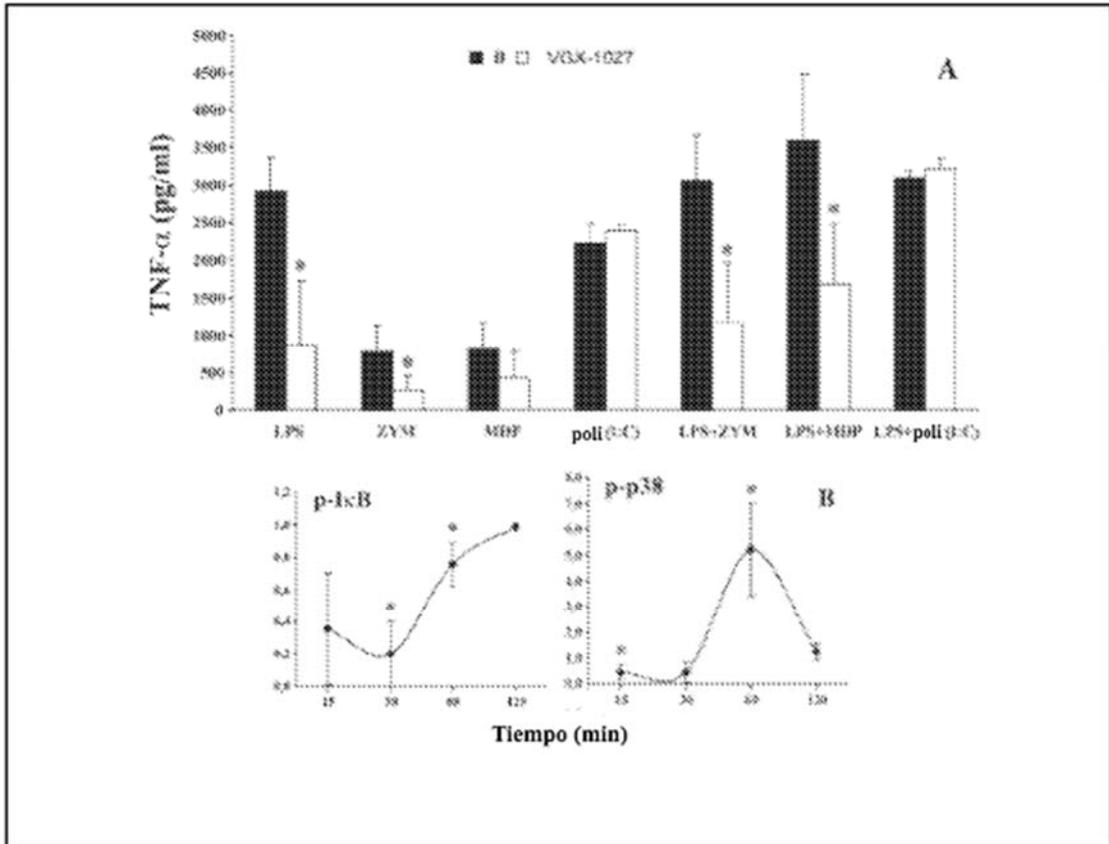


Figura 5.

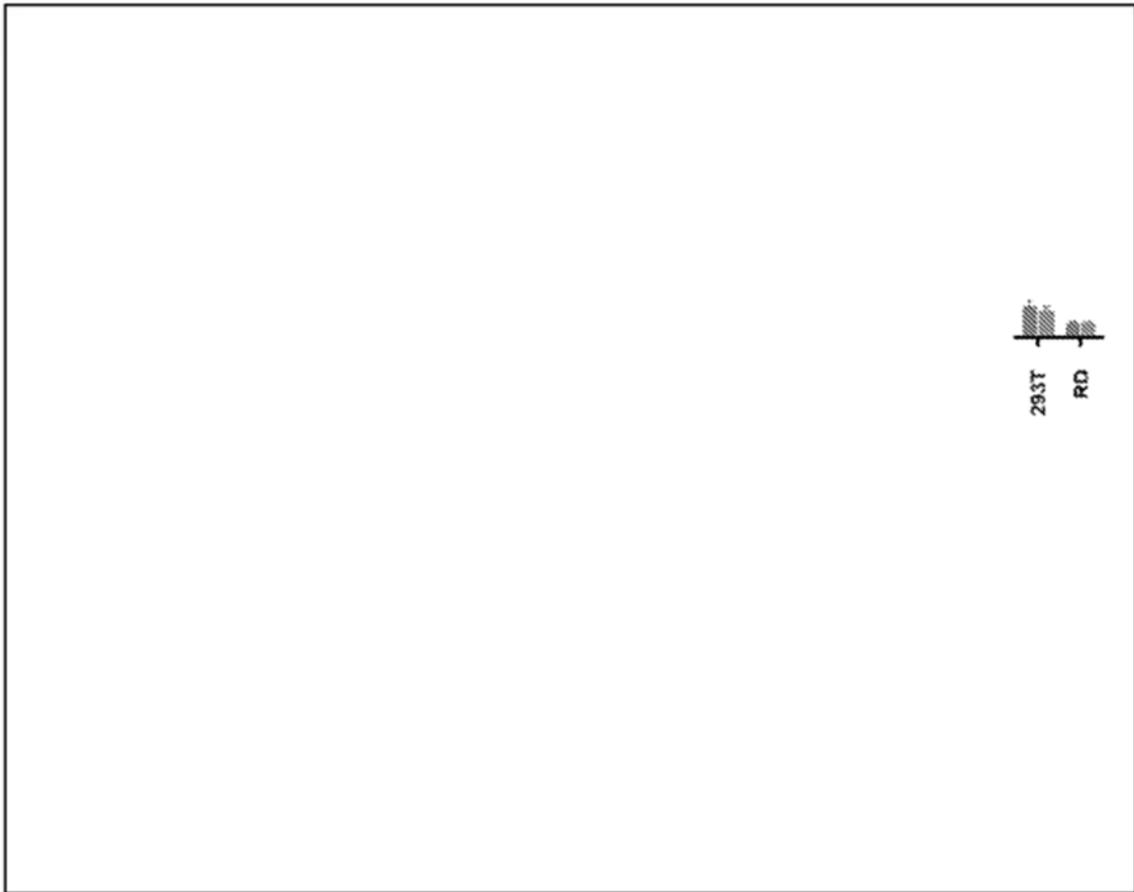


Figura 6.

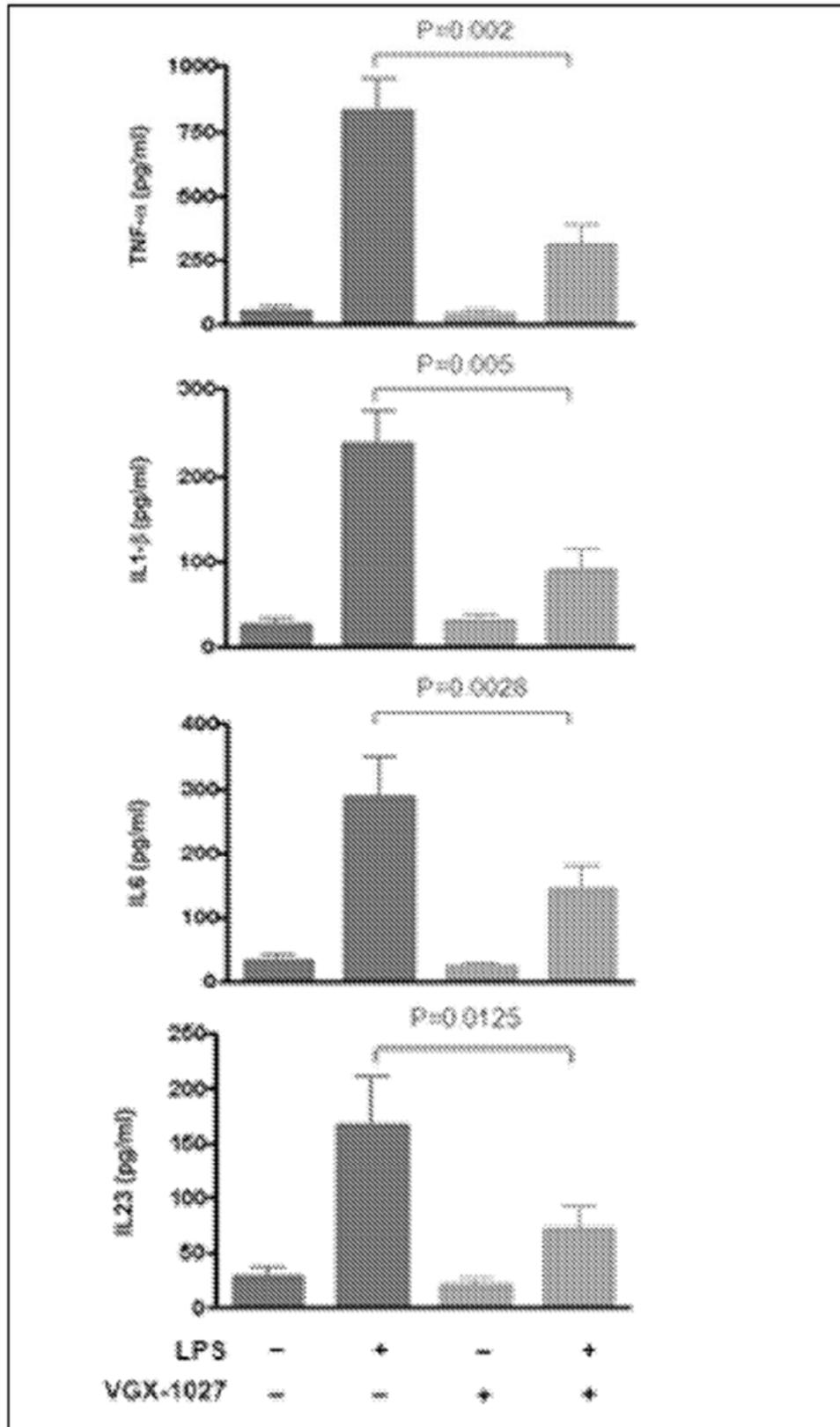


Figura 7.

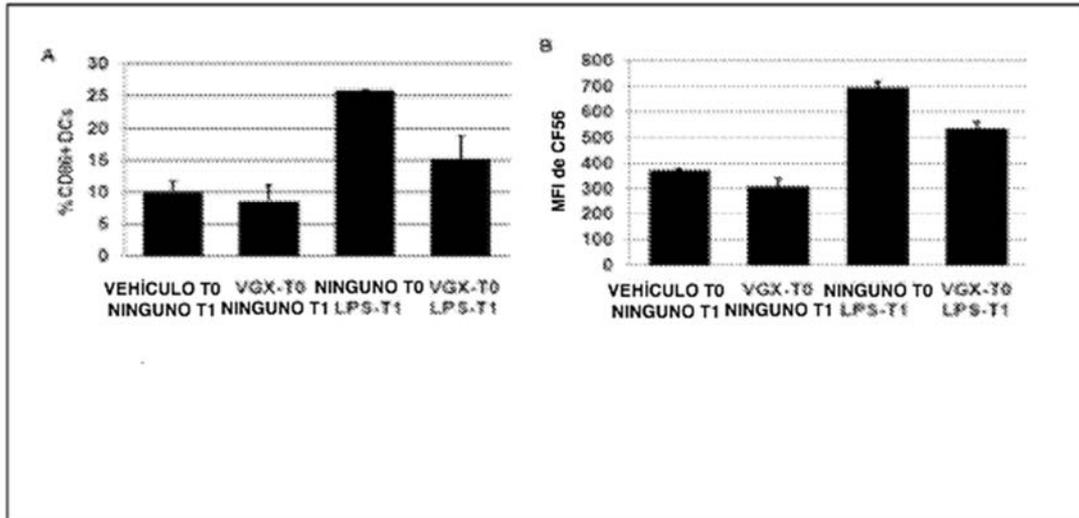


Figura 8.

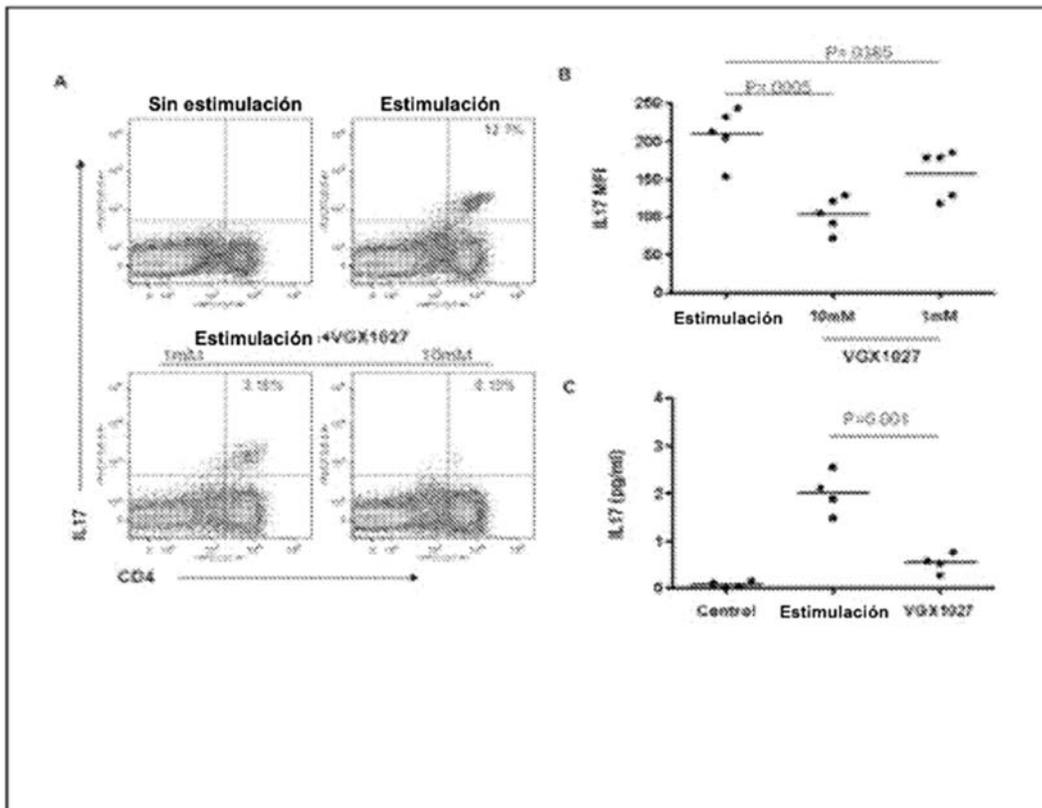


Figura 9.

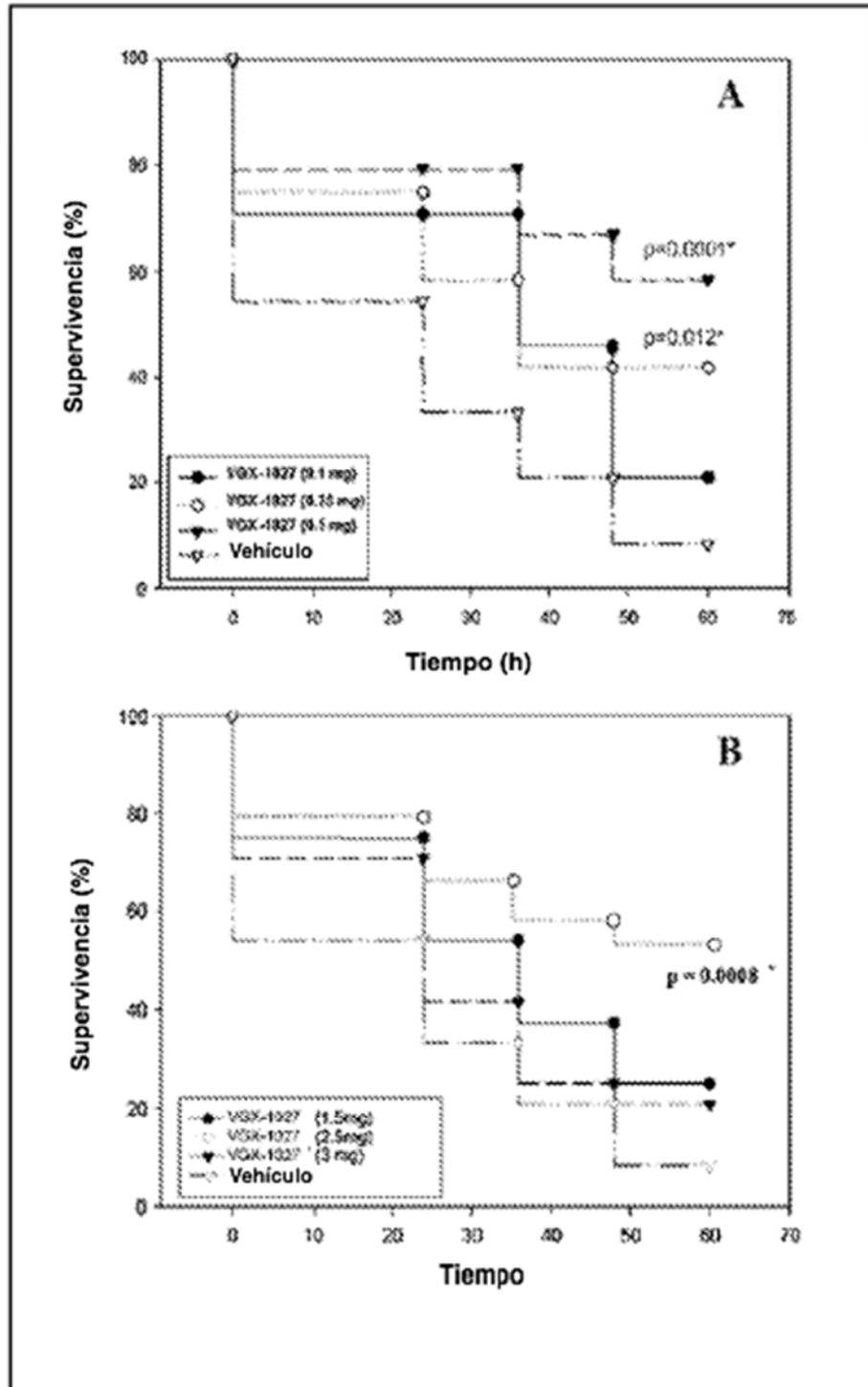


Figura 10.

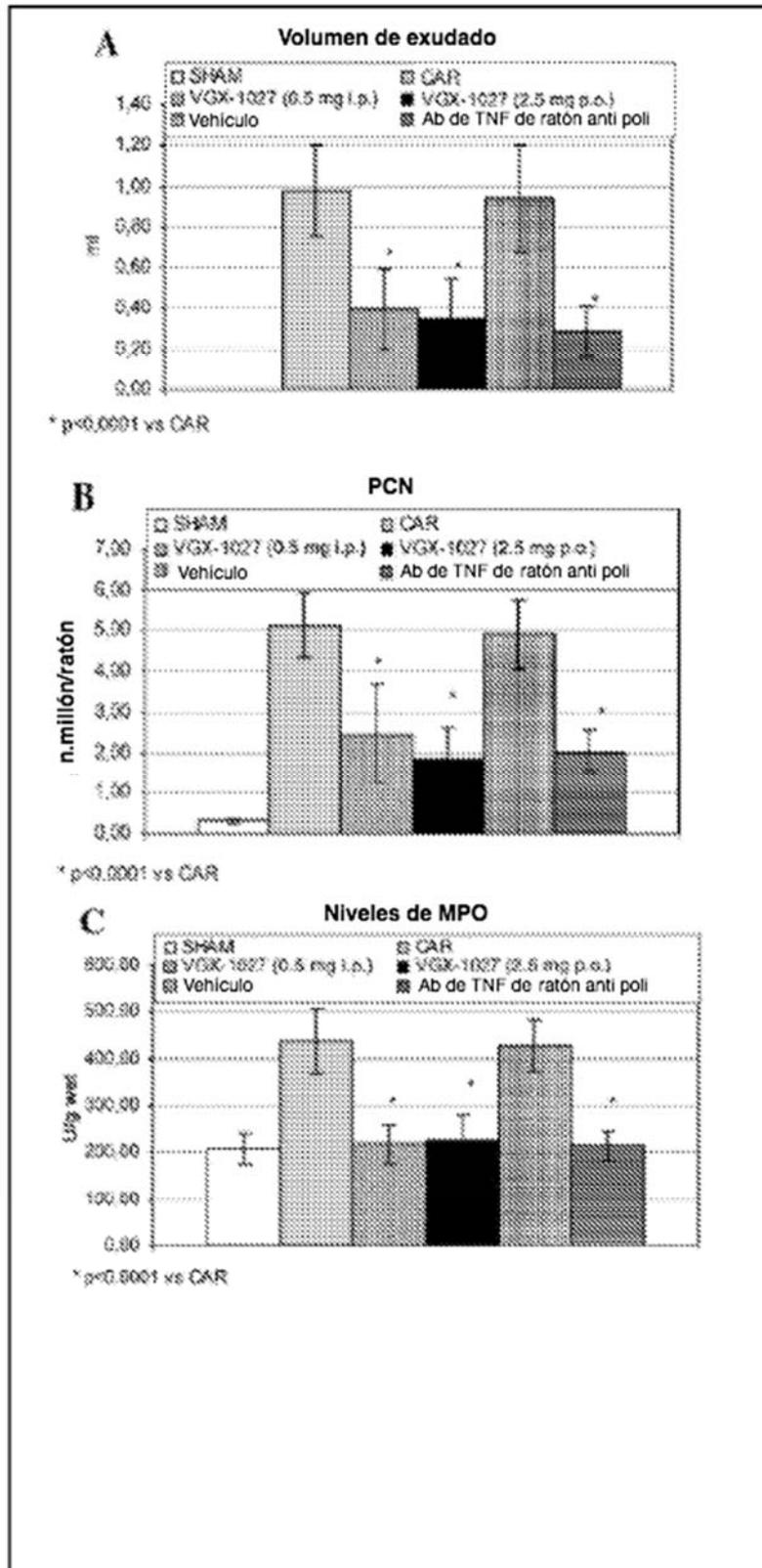


Figura 11.

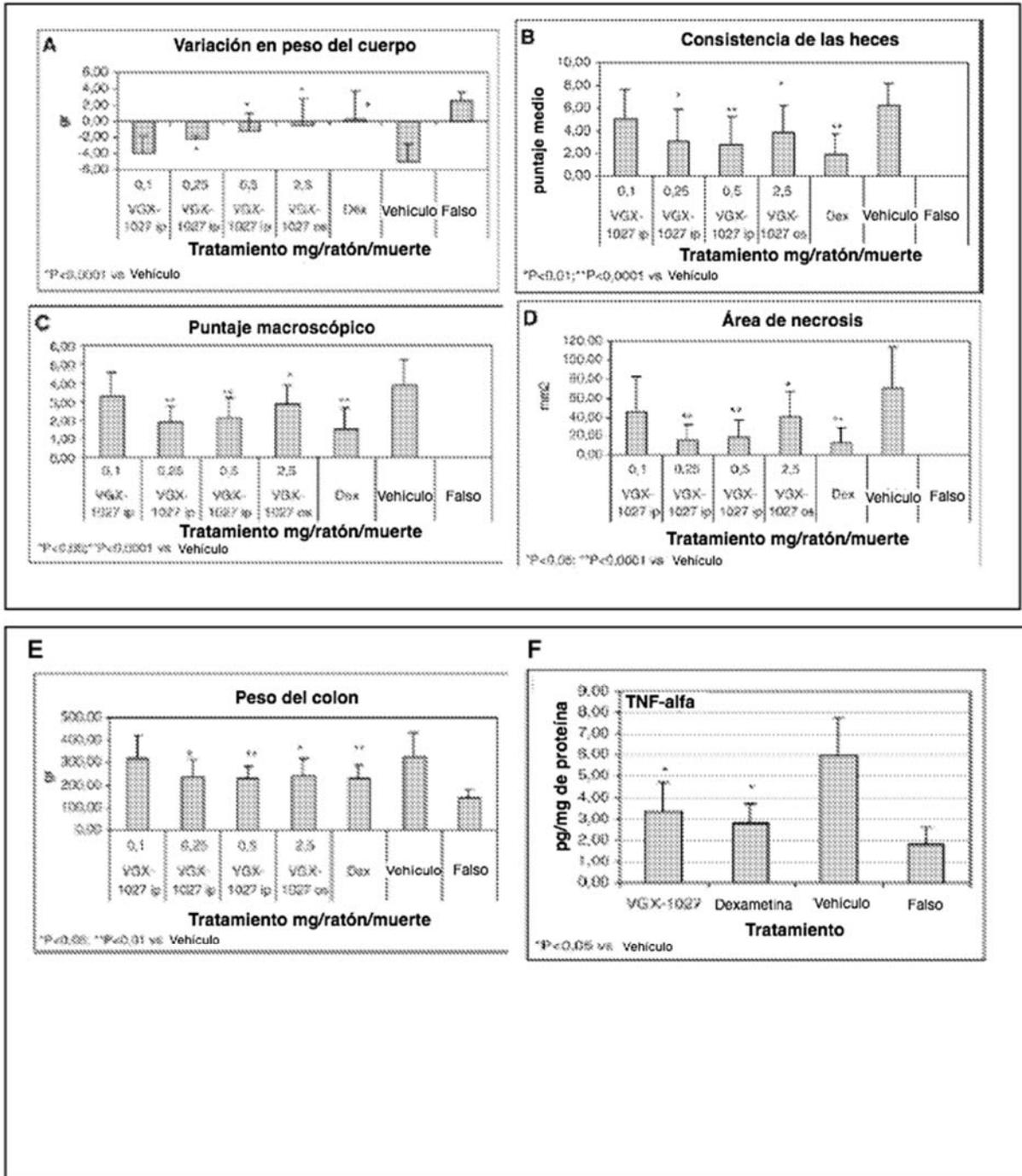


Figura 12.

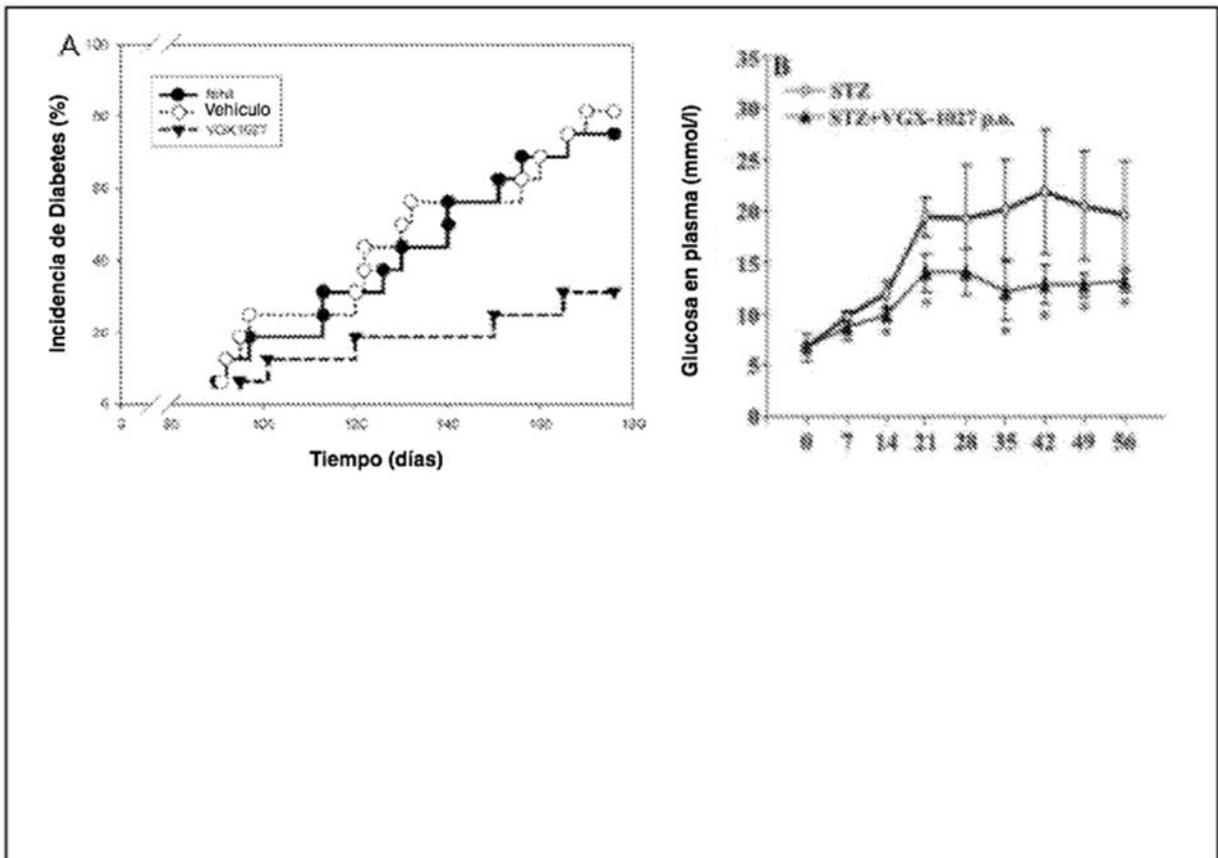


Figura 13.

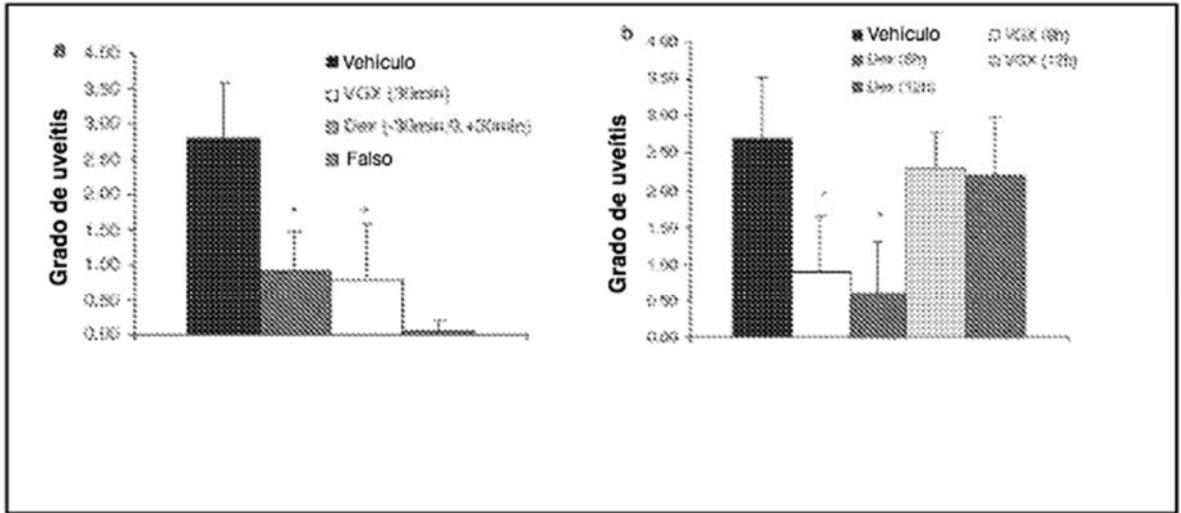


Figura 14.

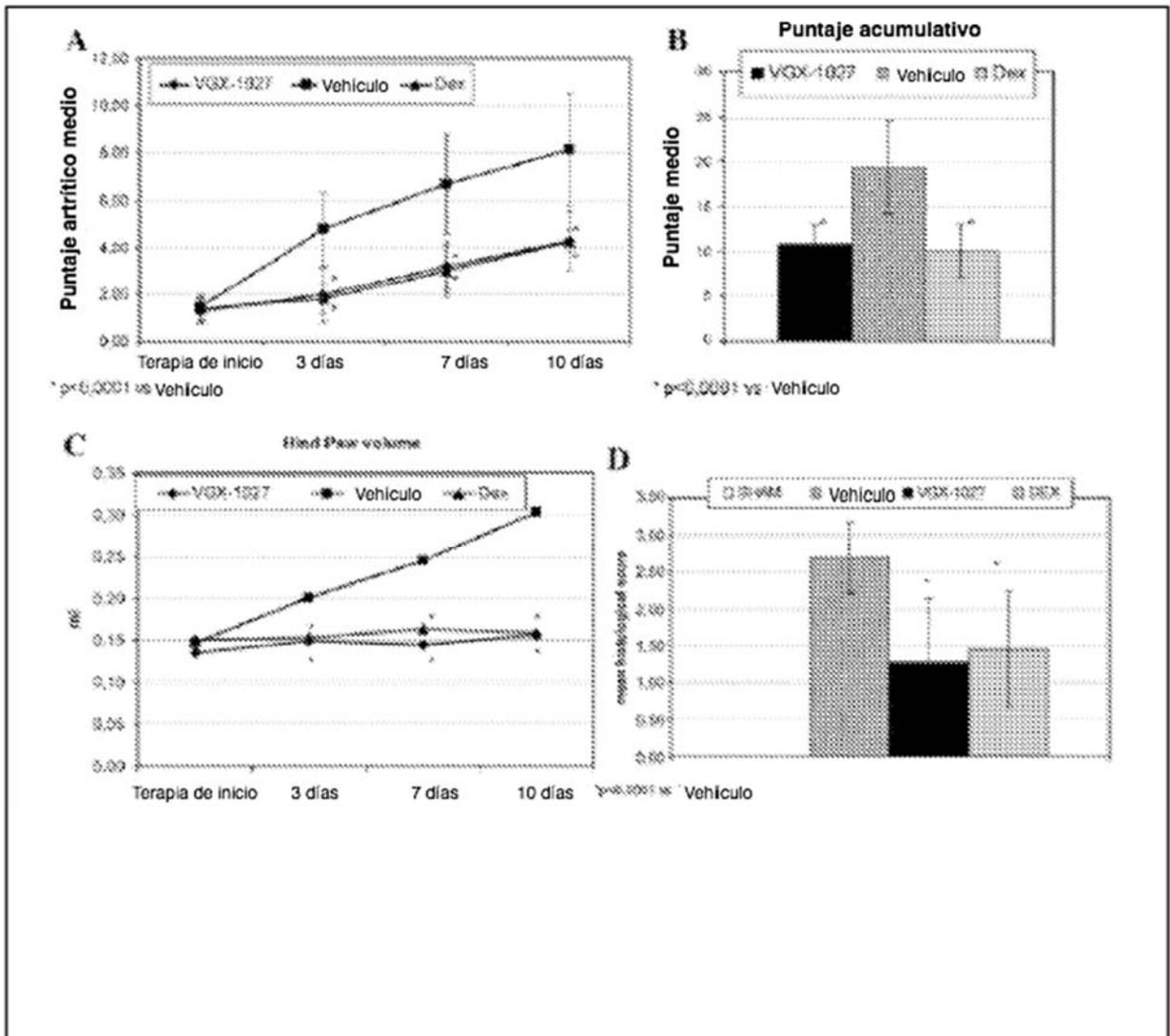


Figura 15.

Efectos inmunes de VGX1027 ex vivo en PBMC

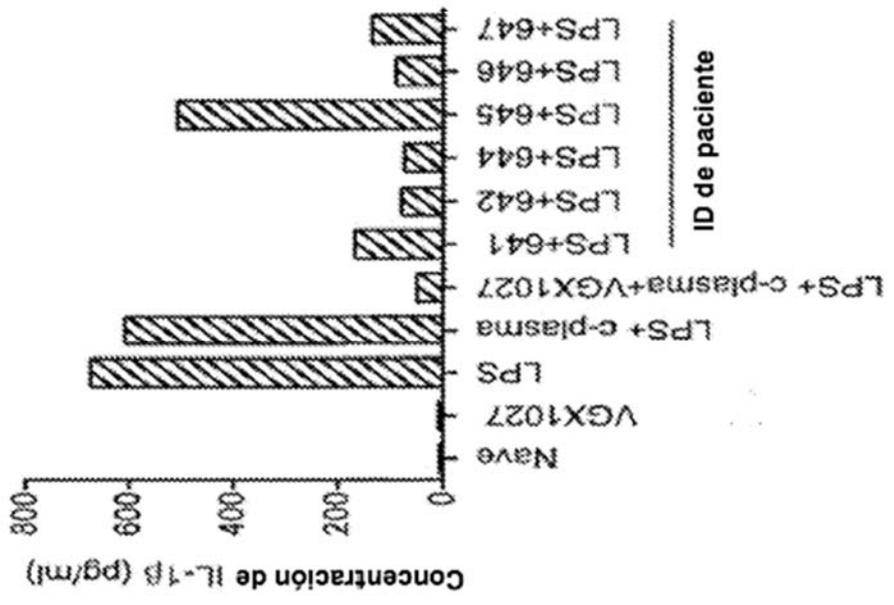
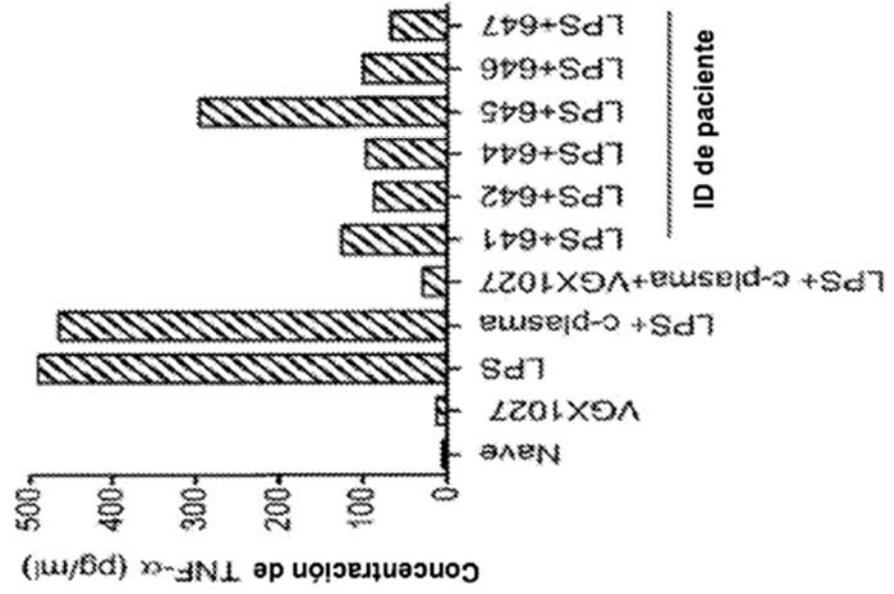


Figura 16

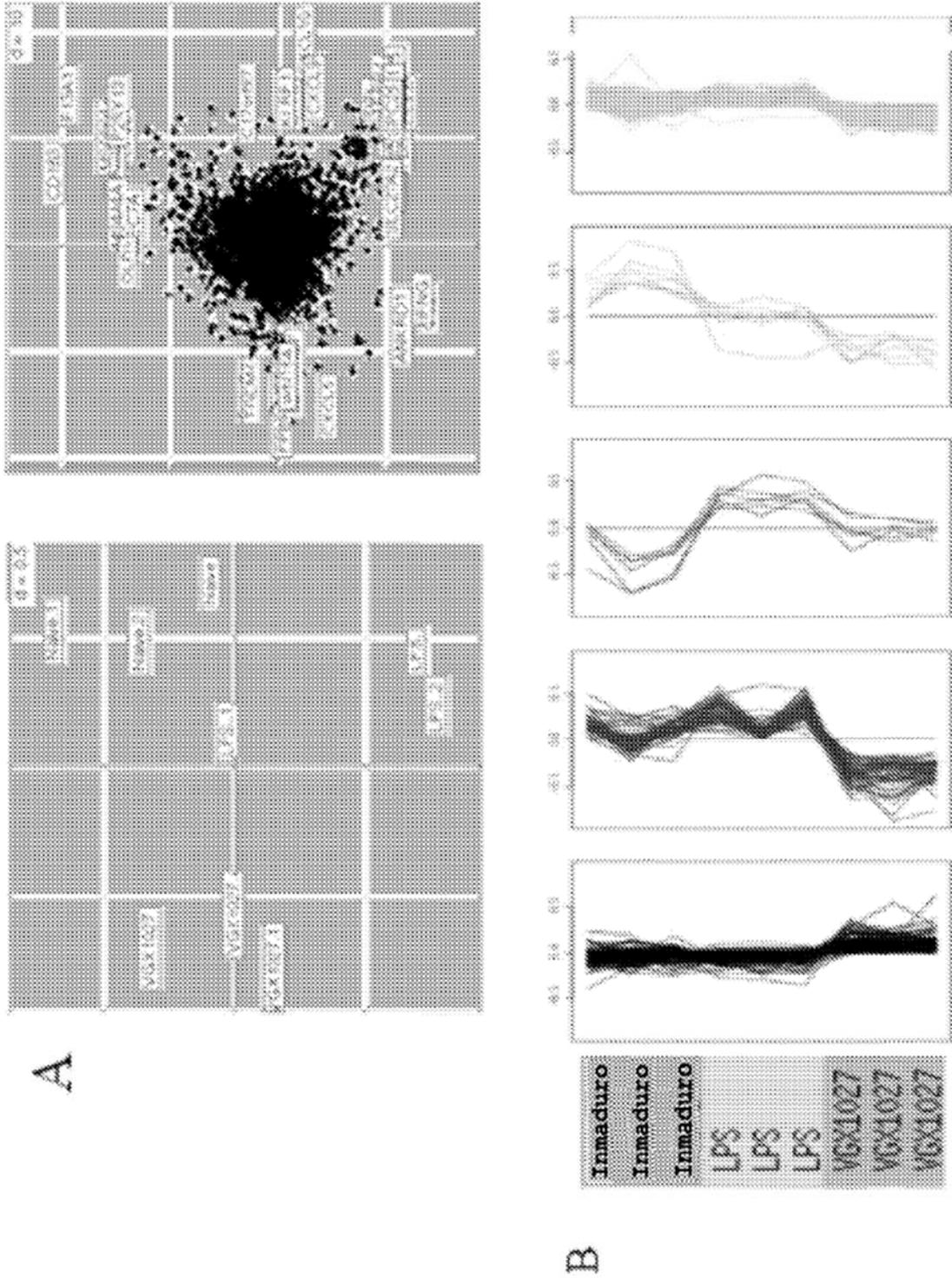


Figura 16 (continuación)

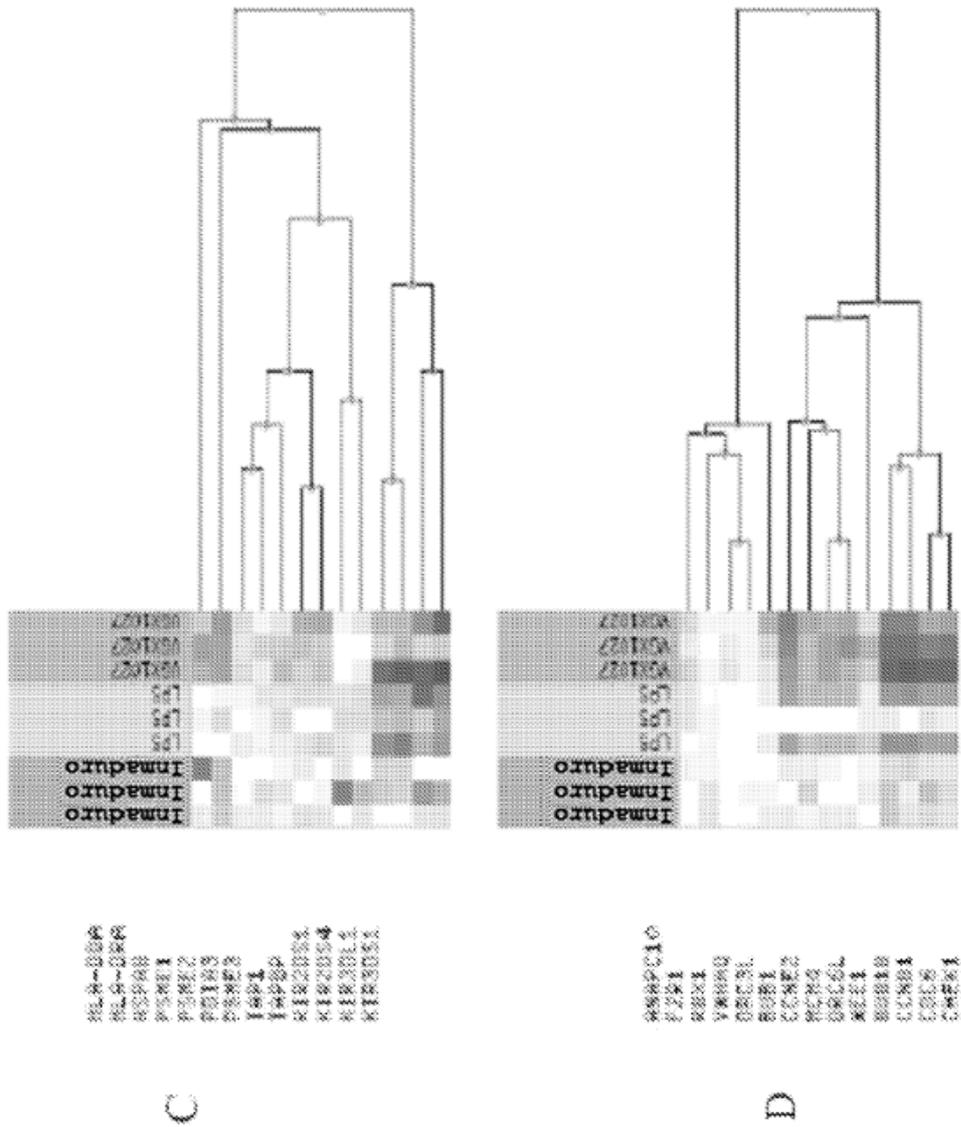


Figura 17

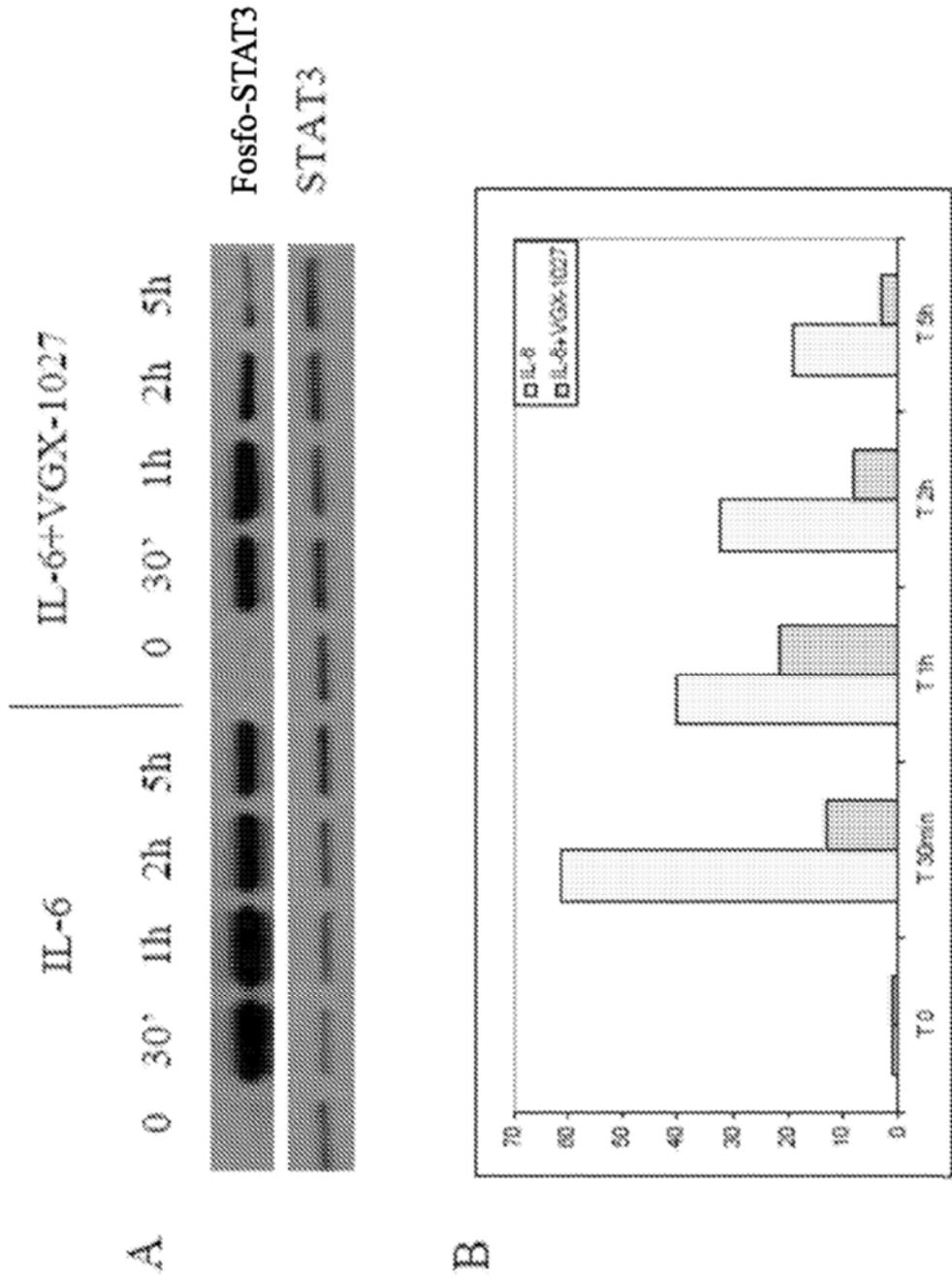


Figura 18

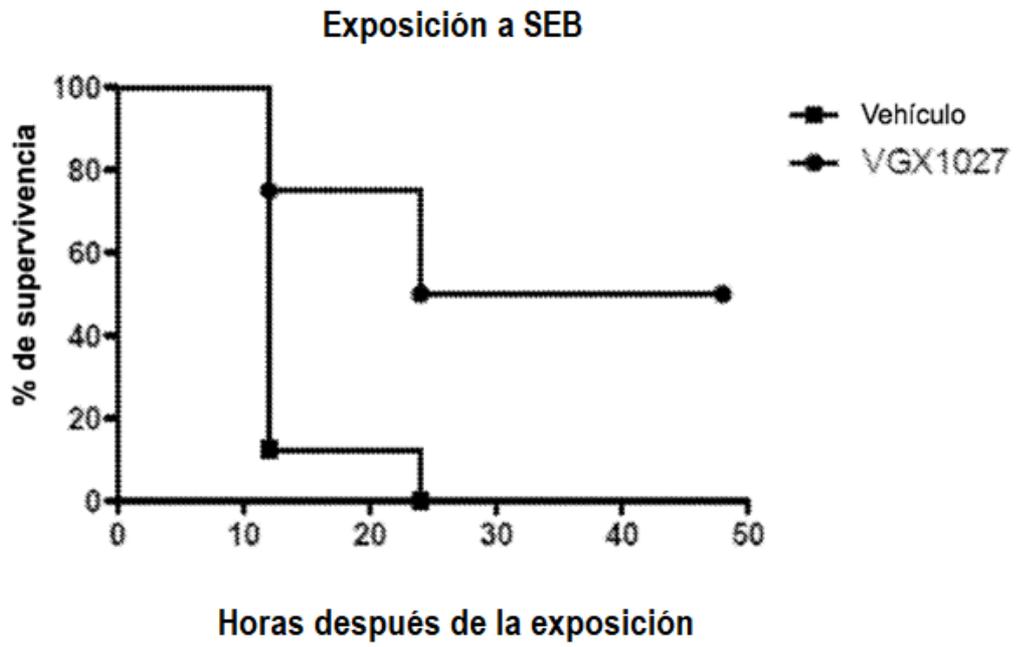


Figura 19

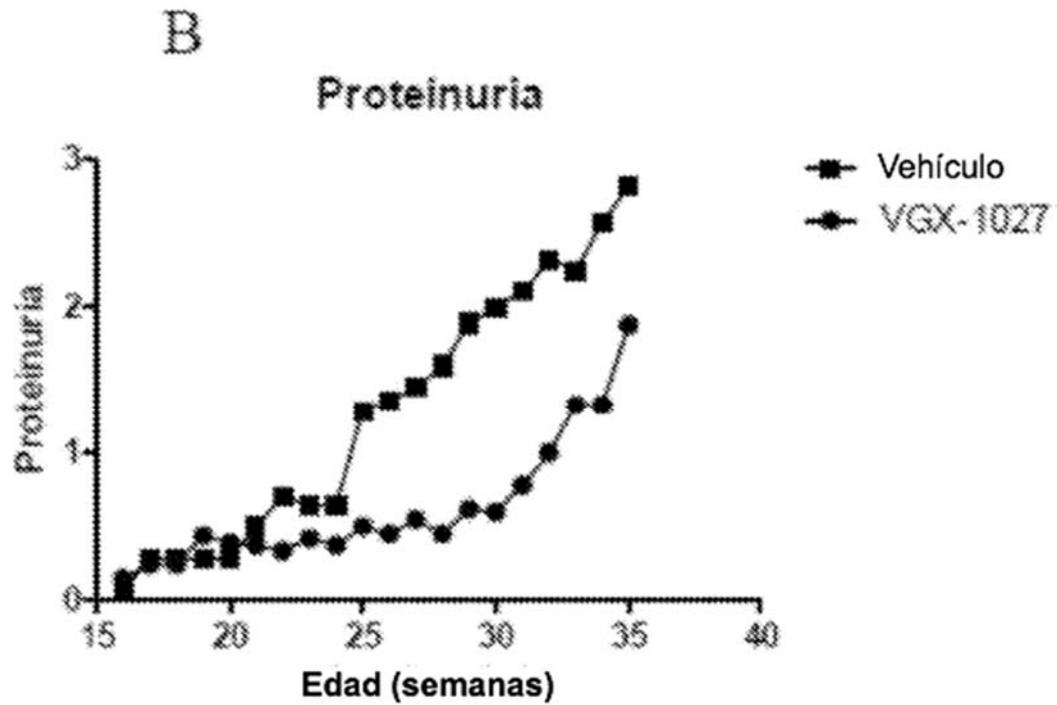
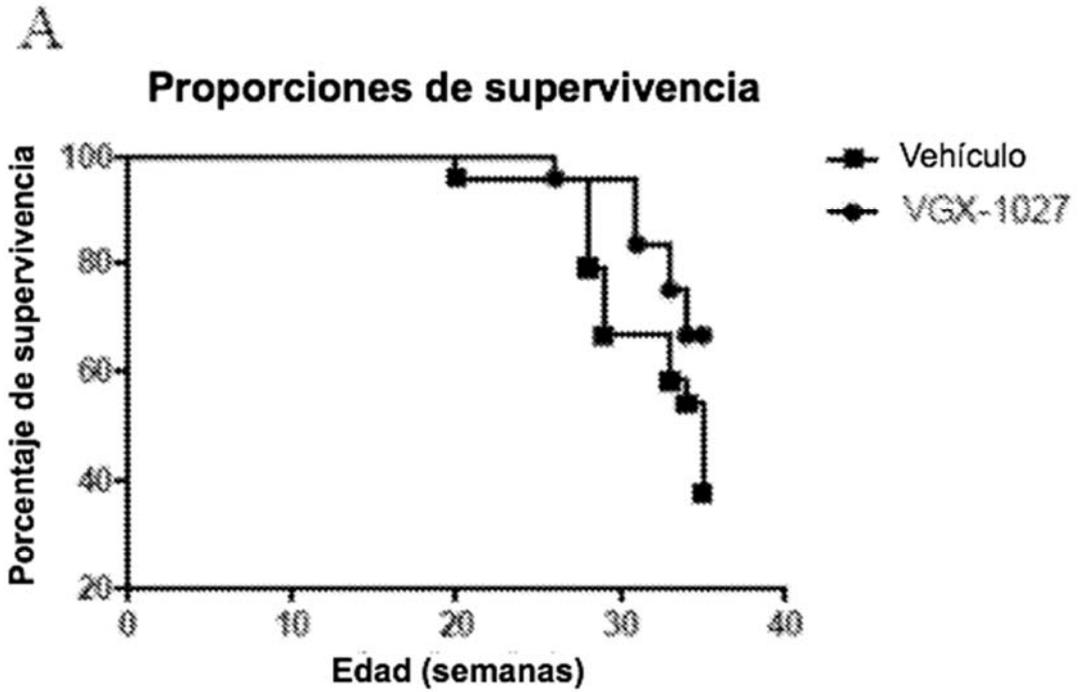


Figura 19 (continuación)

C

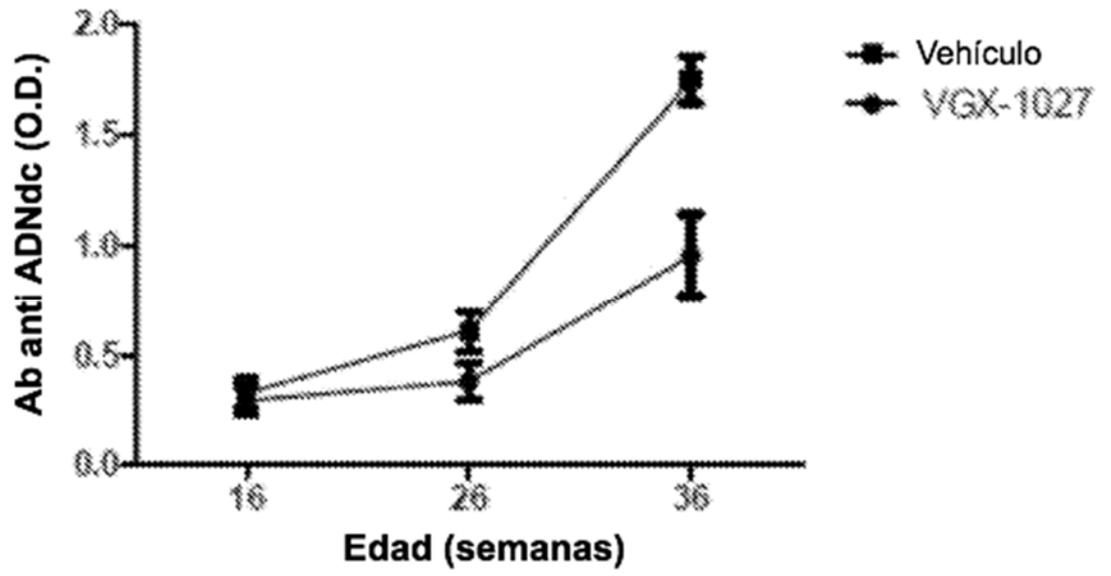


Figura 20

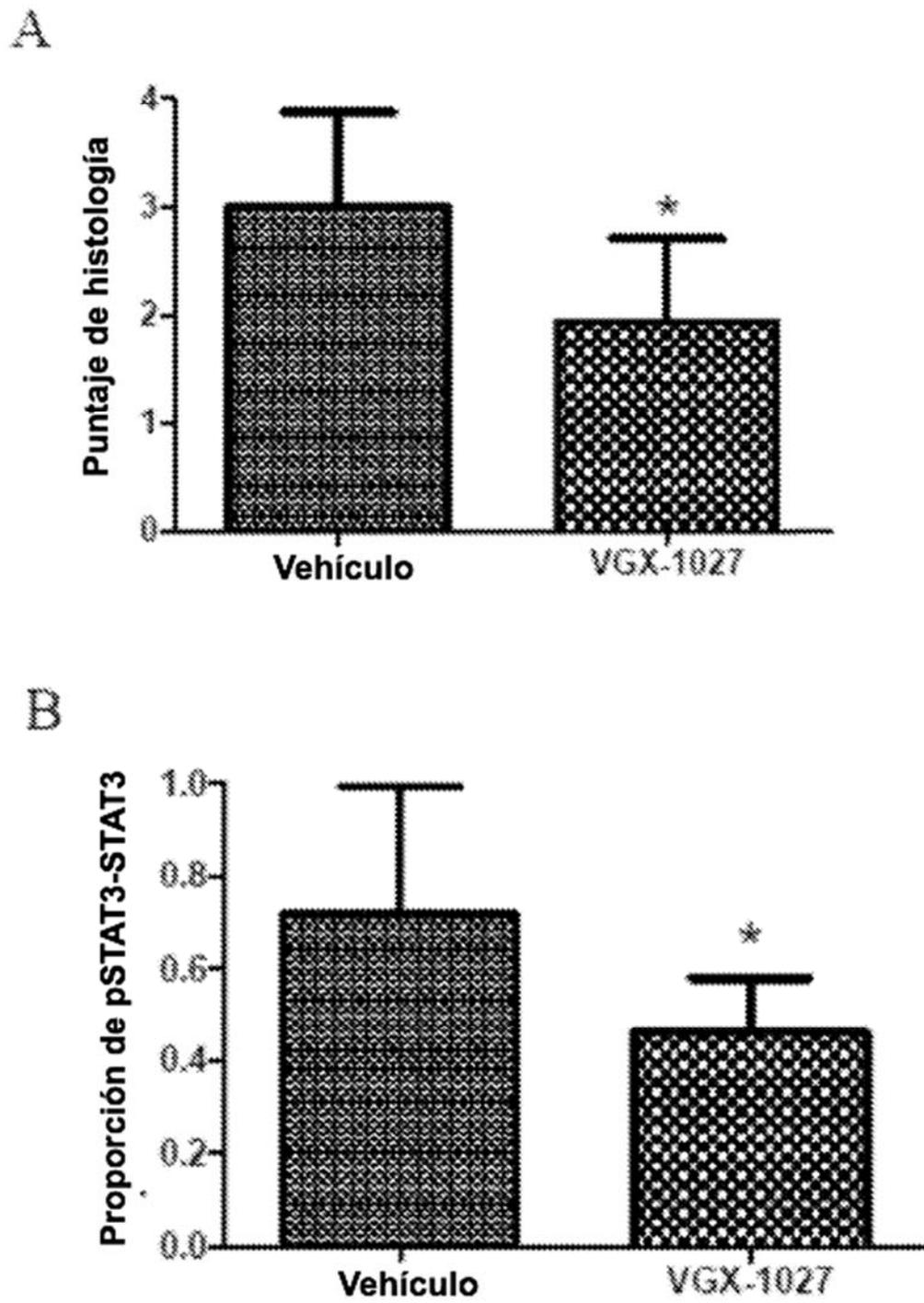


Figura 21

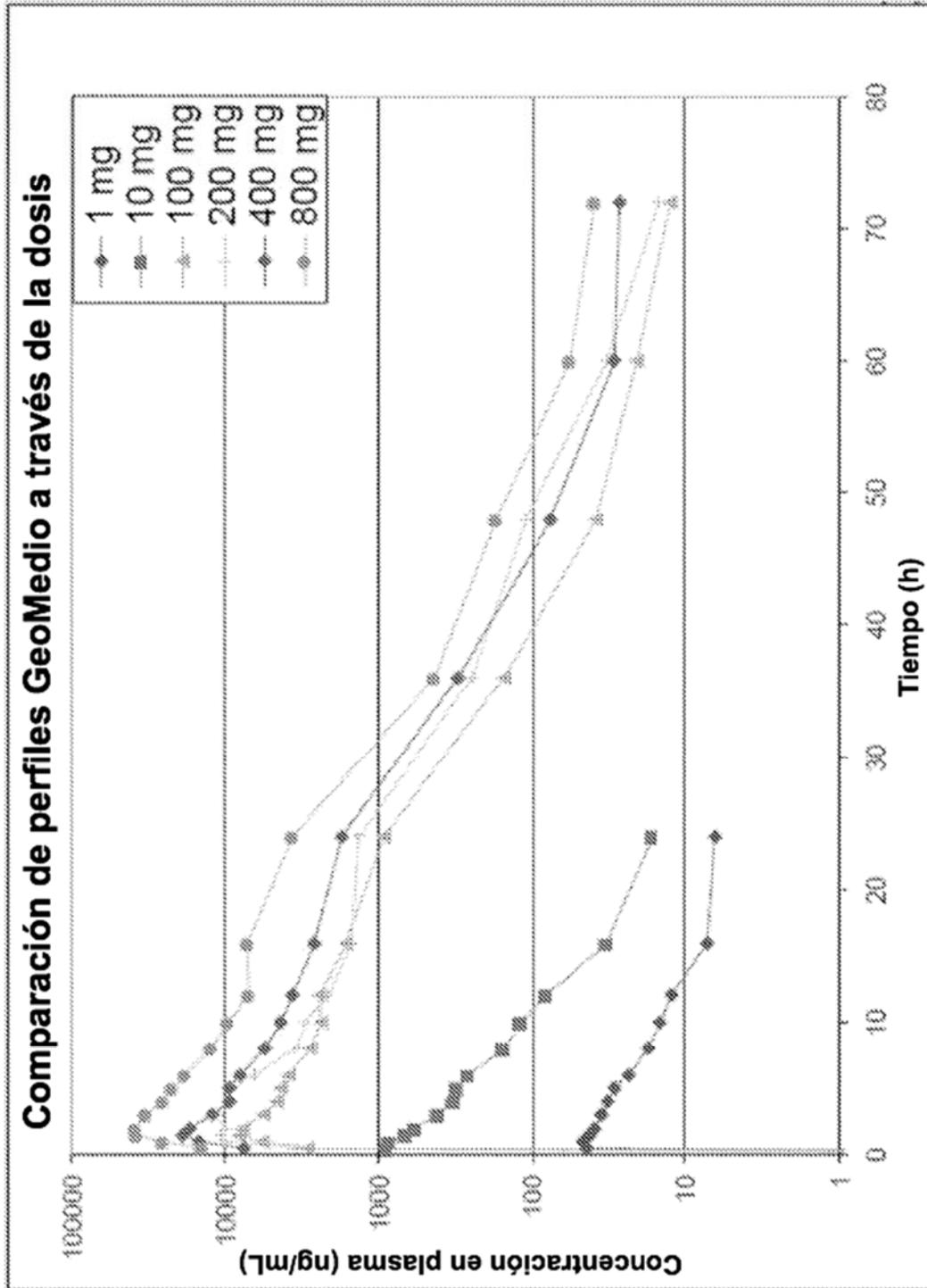


Figura 22

